

Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Marcelo Cecconi Portes

**Complexos imínicos de cobre com
atividade antiparasitária frente à Doença
de Chagas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo
Data de Depósito na SPG:
12/01/2021

Marcelo Cecconi Portes

Complexos imínicos de metais essenciais com atividade antiparasitária frente à Doença de Chagas

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientadora: Prof^a Ana Maria da Costa Ferreira
Coorientadora: Prof^a Maria Julia Manso Alves

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P849c Portes, Marcelo Cecconi
Complexos imínicos de cobre com atividade antiparasitária frente à Doença de Chagas / Marcelo Cecconi Portes. - São Paulo, 2021.
143 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Ferreira, Ana Maria da Costa
Coorientador: Alves, Maria Julia Manso

1. Doença de Chagas. 2. complexos de cobre. 3. ligantes imínicos. 4. viabilidade celular. 5. cruzaina. I. T. II. Ferreira, Ana Maria da Costa, orientador. III. Alves, Maria Julia Manso, coorientador.

“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can.”

J.R.R. Tolkien

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram e me permitiram chegar até aqui. Ao meu irmão que sempre me apoiou em todas as dificuldades.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Prof^a Dr^a Ana Maria da Costa Ferreira, pela orientação, suporte e ensinamentos nesses dez anos como aluno do laboratório. Pela oportunidade como aluno de IC que culmina hoje em um doutorado. Pelas oportunidades de crescimento e pelos conselhos, que fazem parte da pessoa que eu sou hoje.

À Prof^a Dr^a Maria Júlia Manso Alves e todo seu laboratório, por me receber e me acolher. Pela oportunidade e pela paciência de me ensinar a trabalhar com parasitas com segurança e permitir que essa pesquisa tenha acontecido. Pelas conversas, conselhos e revisões.

À Célia Ludio, pelas experiências do dia-a-dia, pelas conversas, pelos cafés, pela paciência de lidar com um aluno assustado e por tudo que me ensinou no laboratório.

Ao Prof^o Dr^o Wagner Alves de Souza Júdice e sua equipe, na Universidade de Mogi das Cruzes, pelos experimentos com cruzáina. Pela disposição de ensinar e revisar o capítulo 4 desta tese. Por tornar o capítulo 4, possível.

À Cida Paiva Lopes e ao Ricardo Alexandre Couto por todo o suporte e dedicação.

Gostaria de agradecer a todos que dividiram o laboratório comigo em todos esses anos. Pelas discussões, conversas e ideias. Por tudo que me ensinaram e por todos os momentos que pudemos dividir. Em especial ao Rodrigo Fazzi, Rodrigo Bernardi, Adriana Pires, Camila Wegermann, Veridiana Tofik, Cléia Justino, Daniel Rodrigues, Francisco Neto, Mauricio Oshiro, Júlia Freixedelo, Elaine Mattos e Rafael Mol.

Ao meu melhor amigo, Raphael Bacil, por não ter desistido de mim e não ter duvidado do meu potencial, mesmo quando eu mais duidei. Por todas as conversas, ideias e momentos que me ajudaram a não desistir e superar a frustração. Por me ajudar a me encontrar e encontrar meu propósito.

À minha melhor amiga, Elaine Mattos, por sempre acreditar em mim, por dividir os melhores e piores momentos e contribuir imensamente para o meu crescimento pessoal. Por me ajudar a enxergar quem eu realmente sou e fazer eu me sentir confortável para mostrar isso para o mundo. Obrigado por contar essa história junto comigo e por fazer o impossível se tornar possível.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, Rodrigo, Francisco, Fernando, Everton, Chiara e Anderson.

À Milena Barp, pela companhia e pelas conversas tarde da noite. Por acreditar em mim e me ajudar a vencer minhas dúvidas.

À Jéssica Luiza e Isabela Fernandes, pelo apoio incondicional, pelo carinho e pela inspiração.

Ao Prof^o Dr^o Lucas Rodrigues, Douglas Fritzen, Victor Vendruscolo e Luis Couzenn, por acreditar nas minhas ideias doidas e por confiar que eu vou conseguir coloca-las em prática. Pelo amparo e suporte emocional. Por me ajudar a manter a cabeça focada.

A todos que dividiram momentos comigo nessa caminhada de 12 anos de IQ. Todos contribuíram para construir a pessoa que eu sou hoje e tenham certeza de que eu guardo um pedacinho de cada um em mim.

Por fim, gostaria de agradecer à CAPES pela bolsa de doutorado. À Fapesp, via projeto temático, e à rede CEPID/Redoxoma, pelo auxílio financeiro para compra de reagentes e manutenção de equipamentos.

Resumo em português

Portes, M. C. **Complexos imínicos de cobre com atividade antiparasitária frente à Doença de Chagas**, 2021, 144p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados três complexos de cobre com ligantes imínicos, com o objetivo de avaliar sua atividade tripanocida. Esses complexos foram caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas, como UV-Vis, Infravermelho e EPR, além de análise elementar e espectrometria de massa. Juntamente com outros complexos similares previamente sintetizados pelo nosso grupo, tiveram suas atividades avaliadas frente à forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*, responsável pela fase aguda da doença de Chagas, por ensaios de viabilidade celular, com determinação do valor de seus IC₅₀, concentração em que observamos a morte de 50% da cultura celular, pela metodologia denominada MTT. Todos os complexos mostraram-se eficientes frente a tripomastigotas, apresentando valores de IC₅₀ abaixo de 10 µM, com quatro deles obtendo índice de seletividade maior que 10, fator importante para definir agentes promissores antichagásicos. Complexos selecionados também tiveram sua atividade verificada frente à forma amastigota do parasita, responsável pela fase crônica da doença, utilizando método de imageamento por microscópio de fluorescência e contagem celular. Estudos de inibição da cruzaina, uma cisteíno-protease importante para o metabolismo do parasita foram conduzidos em colaboração com o laboratório do Prof. Wagner Alves de Souza Júdice, da Universidade de Mogi das Cruzes. Quatro dos compostos testados apresentaram atividade inibitória frente a cruzaina, sendo dois de cobre, um de zinco e um ligante livre. Os estudos também permitiram diferenciar os mecanismos de inibição dos compostos, com os complexos de cobre apresentando um mecanismo de inibição clássico e o composto de zinco e o ligante livre apresentando o mecanismo de inibição competitiva parabólica com cooperatividade.

Palavras-chave: Doença de Chagas; complexos de cobre; ligantes imínicos; atividade tripanocida; cruzaina; viabilidade celular.

Abstract

Portes, M. C. **Imine copper complexes with antiparasitic activity against Chagas disease**, 2021, 144p. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, three copper complexes with iminic ligands were synthesized and characterized, with the objective of evaluating their trypanocidal activity. These complexes were characterized by several spectroscopic techniques, such as UV-Vis, Infrared and EPR, in addition to elementary analysis and mass spectrometry. Together with other similar complexes previously synthesized by our group, their activities were evaluated against the trypomastigote form of the parasite *T. cruzi*, responsible for the acute phase of Chagas disease, by cell viability tests, with determination of the value of their IC₅₀, concentration in that we observed the death of 50% of the cell culture, by the methodology called MTT, all presenting IC₅₀ values below 10 μM, with four of them obtaining a selectivity index greater than 10, important factor for defining promising antichagasic agents. Selected complexes also had their activity verified against the amastigote form of the parasite, responsible for the chronic phase of the disease, using a fluorescence microscope and cell counting imaging method. Inhibition studies of cruzain, a cysteine protease important for the metabolism of the parasite, were conducted in collaboration with the laboratory of Professor Wagner Alves de Souza Júdice at the University of Mogi das Cruzes. Four of the tested compounds showed inhibitory activity against cruzain, two of copper, one of zinc and a free ligand. The studies also allowed to differentiate the mechanisms of inhibition of the compounds, with the copper complexes presenting a classic inhibition mechanism and the zinc compound and the free ligand presenting the competitive parabolic inhibition mechanism with cooperativity.

Keywords: Chagas disease; copper complexes; imine ligands; trypanocidal activity; cruzain inhibition; cell viability.

Sumário

Introdução.....	17
Objetivos.....	32
Capítulo 1.....	33
Síntese e Caracterização dos Complexos Metálicos.....	33
1.1 Considerações Iniciais	34
1.2 Parte Experimental	37
1.2.2 Precursores utilizados.....	37
1.2.3 Sínteses dos complexos oxindolímnicos de cobre(II).....	39
1.2.3.1 Síntese do Composto 1 – [Cu(isaenim)]ClO ₄ ·2H ₂ O.....	39
1.2.3.2 Síntese do Composto 2 – [Cu(isabmz)H ₂ O]ClO ₄	41
1.2.3.3 Síntese do Composto 3 – [Cu(apybmz)]ClO ₄	43
1.2.4 – Dados de Caracterização dos Compostos 4 e 5.....	45
1.2.5 Técnicas utilizadas na Caracterização dos Compostos Preparados.....	46
1.2.6 Otimização das Estruturas dos Complexos por DFT.....	47
1.3 Resultados e Discussão	48
1.3.1 Caracterização dos Compostos por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	48
1.3.2 Caracterização dos Compostos por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	51
1.3.3 Caracterização dos Compostos por Espectroscopia no UV/Visível.....	56
1.3.4 Otimização das estruturas dos Complexos por DFT.....	59
1.4 Conclusões	61
Capítulo 2.....	63
Ensaio de Viabilidade Celular em Tripomastigotas.....	63
2.1 Considerações Iniciais	64
2.2 Parte Experimental	67
2.2.1 Estudos de citotoxicidade celular pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) com células-controle, Fibroblastos P4 e LLCMK2 ...	67
2.2.2 Ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) com Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	68
2.3 Resultados e Discussões	72
2.3.1 Curva padrão de Absorbância vs. concentração de parasitas pelo método MTT	72
2.3.2 Ensaio de viabilidade celular em células-controle via MTT.....	73
2.3.3 Ensaio de viabilidade celular em tripomastigotas via MTT.....	74

2.3.4	Comparação de Resultados obtidos através de Método MTT e Contagem em Câmara de Neubauer	77
2.4	Conclusões	78
Ensaio de Inibição de Taxa de Infecção em Amastigotas		81
3.1	Considerações Iniciais	82
3.2	Parte Experimental	83
3.2.1	Cultura de Células LLCMK2	83
3.2.2	Ensaio de Atividade Antiproliferativa em Amastigotas	83
3.2.3	Microscopia de Fluorescência.....	84
3.2.4	Contagem de Células Totais e Infectadas.	85
3.3	Resultados e Discussões	86
3.3.1	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência com Fibroblasto P4.....	86
3.3.2	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência com LLCMK2.	88
3.3.2.1	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto 1	89
3.3.2.2	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto 2	93
3.3.2.3	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto 4	97
3.3.2.4	Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto 5	101
3.4	Conclusão	105
Cruzaína como possível alvo da ação tripanocida de complexos imínicos de cobre		107
4.1	Considerações Iniciais	108
4.2	Parte Experimental	116
4.3	Resultados e Discussão	118
4.4	Conclusões	130
Capítulo 5		132
Conclusões e Perspectivas.....		132
Referências.....		136

Lista de Figuras

Figura 1. Diferentes triatomíneos ⁶ . Fonte: https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/parasitoses/doenca-de-chagas/	18
Figura 2. Derivados testados como agentes promissores antichagásicos ⁹	20
Figura 3. Formas amastigotas (A, B), tripomastigotas sanguíneas (C) e epimastigotas (D) do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> . Imagens: Técia Ulisses de Carvalho, Estudo de microscopia óptica, Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro	21
Figura 4. Fármacos utilizados contra a doença de Chagas: benznidazol (1) e nifurtimox (2).....	22
Figura 5. Mecanismos propostos para os fármacos Benznidazol e Nifurtimox, envolvendo enzimas nitroredutases e formação de espécies radicalares ¹²	23
Figura 6. Compostos orgânicos diversos com atividade tripanocida (cetoconazol, alopurinol, tiazóis, tiazolidinonas, entre outros).	25
Figura 7. Esquema de derivados híbridos contendo os grupamentos oxindol e triazol (conforme ref 24).	26
Figura 8. Equilíbrio ceto-enólico para o complexo $[Cu(isaenim)]^{+/2+}$	35
Figura 9. Equilíbrio ceto-enólico para o complexo $[Cu(isabmz)(H_2O)]^{+/2+}$	35
Figura 10. Estrutura do complexo $[Cu(apybmz)(H_2O)]^{2+}$	36
Figura 11. Estrutura do complexo $[Cu(isaepy)H_2O]^+$	36
Figura 12. Estrutura dos tautômeros do complexo $[Cu(isapn)]^{x+}$	36
Figura 13. Roteiro de síntese para o composto 1.....	40
Figura 14. Roteiro de síntese para o composto 2.....	43
Figura 15. Roteiro de síntese para o composto 3.....	44
Figura 16. Espectro Infravermelho do composto 1, $[Cu(isaenim)]$	49
Figura 17. Espectro Infravermelho do composto 2, $[Cu(isabmz)(H_2O)]$	49
Figura 18. Espectro Infravermelho do composto 3, $[Cu(apybmz)(H_2O)]$	50
Figura 19. Espectro EPR do composto 1, $[Cu(saenim)]$, em solução de DMSO, a 77K.....	52
Figura 20. Espectro EPR do composto 2, $[Cu(isabmz)(H_2O)]$, em solução de DMSO, a 77K.	53
Figura 21. Espectro EPR do composto 3, $[Cu(apybmz)(H_2O)]$, em solução de DMSO, a 77K.	54
Figura 22. Espectro UV/Vis do composto 1, $[Cu(isaenim)]$, em solução de DMSO.....	56
Figura 23. Espectro UV/Vis do composto 2, $[Cu(isabmz)(H_2O)]$, em solução de DMSO...	57
Figura 24. Espectro UV/Vis do composto 3, $[Cu(apybmz)(H_2O)]$, em solução de DMSO..	58
Figura 25. Estruturas otimizadas para as formas ceto e enol do composto 1.	59
Figura 26. Estruturas otimizadas para as formas ceto e enol do composto 2.	60
Figura 27. Estrutura otimizada para o composto 3.	60

Figura 28. Reação de redução do MTT a Formazan.	65
Figura 29. Estrutura dos compostos estudados anteriormente no grupo quanto à atividade tripanocida.....	66
Figura 30. Ilustração da placa de cultura 24 poços.	69
Figura 31. Curva padrão para a resposta da medida de absorbância ao variar a concentração de parasitas.....	73
Figura 32. Exemplo de imagem feita com microscópio de fluorescência. N indica o núcleo das células hospedeiras. As setas indicam a presença de parasitas T. cruzi em sua forma amastigota, próximos ao núcleo dessas células (setas menores) ou já ocupando todo o seu citoplasma (seta maior).	86
Figura 33. Microscopias de fluorescência com a linhagem Fibroblasto P4, marcado com A) DAPI e B) Anticorpos anti-tripanosossoma.....	87
Figura 34. Microscopia de Fluorescência para o composto 1, concentrações de 10 a 3,5 μM	90
Figura 35. Microscopia de Fluorescência para o composto 1, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.	91
Figura 36. Taxa de infecção para o composto 1, determinada por contagem em Photoshop.....	92
Figura 37. Microscopia de Fluorescência para o composto 2, concentrações de 10 a 3,5 μM	94
Figura 38. Microscopia de Fluorescência para o composto 2, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.	95
Figura 39. Taxa de infecção para o composto 2, determinada por contagem em Photoshop.	96
Figura 40. Microscopia de Fluorescência para o composto 4, concentrações de 10 a 3,5 μM	98
Figura 41. Microscopia de Fluorescência para o composto 4, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.	99
Figura 42. Taxa de infecção para o composto 4, determinada por contagem em Photoshop.....	100
Figura 43. Microscopia de Fluorescência para o composto 5, concentrações de 10 a 3,5 μM	102
Figura 44. Microscopia de Fluorescência para o composto 5, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.	103
Figura 45. Taxa de infecção para o composto 5, determinada por contagem em Photoshop.....	104
Figura 46. Forma reduzida T(SH) ₂ (A) e oxidada TS ₂ (B) da tripanotona, ou N1, N8-bis(glutathionil)espermidina.....	110
Figura 47. Esquema de reação da enzima tripanotona redutase em tripanossomas....	110
Figura 48. Estrutura de inibidores peptídicos da tripanotona redutase (TR), presente em T. cruzi.....	111

Figura 49. Estrutura da cruzaina ligada a um inibidor α -cetoester ¹¹²	112
Figura 50. Estrutura tridimensional da cruzaina, (A) cristalizada com um derivado vinil-sulfona, depositada no PDB (Protein Data Bank) sob código 1F2C; (B) Representação esquemática em duas dimensões de seu modo de ligação; (C) Estruturas de dois derivados inibidores ¹¹⁴	112
Figura 51. Estruturas de compostos derivados de indolamina contendo grupamentos quinolina, pirimidina ou imidazol, com boa atividade anti-tripanosossoma baseada na inibição da proteína cruzaina ¹¹⁶	114
Figura 52. A) Gráfico de Michaelis-Menten para inibição com o complexo [Cu(isaenim)] (1); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus concentração do inibidor. Em A e B: ○→ controle; ●→ 10uM; □→ 20uM; ■→ 30uM; △→ 45uM.	120
Figura 53. A) Gráfico de Michaelis-Menten para inibição com o complexo [Cu(isapn)] (5); B) Gráfico dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação versus concentração do inibidor. Em A e B: ○→ controle; ●→ 10uM; □→ 20uM; ■→ 30uM; △→ 45uM.	122
Figura 54. A) Gráfico de Michaelis-Menten relativo ao composto [Zn(isapn)] (6); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus concentração do inibidor; D) Gráfico 1/K inclinação versus concentração do inibidor. Em A e B: ○→ controle; ●→ 4uM; □→ 6uM; ■→ 10uM; △→ 15uM.....	123
Figura 55. A) Gráfico de Michaelis-Menten referente ao ligante livre isapn (7); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus [isapn]; D) Gráfico 1/K inclinação versus concentração do inibidor. Em A e B: ○→ controle; ●→ 25uM; □→ 45uM; ■→ 60uM; △→ 90uM.	125
Figura 56. Mecanismo proposto para inibição da cruzaina pelos compostos isapn (7) e [Zn(isapn)](ClO ₄) ₂ (6).....	127
Figura 57. Mecanismo proposto pela inibição da cruzaina pelos compostos [Cu(isaenim)]ClO ₄ ·2H ₂ O (1) e [Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ (5).....	128
Figura 58. Mecanismo simplificado representando o mecanismo clássico de competitividade.....	129
Figura 59. Espectrograma do composto 1, Cuisaenim.....	146
Figura 60. Espectrograma do composto 2, Cuisabmz.	146
Figura 61. Espectrogramas do composto 3, Cuapymbz.	147

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atribuição para os espectros FTIR dos compostos estudados.	51
Tabela 2. Parâmetros EPR determinados para os complexos estudados.	55
Tabela 3. Valores de absorvidade molar para as bandas do composto 1.	57
Tabela 4. Valores de absorvidade molar para as bandas do composto 2.	58
Tabela 5. Valores de absorvidade molar para as bandas do composto 3.	59
Tabela 6. Determinação dos valores de IC ₅₀ por Câmara de Neubauer, para os compostos 4 e 5 em tripomastigotas, após 24 e 48h de tratamento, a 37°C.....	66
Tabela 7. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, primeira faixa testada.....	70
Tabela 8. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, segunda faixa testada.....	71
Tabela 9. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, terceira faixa testada.....	72
Tabela 10. Absorbâncias medidas para a curva padrão variando a concentração de tripomastigotas por mL de solução.	72
Tabela 11. Valores determinados de IC ₅₀ após incubação das células modelo, LLCMK2 e Fibroblasto P4, por 24h, a 37°C, com cada um dos compostos de cobre estudados.	74
Tabela 12. Resultados de valores IC ₅₀ dos complexos de cobre estudados frente a forma tripomastigota do T. cruzi, após 24h de incubação, a 37°C.....	75
Tabela 13. Comparação entre os resultados de IC ₅₀ obtidos previamente, em câmara de Neubauer, e recentes, com MTT, após incubação a 37°C por 24h.	78
Tabela 14. Índice de seletividade para diferentes compostos da literatura.....	79
Tabela 15. Disposição das soluções na placa de 24 poços para ensaios com amastigotas.	84
Tabela 16. Condições testadas para plaqueamento em lamínula.	88
Tabela 17. Potencial inibitório (IC ₅₀ *) dos compostos na atividade da cisteíno protease cruzaina. NI = Não Inibe.....	118
Tabela 18. Parâmetros cinéticos de inibição da cisteíno protease cruzaina, por complexos metálicos contendo os ligantes isapn ou isaenim, comparados aos valores de IC ₅₀ * (µM) ou correspondentes potencial inibitório.	126

Introdução

Neste trabalho será feita inicialmente uma introdução sobre a doença de Chagas e os tripanossomatídeos que a causam, assim como de vários dos compostos descritos na literatura como possíveis agentes antichagásicos. Ênfase maior será dada a complexos metálicos com ligantes nitrogenados, especialmente de cobre(II), alvos principais de nossas investigações.

1. A doença de Chagas

Tripanossomatídeos são protozoários patogênicos unicelulares e monoflagelados, encontrados muitas vezes como endoparasitas em diversos organismos, desde plantas, insetos, até mamíferos.¹ São causadores de várias patologias, incluindo doença africana do sono (*T. brucei gambiense*), doença de Chagas (*T. cruzi*) e Leishmaniose (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*). Particularmente, a doença de Chagas² constitui uma importante doença parasitária numa larga faixa endêmica, desde o sul dos USA até a Patagônia, na Argentina, e que tem se disseminado com recentes movimentos de migração humana.³ A doença de Chagas (*American trypanosomiasis*) recebeu esse nome após o trabalho de Carlos Justiniano Chagas, um médico brasileiro que a descobriu e reportou em 1909. São bem estabelecidas a diversidade do genoma do parasita *T. cruzi*, assim como sua multiplicidade de genótipos e fenótipos. Ao longo do tempo, diversas classificações foram propostas, e presentemente 6 diferentes unidades, denominadas *discrete typing units* (DTUs), TcI a TcVI são utilizadas para classificar esses parasitas.⁴

Essas doenças, assim como a dengue, são causa de alta mortalidade e morbidez entre humanos e, entretanto, não têm sido objeto de investimentos significativos por parte da indústria farmacêutica, sendo consideradas doenças tropicais negligenciadas.⁵ Além disso, essas doenças afetam principalmente populações pobres, vivendo em condições sanitárias inadequadas, na África e na América Latina, em zonas rurais isoladas ou favelas urbanas, em contato frequente com vetores propagadores dessas doenças.

Com a globalização e o aumento das viagens internacionais, a doença se propagou rapidamente a outras regiões, antes não afetadas.³ Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* no mundo, sendo responsável por cerca de 10.000 mortes ao ano. No caso da doença de Chagas, o vetor transmissor é um inseto triatomíneo, que se alimenta de sangue, o popular “barbeiro” (vide Figura 1). Usualmente escondido durante o dia, alimenta-se à noite, picando pessoas e diversos outros organismos tais como roedores, gambás, morcegos, cães e outros.

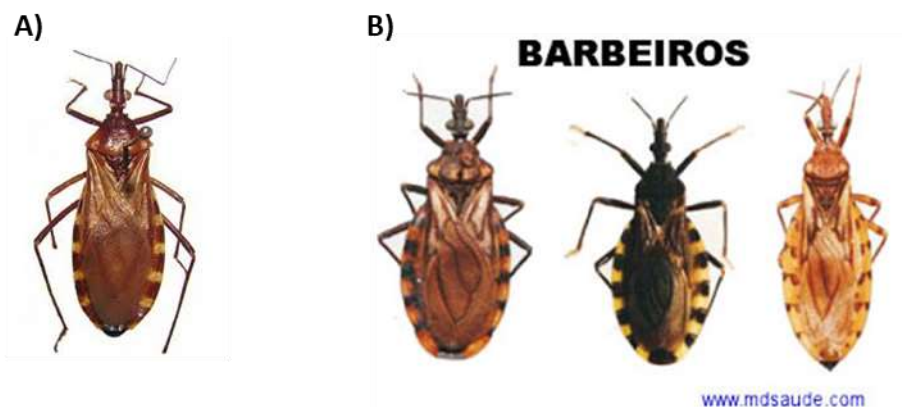


Figura 1. Diferentes triatomíneos⁶. Fonte: <https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/parasitoses/doenca-de-chagas/>.

Atualmente as doenças tropicais negligenciadas englobam cerca de 20 patologias, que afetam mais de 1 bilhão de pessoas, em 149 países. Por isso, já há algum tempo, tem-se um grande incentivo para a investigação e o desenvolvimento de possíveis novos

fármacos para essas patologias e há organismos internacionais fomentando essas investigações, como DNDI (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*).⁶ As estratégias sugeridas incluem interrupção da transmissão vetorial da doença através de principalmente iniciativas intergovernamentais, além de novas terapias para cura dos pacientes afetados, tanto em fase aguda como crônica. Para tanto, têm sido desenvolvidos diversos compostos, por diferentes grupos de pesquisa, na tentativa de obter melhores fármacos. Entretanto, foram poucos os compostos que lograram entrar em testes clínicos.⁷

Um desses compostos é o **posaconazol**, que foi testado clinicamente após mostrar atividade tripanocida em experimentos com modelos murinos, embora seja um composto caro e de difícil preparação. Nesses testes clínicos foram utilizadas doses de posaconazol de 400 mg duas vezes ao dia (teste com alta dose) ou 100 mg duas vezes ao dia (teste com dose baixa), em comparação com pacientes tratados com benznidazol, numa dose de 150 mg igualmente duas vezes ao dia. Em todos os testes os compostos foram administrados por 60 dias. Entretanto, tanto o benznidazol como o posaconazol ocasionaram efeitos adversos. Com benznidazol, 5 pacientes (de um total de 78 pacientes) tiveram dermatite alérgica. Pacientes tratados com posaconazol tiveram aumento relevante nos níveis das proteínas aminotransferase e fosfatase alcalina, o que impediu seu uso farmacológico.⁸

Um estudo interessante usou a metodologia de reposicionamento de fármacos (*repurposing of drugs*), com o objetivo de diminuir o tempo necessário para o desenvolvimento de um novo fármaco, usualmente mais de 10 anos. A partir de uma biblioteca de 963 compostos já testados clinicamente para outros propósitos, foram identificados alguns compostos que mostraram efeitos significativos no crescimento e

viabilidade de parasitas *T. cruzi* e que poderiam ser pontos de partida para futuro desenvolvimento de fármacos mais eficientes. Nesses estudos foram considerados promissores os compostos: Clemastine, Azelastine, Ifenprodil, Ziprasidone e Clofibrate (vide Figura 2). Destes, ziprasidone é um derivado oxindólico.

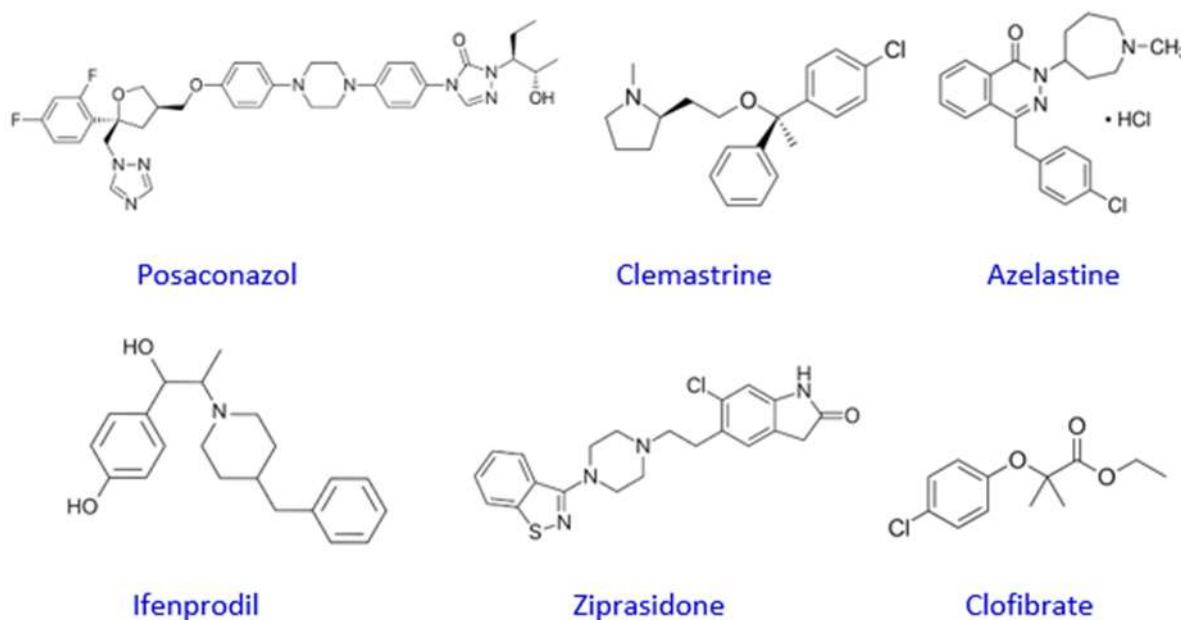


Figura 2. Derivados testados como agentes promissores antichagásicos⁹.

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos causadores da doença de Chagas envolvem um inseto triatomíneo hematófago, um vertebrado hospedeiro e diferentes formas do parasita: epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas presentes no vetor, tripomastigotas localizados no sangue de infectados e amastigotas, que se situam e proliferam dentro das células do mamífero (vide Figura 3). São verificadas 4 etapas em seu desenvolvimento: duas replicativas (amastigotas e epimastigotas), uma tripomastigota metacíclica não-replicativa e uma de disseminação (tripomastigota).¹⁰

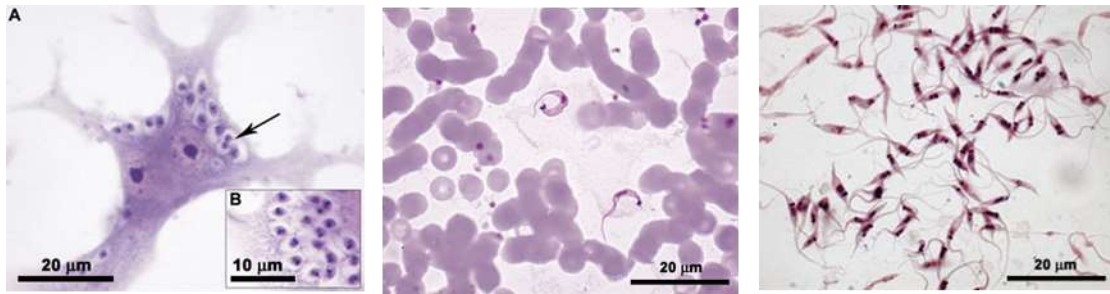


Figura 3. Formas amastigotas (A, B), tripomastigotas sanguíneas (C) e epimastigotas (D) do parasita *Trypanosoma cruzi*. Imagens: Tércia Ulisses de Carvalho, Estudo de microscopia óptica, Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro - <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>

O ciclo de vida do parasita pode ser descrito de forma simplificada como: a forma tripomastigota é ingerida pelo inseto ao picar um indivíduo infectado e se diferencia na forma epimastigota, que então prolifera no tubo digestório do vetor, diferenciando-se na parte final do intestino numa forma tripomastigota metacíclica. Essa forma é transmitida a um vertebrado, pela picada do inseto, ao receber transfusão de sangue contaminado ou pela ingestão de alimento contaminado. A forma tripomastigota infecta diferentes tipos de células do hospedeiro e sofre diferenciação para a forma amastigota, intracelular, que então prolifera no citoplasma e se transforma em tripomastigotas, liberadas no sangue após o rompimento da célula. Estas formas podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo inseto durante seu repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo. Desse modo a doença é disseminada.

Em humanos não tratados, os sintomas característicos da fase aguda são, febre prolongada, dor de cabeça, fraqueza intensa e inchaço no rosto e pernas, e podem persistir por cerca de 2 meses. Na fase crônica, os pacientes são em geral assintomáticos, mas cerca de 20% deles desenvolvem sintomas característicos de problemas cardíacos, como insuficiência cardíaca, problemas digestivos, como megacolon e megaesôfago ou ainda problemas neurológicos.

Atualmente há dois fármacos aprovados como únicas opções de tratamento para a doença de Chagas, um derivado nitroimidazol, **benznidazol** (Bz), usado há mais de 40 anos e um derivado nitrofurano, **nifurtimox** (Nfx), que entretanto só mostram eficiência em fases agudas da doença (Figura 4).

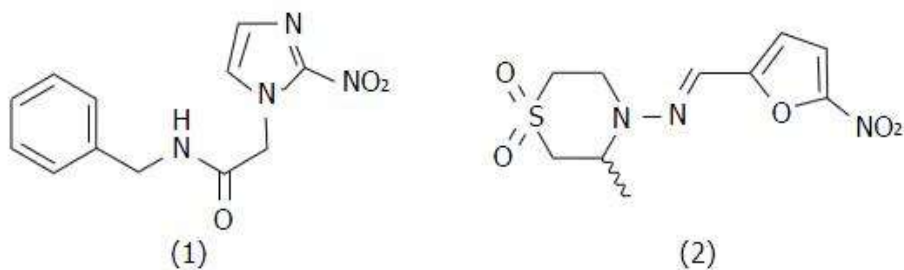


Figura 4. Fármacos utilizados contra a doença de Chagas: benznidazol (1) e nifurtimox (2).

Estudos recentes sobre esses compostos indicam que sua eficácia é baseada na formação de radicais nitro, que danificam o DNA do parasita (vide Figura 5).¹¹ No caso do benznidazol, sua redução através de etapas com dois elétrons também gera espécies radicalares.¹²

Outros estudos também mostraram a ativação de proteínas reparadoras de DNA como estratégia na atividade antichagásica de benznidazol.¹³

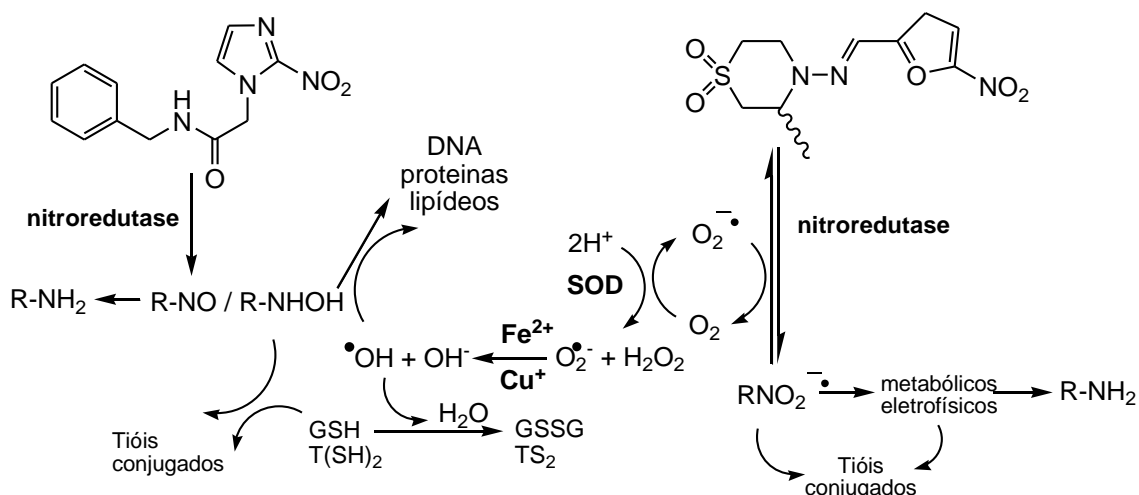


Figura 5. Mecanismos propostos para os fármacos Benznidazol e Nifurtimox, envolvendo enzimas nitroreductases e formação de espécies radiculares¹².

Entretanto, esses compostos apresentam severos efeitos colaterais, como febre, edema generalizado, dores musculares e nas juntas, e polineuropatia periférica.¹⁴ Por esta razão diferentes compostos orgânicos foram testados como potenciais agentes antichagásicos. Além disso, há várias cepas de *T.cruzi* resistentes a benznidazol por exemplo que estão sendo associadas às distintas DTUs.¹⁵

2. Compostos orgânicos como agentes antichagásicos

Alguns outros compostos, de origem natural ou sintética, já foram reportados como agentes tripanocidas, como cetoconazol, itraconazol, alopurinol, e vários derivados nitro-heterocíclicos. Em geral, esses compostos apresentam boa atividade, mas baixa solubilidade em meio aquoso, baixa eficácia ou alta toxicidade.

Tiazóis já foram testados, apresentando atividade anti-tripanosoma acentuada, com valores determinados de IC₅₀ (concentração de composto responsável por causar 50% de morte celular) entre 2 a 13 μM, sendo mais ativos que tiosemicarbonas.¹⁶

Foram capazes de induzir a morte do parasita por processo apoptótico, isto é, morte celular programada. Não foi detectada ação inibitória sobre a cruzaina, uma proteína-alvo de vários estudos e essencial para o parasita *T. cruzi*.

Tiazolidinonas¹⁷ e **5-nitroindazolinonas** também são exemplos de compostos testados com alta atividade tripanocida.¹⁸ Tiazolidinonas também não inibem a cruzaina, principal cisteína protease do parasita, mas alteram a morfologia do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático (ER), produzindo vacúolos citosólicos atípicos e induzindo a morte do parasita por necrose. Protótipos de 5-nitroindazolinonas, por outro lado, apresentam alta atividade e eficiência principalmente contra formas amastigotas, com IC₅₀ na faixa de 3 a 9 µM, em infecções causadas por parasitas classificados segundo as *discrete typing units* (DTUs) como TcII e TcVI.

Outra classe de compostos estudados são as **arilimidamidas**, que apresentaram valores de IC₅₀ muito promissores, na faixa de 50 nM a 2,5 µM contra tripomastigotas e de 20 a 200 nM contra amastigotas, após 24 ou 72h de incubação a 37°C. Os valores para benznidazol obtidos nas mesmas condições foram 12,9 e 2,8 µM, respectivamente.¹⁹ Além disso, o mais ativo desses compostos apresentou boa atividade frente a tripanossomas de diversas cepas do parasita (YuYu, Colombiana e CL, além da Y).

Também merecem destaque **derivados heterocíclicos contendo grupamento N-óxido**, que geram espécies reativas radicalares, responsáveis por sua atividade parasítica e antitumoral.²⁰

Ou ainda **naftoquinonas**, cujo ciclo redox no meio biológico inclui redução a semiquinonas, que na reação com oxigênio molecular são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical hidroxila, causando danos oxidativos. Lapachol, α-lapachona e β-lapachona são exemplos desse tipo de composto, também estudados

como agentes antitumorais, que se mostraram ainda inibidores de topoisomerasas, enzimas responsáveis pela topologia do DNA²¹ (vide Figura 6).

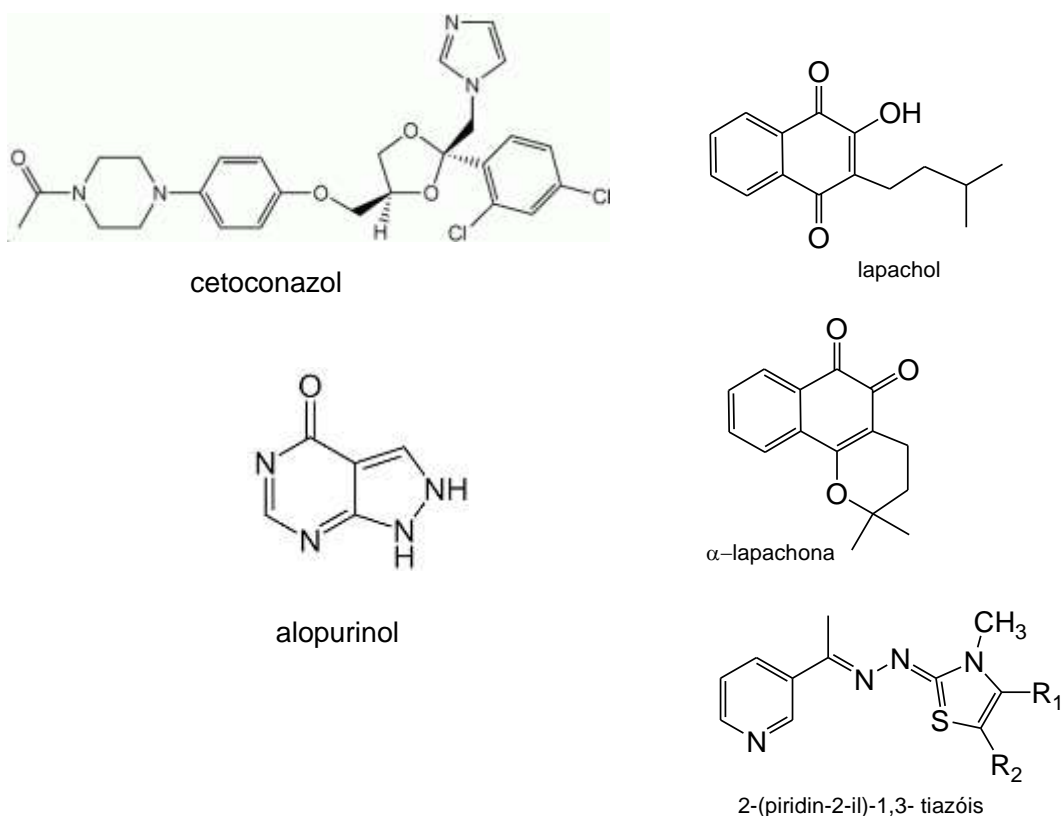


Figura 6. Compostos orgânicos diversos com atividade tripanocida (cetoconazol, alopurinol, tiazóis, tiazolidinonas, entre outros).

Recentemente, um estudo baseado na otimização estrutural de um composto-líder (*hit compound*) levando a derivados de 1,4-naftoquinona foi realizado. A maioria das modificações levaram a uma melhoria da atividade tripanocida, embora algumas tenham levado a maior toxicidade.²²

Investigações sobre a atividade tripanocida de derivados de pirazol-imidazolina e pirazol-tetrahidropirimidina contra formas clinicamente relevantes de *T. cruzi* também foram realizadas. Derivados di-clorados mostraram-se mais ativos que o benzimidazol frente a tripomastigotas e amastigotas. Esses compostos mostraram interação com a cruzipaina, com inibição da atividade cisteína proteinase do parasita. Entretanto, a

substituição do grupamento imidazolina por tetrahidropirimidina levou à perda da atividade antiparasitária.²³

Uma série de derivados híbridos contendo os grupamentos oxindol e triazol foram sintetizados, conforme o esquema na Figura 7. Esses derivados tio- e semicarbazonas são estruturalmente simples e fáceis de serem sintetizados. As tiosemicarbazonas mostraram-se mais ativas que as semicarbazonas e essa atividade parece ser principalmente devida a interações dos compostos com enzimas do parasita e não a etapas de óxido-redução, como no caso de benznidazol.²⁴

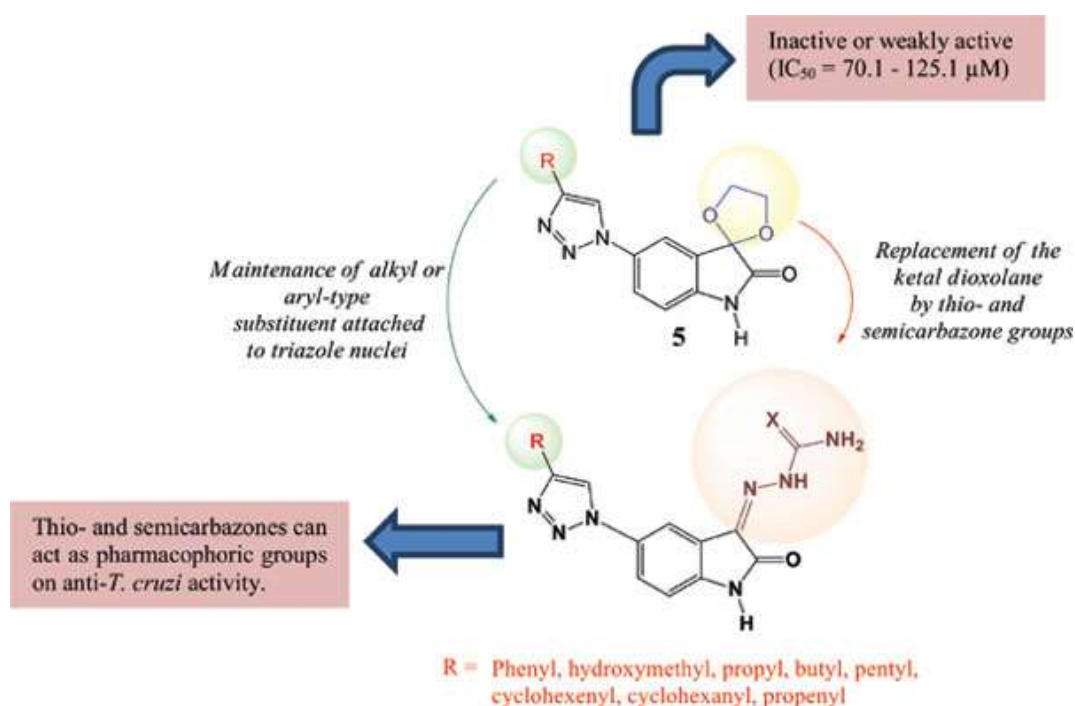


Figura 7. Esquema de derivados híbridos contendo os grupamentos oxindol e triazol (conforme ref. 24).

Apesar dessa ampla diversidade de compostos investigados, é grande a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, com menos efeitos colaterais e com alta eficiência.¹⁰

3. Complexos metálicos como agentes tripanocidas

Na área de Química Inorgânica Medicinal, diferentes complexos metálicos já foram testados e descritos como potenciais fármacos para doenças negligenciadas, particularmente com atividade antichagásica.^{25–29}

Em geral, esses complexos metálicos ou organometálicos compreendem dois tipos: um onde o ligante livre já apresenta atividade tripanocida e outro em que o ligante não é bioativo. Em ambos os casos, procura-se aliar a atividade biológica do ligante ou sua capacidade de reconhecimento molecular com as propriedades inerentes dos metais, ou seja, carga, potencial redox dependente do ligante coordenado, habilidade de se ligar a biomoléculas importantes, como DNA ou proteínas, ocasionando danos ou inibição de atividade.

Dentre os metais presentes nestes compostos merecem especial atenção rutênio^{30,31}, cobre³² e ouro.³³ Esses metais apresentam mais de um estado de oxidação, podendo participar de etapas redox, com formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre os complexos de rutênio merecem destaque os complexos com clotrimazol (CTZ) e cetoconazol (KTZ), que atuam como inibidores esteroidais. Os ligantes CTZ e KTZ também mostraram ação tripanocida acentuada, em complexos com ouro, especialmente quando coordenados simultaneamente a trifenilfosfinas, mostrando grande melhora na atividade em relação aos ligantes livres.

Compostos de **vanádio**, especialmente de vanadila ($V=O^{2+}$) com ligantes polipiridinas, como $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(NN)]$ e $[V^{IV}O(L-2H)(NN)]$, onde NN = bipy, phen, dppz, tdzp, etc., também já foram reportados com boa atividade anti-*T. cruzi*, onde o alvo principal parece ser o DNA, através de intercalação dos complexos.^{34–36}

Complexos de **manganês** também já foram descritos como possíveis agentes tripanocidas. Dois compostos de manganês(II) com ligantes tetradentados baseados em poliaminas (incluindo grupamentos piridinas) mostraram boa atividade contra *T. cruzi*, *in vitro* e *in vivo*, e um deles também inibiu a proteína superóxido dismutase Fe-SOD.³⁷ Como tripanossomas não apresentam catalase, essa proteína Fe-SOD é responsável pelo metabolismo de radicais superóxidos liberados na formação de radicais tirosil pela ribonucleotido redutase³⁸, protegendo o parasita de danos oxidativos. Estudos mais recentes demonstraram que estes compostos também são ativos contra *T. brucei*. Entretanto, não confirmaram a atividade inibitória frente a Fe-SOD. Um dos compostos mostrou-se inativo e o outro apresentou baixa atividade, o que não justifica a toxicidade dos compostos frente a tripanossomas.³⁹

Ainda, compostos de **bismuto e antimônio** também foram descritos como agentes anti-tripanosomas,⁴⁰ atuando como indutores de morte celular por necrose.

Particularmente no caso de complexos de **cobre**, o metal pode ter um papel muito maior do que apenas carregador para os ligantes. O cobre é nutriente muito importante para diversos organismos, e em mamíferos tem uma homeostase bem controlada. Sua principal função no meio intracelular está atrelada à sua capacidade redox, fazendo com que seja parte importante no funcionamento de diversas enzimas e, portanto, essencial para o metabolismo.

Por ser um metal endógeno o **cobre** pode ser assimilado com maior facilidade, atuando também como um eficiente carregador para os ligantes.⁴¹ Quando muda de estado de oxidação, o cobre também altera a geometria de suas ligações, impactando diretamente em sua esfera de coordenação, podendo alternar entre geometria quadrado

planar e tetraédrica. Essa propriedade possibilitou que complexos de cobre pudessem ser desenvolvidos de acordo com a propriedade que se deseja explorar.

Ligantes que favorecem a conformação quadrado planar podem ser melhores intercaladores, agindo diretamente no DNA como forma de atuação. Já ligantes que levam à geometria tetraédrica ou mais flexíveis podem atuar como inibidores alostéricos, bloqueando diretamente sítios de enzimas importantes para o funcionamento das células no parasita.

Complexos de **cobre** também podem agir como geradores de espécies reativas de oxigênio (EROs)⁴², causando estresse oxidativo no meio intracelular e conseqüentemente induzindo a morte celular, no caso de células infectadas.

Por se tratar de um micronutriente e um metal essencial para a nossa espécie e por ser altamente regulado pelo nosso metabolismo, complexos de cobre podem ser menos tóxicos que outros metais, visto que nosso organismo possui diversas maneiras de lidar com excessos do metal. Em mamíferos, há cerca de 300 proteínas, dependentes de cobre.

É possível encontrar na literatura uma grande diversidade de complexos metálicos propostos para a atividade tripanocida. Assim como uma grande variedade de ligantes que estão sendo estudados visando otimizar a atuação desses potenciais metalofármacos. Muitos dos complexos testados apresentaram excelentes resultados, apresentando valores de IC₅₀ na faixa entre 1 a 10µM, abaixo inclusive dos fármacos comerciais Benznidazol e Nifurtimox.²⁹

Apesar das baixas concentrações de inibição e altos valores de seletividade, muitos dos resultados apresentados na literatura falham em apresentar um protocolo geral de testagem. O principal ponto de divergência frente a amostragem de resultados se deve ao tempo de incubação, com estudos utilizando 24h como tempo padrão, mas podendo

variar até 72h.⁴³⁻⁴⁵ O tempo de incubação pode ser muito impactante, principalmente para os ensaios que utilizam o MTT como ferramenta de medida, pois quanto maior o tempo de incubação, maior a probabilidade de a mortalidade apresentada ocorrer devido à escassez de nutriente no meio de cultura.

Outro ponto que dificulta a comparação de resultados é a variedade de cepas entre as formas do *T. cruzi*, além de muitos estudos utilizarem a forma epimastigota^{46,47} em seus ensaios, por ser menos susceptível a intempéries do ambiente. Porém, esta é a forma não infectante, presente no inseto vetor e os resultados obtidos não podem ser completamente correlacionados com a forma sanguínea tripomastigota.

4. Complexos oxindolímínicos de cobre ou zinco

Há mais de uma década que vimos estudando em nosso laboratório ligantes oxindolímínicos, derivados de isatina, como agentes antitumorais^{3,5,6,42,48-52}.

Como a ação biológica desses complexos envolve estresse oxidativo, com formação de EROs e consequentes danos oxidativos ao DNA e mitocôndria, especialmente através de radicais hidroxil, decidimos testar alguns desses complexos frente a *T. cruzi*. Verificamos que esses complexos, tanto de cobre(II) como de zinco(II), que não tem atividade redox, apresentavam boa atividade tripanocida com índices de seletividade bastante promissores^{53,54}.

Nesta tese, desenvolvemos 3 novos complexos de cobre (II), também com ligantes imínicos, que se mostraram tão ou mais reativos que os anteriormente estudados. Dados comparativos da atividade anti-tripanosoma de 5 compostos são aqui descritos e discutidos, obtidos com metodologia de contagem de parasitas em câmara de Neubauer

e através de testes com MTT. Adicionalmente, foram realizados estudos para identificar possíveis alvos no parasita e elucidar prováveis mecanismos de ação dessa classe de compostos.

Objetivos

O objetivo principal desta tese é avaliar os efeitos de complexos de cobre com ligantes derivados imínicos de oxindóis, especialmente a isatina, frente a diferentes formas do *Trypanosoma cruzi*, parasita responsável pela Doença de Chagas.

Os objetivos específicos são:

- Sínteses de complexos de cobre com ligantes nitrogenados derivados de isatina ou acetilpiridina, obtidos por reação de condensação com aminas escolhidas;
- Caracterização dos complexos sintetizados via diferentes técnicas como Espectroscopia UV/Visível, Análise Elementar, Espectroscopia de Infravermelho, Espectroscopia EPR e Espectrometria de Massas;
- Ensaio de viabilidade celular dos compostos sintetizados, bem como de ligantes livres e de compostos já conhecidos do grupo frente a forma tripomastigota do *T. cruzi*, via metodologia MTT;
- Ensaio de viabilidade celular dos compostos estudados via MTT frente a linhagens de células de hospedeiros, como Fibroblasto P4 e LLCMK2;
- Avaliação por ensaios de Microscopia de Fluorescência de efeitos dos compostos estudados sobre a forma amastigota do *T. cruzi*;
- Estudos do possível efeito inibitório de alguns dos compostos estudados frente a uma das principais cisteíno proteases do *Trypanosoma cruzi*, a cruzaina;

Capítulo 1

Síntese e Caracterização dos Complexos Metálicos

1.1 Considerações Iniciais

Em estudos anteriores sobre atividade antiparasitária envolvendo complexos oxindolimínicos em nosso laboratório, haviam sido testados 4 complexos, sendo dois de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, e dois análogos de zinco(II), $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, assim como os respectivos ligantes, *isaepy* e *isapn*⁵⁴. Esses ligantes são do tipo base de Schiff, obtidos a partir de um oxindol, isatina, e diferentes aminas, capazes de formar espécies bastante estáveis com diferentes íons metálicos. No caso do cobre, esses ligantes conseguem estabilizar ambos os estados de oxidação do metal presentes no meio biológico, facilitando um ciclo catalítico em que espécies reativas de oxigênio são provavelmente formadas.

Na presente tese de doutorado, pretendeu-se então desenvolver novas investigações, preferencialmente com compostos mais ativos frente a parasitas *T. cruzi*, visando também elucidar seus possíveis alvos e modos de ação no meio biológico.

O primeiro composto escolhido para esta finalidade foi o $[\text{Cu}(\text{isaenim})]\text{ClO}_4$, que já havia demonstrado, em estudos anteriores, atividade antitumoral, causando principalmente danos oxidativos ao DNA^{54,55}. Foram realizados também estudos com um outro composto, com um ligante mais hidrofóbico, $[\text{Cu}(\text{isambz})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$. Para todos esses compostos citados tem-se duas formas tautoméricas possíveis, a forma ceto e a forma enol, dependendo do pH da solução. A forma ceto predomina a baixos pHs (3 a 5) e a forma enol a pHs mais elevados (8 a 10). Deste modo, alguns dos complexos foram isolados na forma ceto e outros na forma enol, dependendo do pH utilizado na etapa de metalação. Foram desenvolvidas ainda investigações com um composto sem o

grupamento oxindólico proveniente da isatina, $[\text{Cu}(\text{apybmz})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$, para efeito de avaliação da influência de diferentes grupamentos no ligante.

Foram ainda incluídos em nossas investigações os dois complexos de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$, anteriormente estudados em nosso laboratório⁵⁴, para comparação de suas reatividades com a dos novos complexos. Todos os derivados de isatina apresentam equilíbrio ceto-enólico, conforme mostrado nas Figuras 8 a 12 abaixo.

(I) Composto $[\text{Cu}(\text{isaenim})]\text{ClO}_4$

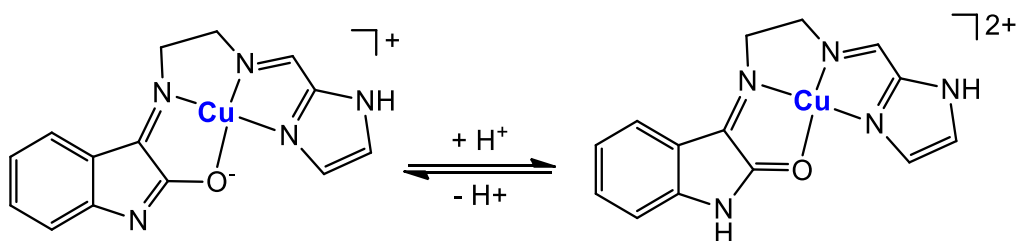


Figura 8. Equilíbrio ceto-enólico para o complexo $[\text{Cu}(\text{isaenim})]^{+2+}$.

(II) Composto $[\text{Cu}(\text{isabmz})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$

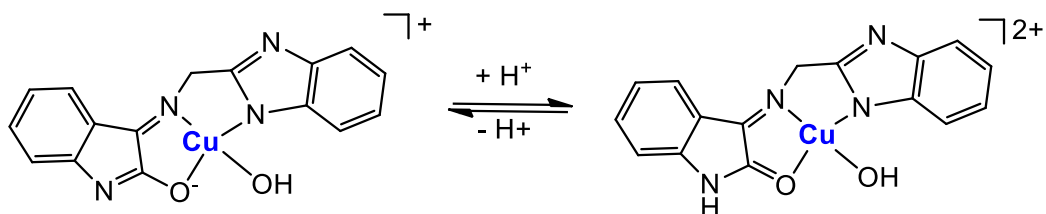


Figura 9. Equilíbrio ceto-enólico para o complexo $[\text{Cu}(\text{isabmz})(\text{H}_2\text{O})]^{+2+}$.

(III) Composto $[\text{Cu}(\text{apybmz})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$

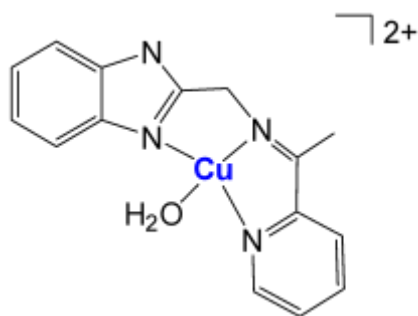


Figura 10. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{apybmz})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

(IV) Composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})\text{H}_2\text{O}]\text{ClO}_4$

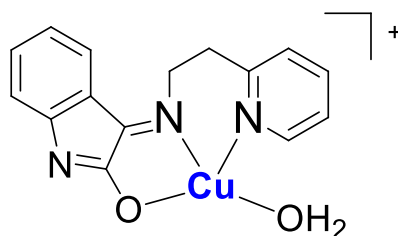


Figura 11. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})]^+$.

(V) Composto $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$

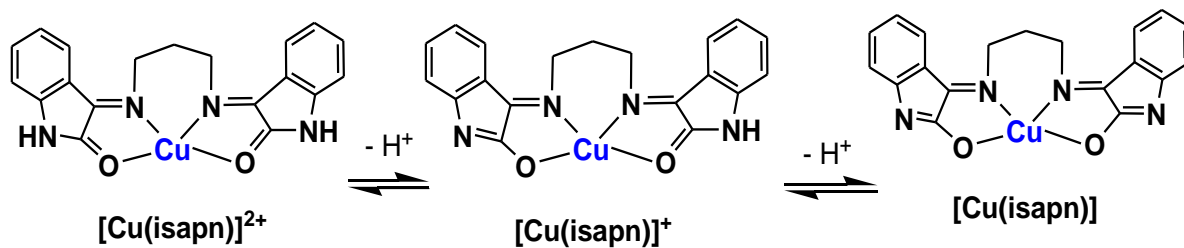


Figura 12. Estrutura dos tautômeros do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{x+}$.

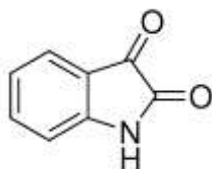
1.2 Parte Experimental

As sínteses dos ligantes descritas nesse capítulo foram realizadas em pHs entre 5 e 6, para favorecer a formação da ligação imínica. Posteriormente, procedeu-se à metalação *in situ* dos ligantes preparados, usando perclorato de cobre(II). Como visto anteriormente, nessa faixa de pH é esperado que os derivados de isatina se encontrem tanto na forma ceto como na forma enólica. Portanto, a caracterização dos compostos baseados nesse precursor levará em conta a possibilidade da formação predominante de uma espécie ou de misturas das duas formas estarem presentes em solução, ou mesmo no sólido isolado.

1.2.2 Precursores utilizados

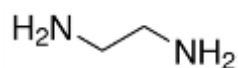
Isatina ($C_8H_5NO_2$), Sigma-Aldrich; 97%

MM: 147,13g/mol



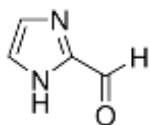
Etilenodiamina ($NH_2CH_2CH_2NH_2$), Sigma-Aldrich; P.A.

MM: 60,10g/mol



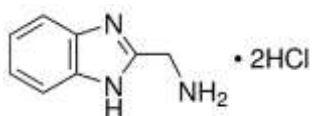
Imidazol-2-carboxaldeído ($C_4H_4N_2O$), Sigma-Aldrich; 97%

MM: 96,09g/mol



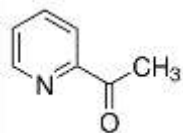
2-(aminometil) benzoimidazol ($C_8H_9N_3 \cdot 2HCl$), Sigma-Aldrich; 98%

MM: 220,10g/mol



2-Acetilpiridina (C_7H_7NO), Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$

MM: 121,14g/mol



Etanol (CH_3CH_2OH), Sigma-Aldrich; P.A.

MM: 46,07g/mol

Perclorato de Cobre (II) hexahidratado ($Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$), Sigma-Aldrich; 98%

MM: 370,54g/mol

1.2.3 Sínteses dos complexos oxindolimínicos de cobre(II)

1.2.3.1 Síntese do Composto 1 – [Cu(isaenim)]ClO₄·2H₂O

O composto **1** já havia sido previamente sintetizado pelo nosso grupo⁴², porém optou-se por utilizar uma via de síntese distinta daquela já descrita na literatura. A nova rota de síntese escolhida está descrita abaixo.

Para esta síntese foram solubilizados 0,589g (4mmols) de isatina em 20mL de etanol absoluto, num balão de 125mL. O balão foi então acoplado a um condensador e aquecido a 50°C, sob agitação magnética constante, por 20 minutos. Após esse tempo, observou-se que toda a isatina havia se solubilizado formando uma solução laranja, e nesse momento o aquecimento foi desligado. Esse cuidado teve que ser tomado, porque em seguida foram adicionados mais 10mL de etanol ao balão e 300μL (4 mmols) de etilenodiamina, que é bastante volátil e poderia evaporar devido ao vidro quente.

Logo após a adição da etilenodiamina a solução tornou-se rubra. O sistema foi deixado sob agitação, sem aquecimento por mais 20 minutos, quando a solução adquiriu uma coloração amarela. Nesse momento o pH foi medido em 8. Foram adicionadas três gotas de solução ácido perclórico 2M até que o pH do meio fosse ajustado para 6, para favorecer a formação da ligação imínica.

Foram então pesados 1,500g (4mmol) de perclorato de cobre(II), que foram solubilizados em 5mL de água deionizada e adicionados lentamente ao balão. Observou-se a formação de um precipitado escuro logo após a adição do sal de cobre. O pH foi medido novamente, estando entre 5 e 6. Foram, então, adicionadas duas gotas de

hidróxido de sódio 1M para ajustar o pH em 8, para favorecer a espécie enol, e a solução foi deixada sob agitação por mais 20 minutos.

Foram então pesados 0,394g (4 mmols) de imidazol-2-carboxaldeído, solubilizados em 10mL de água deionizada e adicionados ao balão, deixando a solução sob agitação por uma hora. Após esse tempo, a solução foi transferida para um erlenmeyer e deixada em repouso por dois dias. Em seguida, foi filtrada a pressão reduzida e o precipitado foi lavado com etanol gelado. O sólido foi colocado em um dessecador com vácuo, por um dia. O rendimento obtido foi de 39,4% (ou 0,677g, 4mmol), considerando o composto puro na forma enolato.

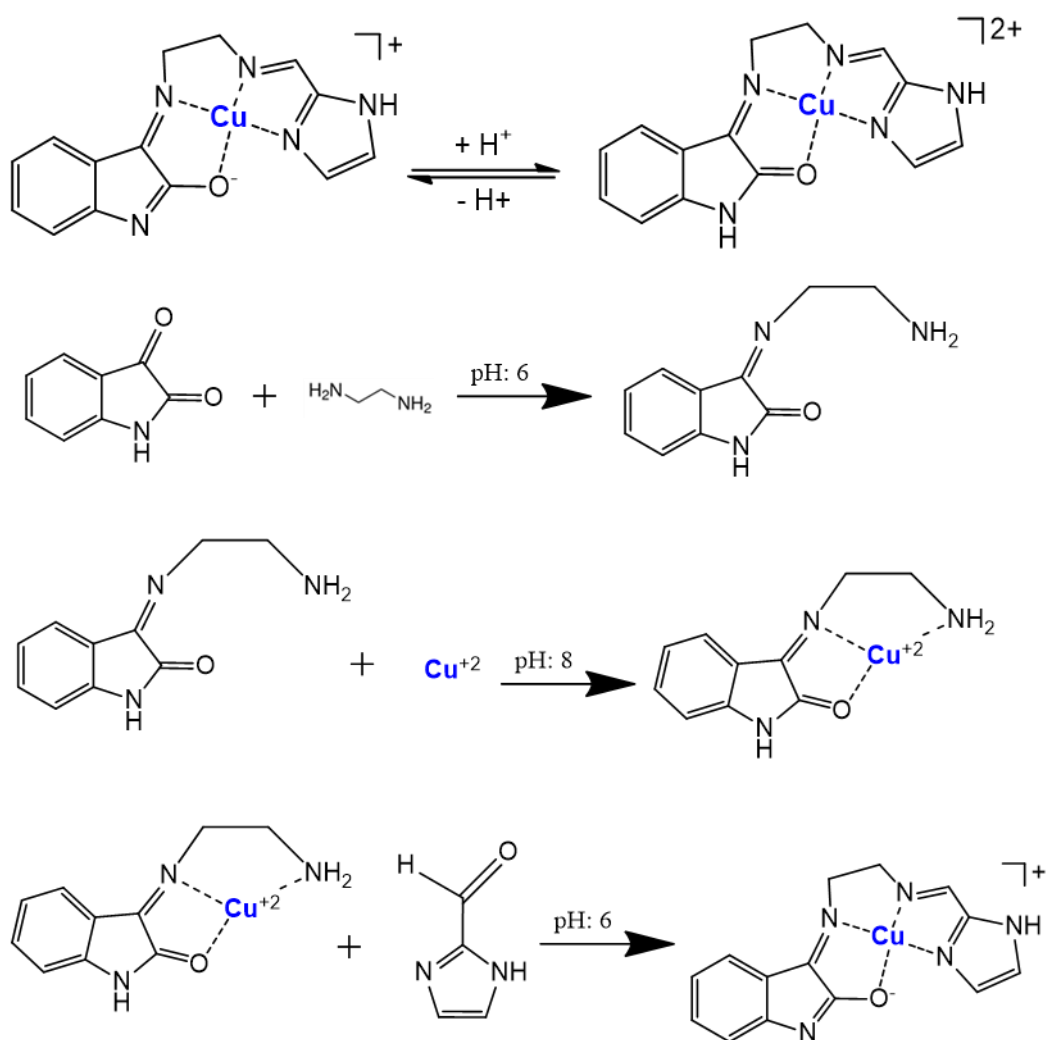


Figura 13. Roteiro de síntese para o composto 1.

A síntese do composto **1** exigiu uma estratégia elaborada, pois para a formação do ligante eram necessárias duas condensações imínicas. Assim, a síntese prévia do ligante demonstrou grande instabilidade, sendo o ligante degradado antes da metalação, resultando em compostos diversos. Para melhorar a estabilidade do ligante, optou-se por fazer a adição do metal após a formação da primeira ligação imínica, estabilizando esta através da coordenação ao íon de cobre, e possibilitando a formação da segunda ligação imínica, com o ligante já coordenado ao cobre, sem que a primeira degradasse. A rota de síntese utilizada está representada na Figura 13 acima. O composto formado é solúvel em DMSO e pouco solúvel em etanol.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{14}H_{12}N_5OCu \cdot H_2O$, MM = 347,04 $gmol^{-1}$, $[C_{14}H_{12}N_5OCu \cdot H_2O]^+$, $m/z = 347,0421$.

Análise Elementar, (**[Cu(isaenim)]ClO₄·2H₂O**), $C_{14}H_{12}N_5OCuClO_4 \cdot 2H_2O$, MM = 465,31 $gmol^{-1}$) = *Calc.* C 36,14/ H 3,47/ N 15,05 %; *Exp.* C 35,58/ H 3,07/ N 14,26 %.

1.2.3.2 Síntese do Composto **2** – **[Cu(isabmz)H₂O]ClO₄**

Foram pesados 0,588g (4 mmols) de isatina que foi transferida para um balão de 125mL. Ao balão foram adicionados 20mL de etanol. O sistema foi colocado em refluxo sob agitação e aquecimento para solubilizar a isatina, obtendo-se uma solução laranja.

Após 10 minutos foram pesados 0,884g (4mmols) de 2-(aminometil)benzimidazol solubilizados em 20mL de água deionizada e adicionados ao balão. O pH foi medido em 3 e logo ajustado para 6, com solução de hidróxido de sódio 1M. O sistema foi deixado sob agitação sem aquecimento por 12 horas e o balão foi fechado com parafilme. Logo após

a adição do 2-(aminometil)benzimidazol a solução ficou vermelho rubro, porém quando o pH foi ajustado para 6 ela ficou ainda mais escura. Após 12 horas formou-se precipitado na solução.

Foram então pesados 0,510g (4 mmols) de perclorato de cobre que foram adicionados diretamente no balão. O pH do meio foi medido em 3 e ajustado para 8, e com isso formou-se um sólido marrom. O sólido foi filtrado e lavado com éter etílico e colocado para secar em dessecador com vácuo.

A síntese do composto **2** foi feita utilizando um leve excesso de metal para favorecer a formação do complexo 1:1. O complexo metálico entre cobre e o ligante isabmz foi estudado anteriormente no laboratório, mas o complexo foi obtido na proporção 2:1 de ligantes para metal, que apresentou baixa solubilidade e baixa eficiência nos ensaios biológicos⁵⁶. Acredita-se que a espécie mais ativa desse composto no meio biológico seja a 1:1, que também é mais solúvel. O composto formado é solúvel em DMSO, muito pouco solúvel em etanol e acetonitrila.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{16}H_{14}N_4O_3Cu$, $MM = 355,84 \text{ g mol}^{-1}$, $[C_{16}H_{14}N_4O_3Cu+H]^+$, $m/z = 356,36$.

Análise Elementar, ($[Cu(isabmz)(H_2O)]ClO_4 \cdot 6H_2O$), $C_{16}H_{12}N_4O_2CuClO_4 \cdot 6H_2O$, $MM = 563,38 \text{ g mol}^{-1}$) = *Cal.* C 34,11/ H 4,29/ N 9,94 %; *Exp.* C 33,46/ H 4,42/ N 9,02 %

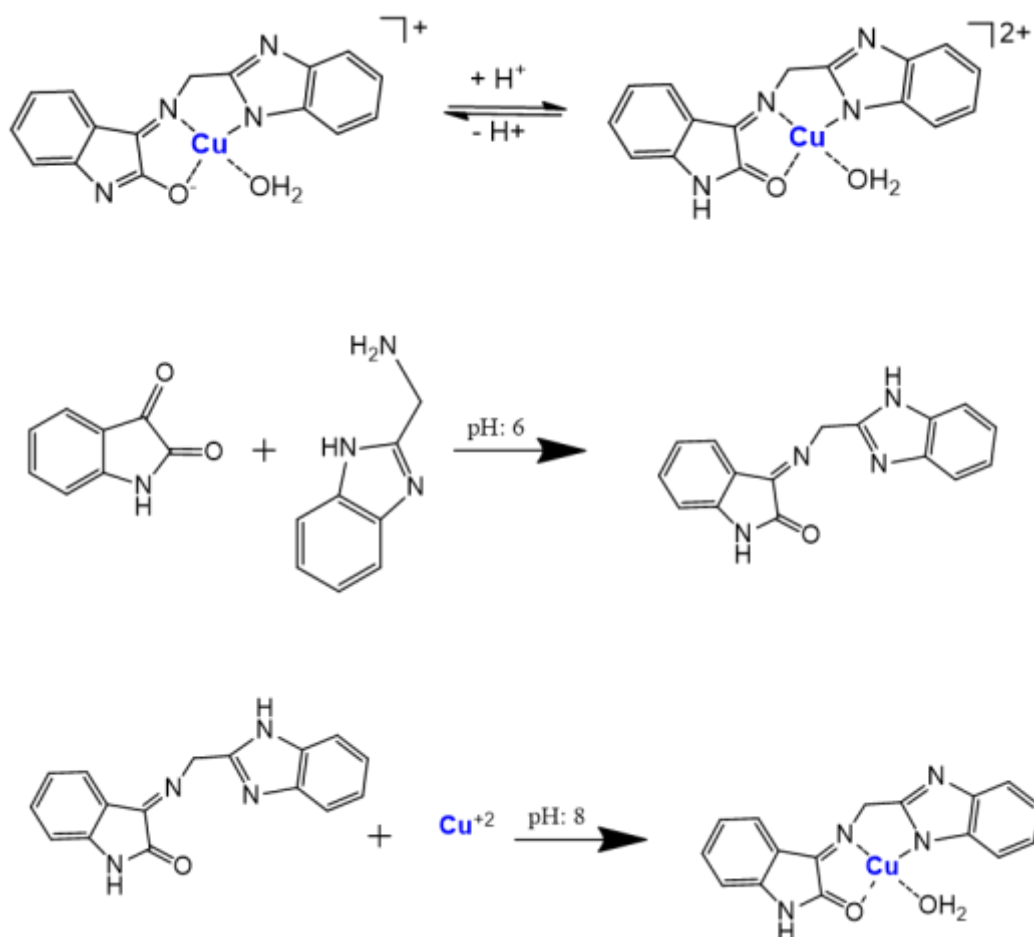


Figura 14. Roteiro de síntese para o composto 2.

1.2.3.3 Síntese do Composto 3 – [Cu(apybmz)]ClO₄

Foram pesados 0,898g (4 mmols) de cloridrato de 2-(aminometil)benzimidazol e dissolvidos em 20mL de etanol, num balão de 125mL. O sistema foi deixado sob agitação e aquecimento brando (50°C), por 20 minutos. Após esse período o reagente não solubilizou. O pH medido era 3, mas mudou para 1 à medida que o sólido se dissolvia. Ajustou-se então o pH do meio com solução de hidróxido de sódio 1M, gota a gota, até 3. O sólido solubilizou-se deixando a solução cristalina e incolor. Adicionou-se então 495μL (4 mmols) de 2-acetilpiridina tornando a solução amarelada e o pH foi novamente medido

em 3. O sistema foi deixado sob agitação, por uma hora. O pH do meio foi então ajustado com a solução de hidróxido de sódio 1M até estar entre 5 e 6. Foram pesados 1,5g (4 mmols) de perclorato de cobre que foram adicionados diretamente ao balão, deixando a solução azul escura. O sistema foi deixado sob agitação por mais uma hora. Após esse tempo formou-se um precipitado azul claro. Não foi possível medir o pH devido à grande quantidade de sólido formado. A solução foi transferida para um erlenmeyer e deixada em repouso na geladeira. Após 12 horas na geladeira a solução aparentava ser um sólido azul esponjoso como um todo, não sendo possível distinguir sobrenadante e precipitado. Foram então adicionados 10mL de etanol ao erlenmeyer e este foi aquecido, solubilizando o sólido esponjoso. Após alguns dias a solução foi filtrada a vácuo e lavada com etanol gelado. Foi possível isolar um sólido azul claro, semelhante ao que havia precipitado durante a síntese. Esse sólido azul foi seco a vácuo e pesado, obtendo-se 1,506g (4 mmols) de composto, indicando um rendimento de 71,0%. O composto formado é solúvel em DMSO, etanol e metanol.

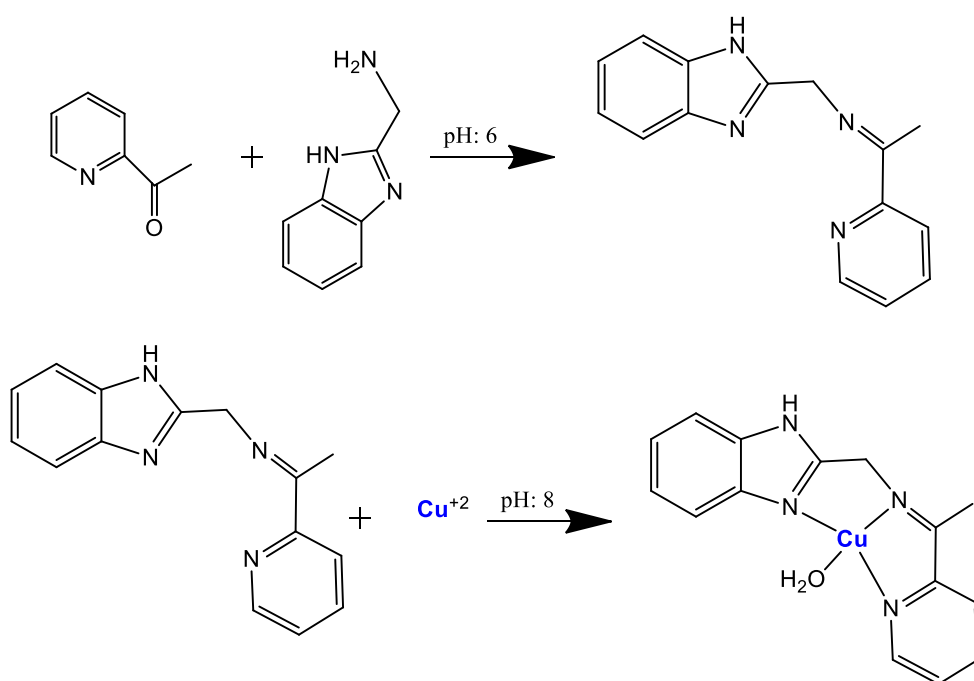


Figura 15. Roteiro de síntese para o composto 3.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $[C_{15}H_{15}N_4OCu]^+$, $MM = 330,85 \text{ g mol}^{-1}$,
 $[C_{15}H_{15}N_4OCu \cdot H_2O]^+$ e $[C_{15}H_{13}N_4Cu]^+$, $m/z = 348,0214$ e $312,0434$. Análise Elementar,
 $[(Cu(apybmz)(H_2O))(ClO_4)_2]$, $C_{15}H_{16}N_4O_9Cl_2Cu$, $MM = 530,96 \text{ g mol}^{-1}$) = *Calc.* C 33,94/ H
 3,04/ N 10,56 %; *Exp.* C 35,78/ H 3,17/ N 10,61 %.

Todas as sínteses mostraram uma correlação aceitável entre os valores obtidos e os calculados para as análises elementares, considerando a estrutura proposta. Diferenças podem ser creditadas à presença de outra forma tautomérica, em menor proporção, no produto isolado. Os complexos **1** e **2** mostraram-se muito higroscópicos, mesmo após secagem a vácuo. O mesmo não foi observado para o composto **3**.

1.2.4 – Dados de Caracterização dos Compostos **4** e **5**.

Os compostos **4** e **5** já haviam sido preparados e caracterizados em outros estudos de nosso grupo e utilizados nestes estudos. Os dados correspondentes são mostrados abaixo⁵⁷.

Composto **4** – **$[Cu(isaepy)H_2O]ClO_4$**

Análise Elementar, $[(Cu(isaepy)(H_2O))(ClO_4) \cdot H_2O]$, $C_{15}H_{16}N_3O_7ClCu$, $MM = 449,31 \text{ g mol}^{-1}$
 = *Calc.* C 40,10/ H 3,59/ N 9,35 %; *Exp.* C 40,73/ H 3,41/ N 9,18 %.

Composto **5** – **$[Cu(isapn)](ClO_4)_2$**

Análise Elementar, $[(Cu(isapn)](ClO_4)_2]$, $C_{19}H_{16}N_4O_{10}Cl_2Cu$, $MM = 594,80 \text{ g mol}^{-1}$) = *Calc.* C
 38,36/ H 2,71/ N 9,42 %; *Exp.* C 39,33/ H 2,88/ N 9,69 %.

1.2.5 Técnicas utilizadas na Caracterização dos Compostos

Preparados

Análise Elementar (CHN)

A análise elementar de cada um dos complexos preparados foi realizada pela Central Analítica do IQ-USP, utilizando um Analisador Elementar Perkin Elmer 2400, series ii.

Espectroscopia UV-Visível (UV/Vis)

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu UV/Vis, modelo 1650, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm.

Espectroscopia Infravermelho (IV)

Todos os espectros obtidos nesta seção foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer – Frontier, pela técnica de pastilha de KBr, junto à Central Analítica do IQ USP.

Espectrometria de Massa (LC-MS)

Todos os experimentos foram conduzidos nas seguintes condições, junto à Central Analítica IQ-USP:

Equipamento: MICROTOF – Bruker Daltonics; Nebulizer: 0.4 Bar; Dry gas: 5 l/min

Temperatura: 200 °C; HV: 4500 V. Modo de aquisição: Positivo

Espectroscopia Paramagnética Eletrônica (EPR)

Espectros EPR foram registrados em espectrômetro Bruker, modelo EMX, operando em banda X, a aproximadamente 9,5 GHz, utilizando cavidade standard ou cavidade ultrasensível. Essas medidas foram feitas no estado sólido e em solução congelada, à temperatura ambiente (298K) e à temperatura do nitrogênio líquido (77K). Para medidas a baixa temperatura foi utilizado um Dewar e tubos de quartzo de 2mm de diâmetro interno, adquiridos da Wilmad. Nas simulações utilizou-se o software Easyspin⁵⁸ da Bruker, em plataforma MatLab.

1.2.6 Otimização das Estruturas dos Complexos por DFT

Os cálculos teóricos para otimização das estruturas dos complexos foram feitos em colaboração com o Dr. Raphael Enoque Ferraz de Paiva, pela metodologia descrita abaixo.

As estruturas dos compostos de cobre(II) foram otimizadas pelo método de *Density Functional Theory* (DFT) através do pacote Orca 4.2^{59,60}. O funcional híbrido PBE0 foi escolhido, em conjunto com a função de base triplo-zeta def2-TZVP. Funções de base auxiliares de Weigend foram utilizadas⁶¹. As estruturas iniciais foram desenhadas com base em informações estruturais obtidas por técnicas espectroscópicas como EPR, UV-Vis e IV. As estruturas otimizadas foram compiladas (*renderized*) com o software Chemcraft 1.8.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Caracterização dos Compostos por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A partir daqui os compostos serão nomeados sem preocupação com as cargas ou contra íons, por exemplo [Cu(isaenim)], [Cu(isaepy)] ou [Cu(isapn)].

Ao utilizar a espectroscopia na região do infravermelho, buscou-se observar bandas em comprimentos de onda característicos relativos a grupos específicos dos compostos sintetizados. Os espectros apresentados a seguir foram obtidos em estado sólido, com pastilha de KBr, em colaboração com a Central Analítica do IQ-USP.

Os espectros obtidos para os compostos **1**, **2** e **3** estão mostrados abaixo, nas Figuras 16, 17 e 18. A Tabela 1 indica as bandas mais relevantes para os complexos sintetizados e suas atribuições.

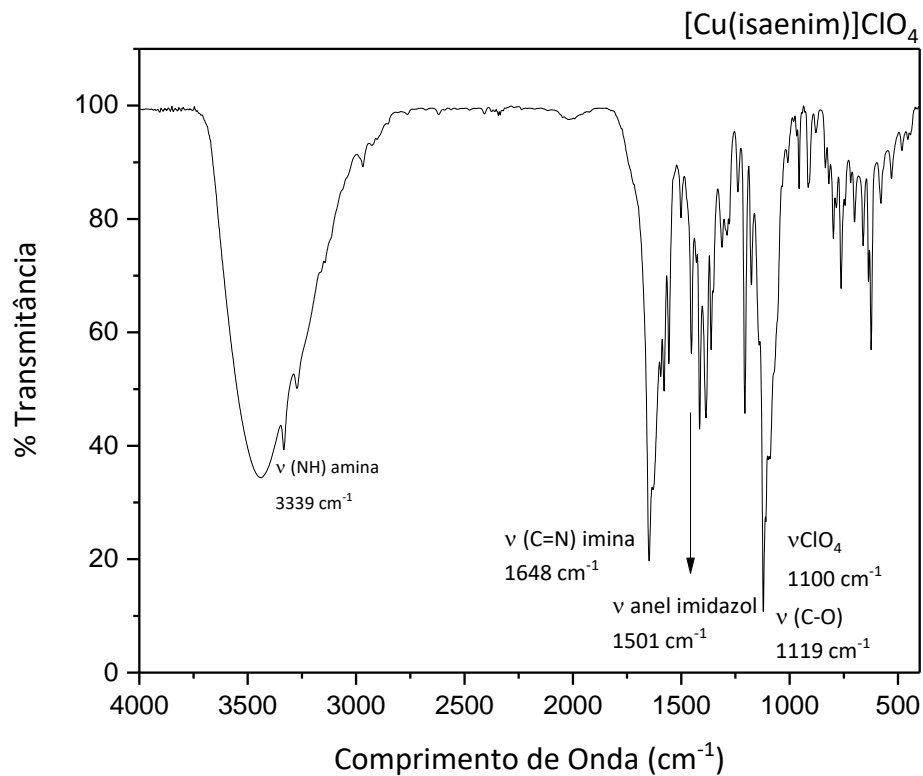


Figura 16. Espectro Infravermelho do composto 1, [Cu(isaenim)].

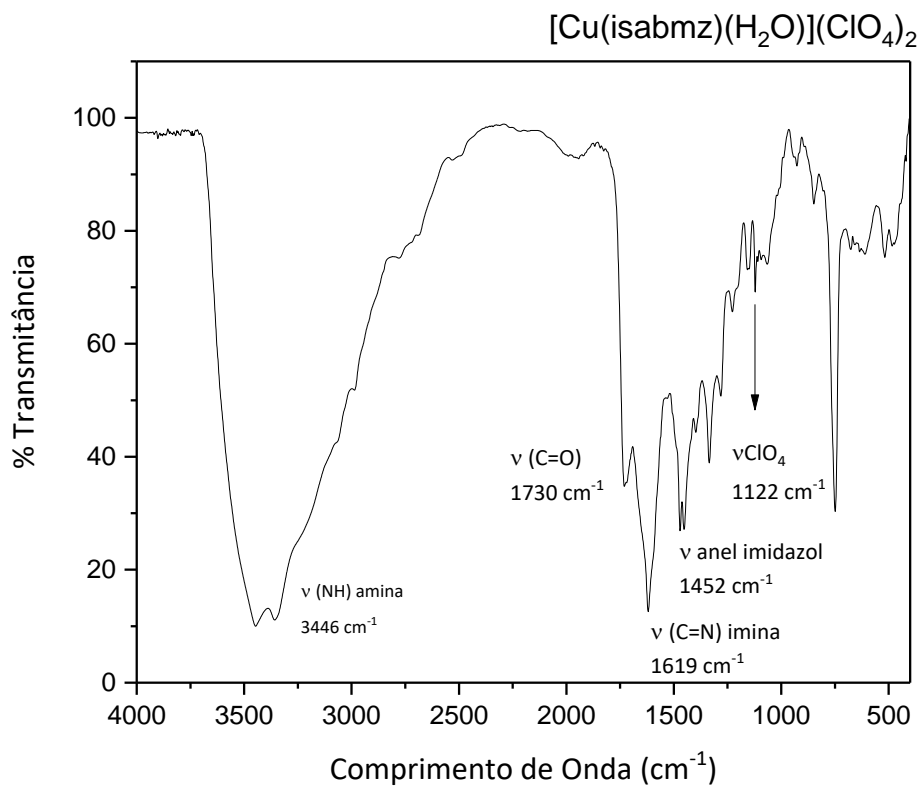


Figura 17. Espectro Infravermelho do composto 2, [Cu(isabmz)(H₂O)].

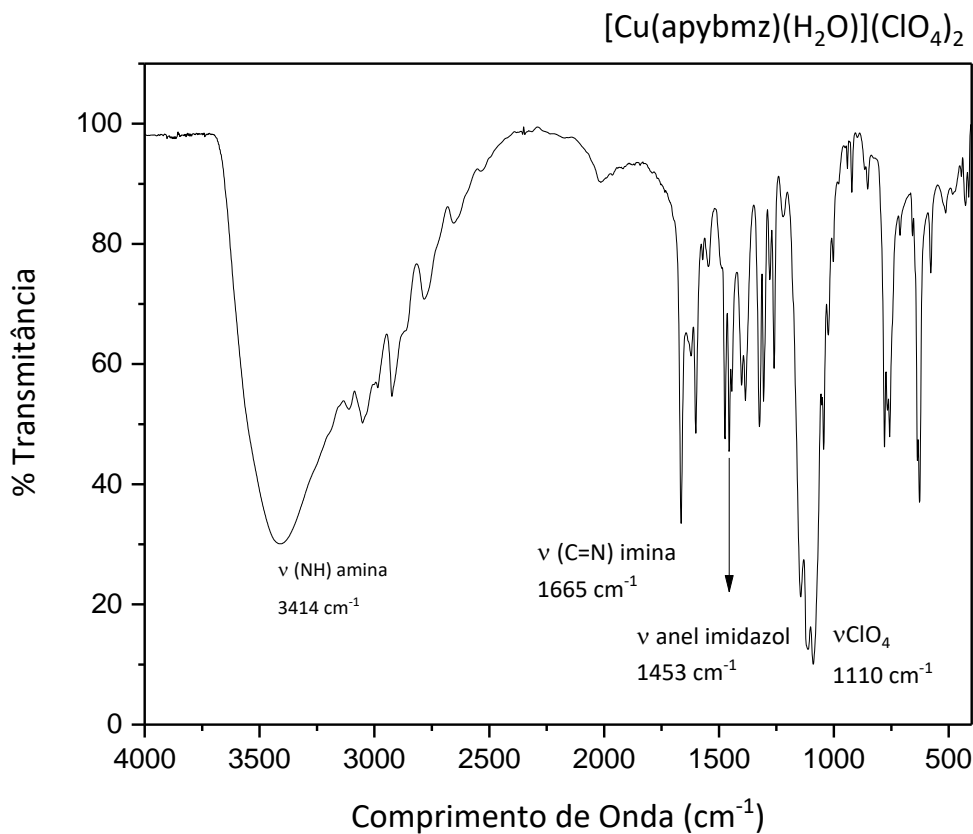


Figura 18. Espectro Infravermelho do composto3, $[\text{Cu}(\text{apybmz})(\text{H}_2\text{O})]$.

Os espectros exibem as bandas relevantes para cada um dos compostos, em especial a banda entre 1520 e 1690 cm^{-1} , característica do estiramento C=N de iminas, que ajuda a identificar a formação da imina, indicando que a síntese do ligante foi bem-sucedida. Por se tratar de sólidos higroscópicos, as bandas na região entre 3000 e 3500 cm^{-1} encontram-se alargadas pela presença de água.

As atribuições para as principais bandas observadas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Atribuição para os espectros FTIR dos compostos estudados.

Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4 ⁵⁴	Composto 5 ⁵⁴	Atribuição
3339 cm ⁻¹	3446 cm ⁻¹	3414 cm ⁻¹			Estiramento N-H
	1730 cm ⁻¹		1731 cm ⁻¹	1731 cm ⁻¹	Estiramento C=O de carbonila
1648 cm ⁻¹	1619 cm ⁻¹	1665 cm ⁻¹	1575 cm ⁻¹	1593 cm ⁻¹	Estiramento C=N da imina formada
1501 cm ⁻¹	1452 cm ⁻¹	1453 cm ⁻¹	1452 cm ⁻¹	1446 cm ⁻¹	Vibração do anel imidazol ⁶²
1119 cm ⁻¹	1122 cm ⁻¹	1110 cm ⁻¹	1091 cm ⁻¹	1097 cm ⁻¹	Perclorato; ClO ₄ ⁴⁸

Como mostrado na Tabela 1, os compostos possuem estruturas semelhantes e suas bandas características estão em regiões próximas. Observa-se que o composto **2** possui além da banda característica de imina, uma banda em 1730 cm⁻¹ característica do estiramento C=O, indicando a presença significativa do isômero ceto na composição do sólido. Essa banda também foi observada no espectro dos complexos **4** e **5**. A banda observada ao redor de 1110 cm⁻¹ é característica de íon perclorato atuando como contra-íon.

1.3.2 Caracterização dos Compostos por Ressonância

Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os espectros mostrados a seguir foram obtidos em solução de DMSO, a 77K, resfriada com nitrogênio líquido.

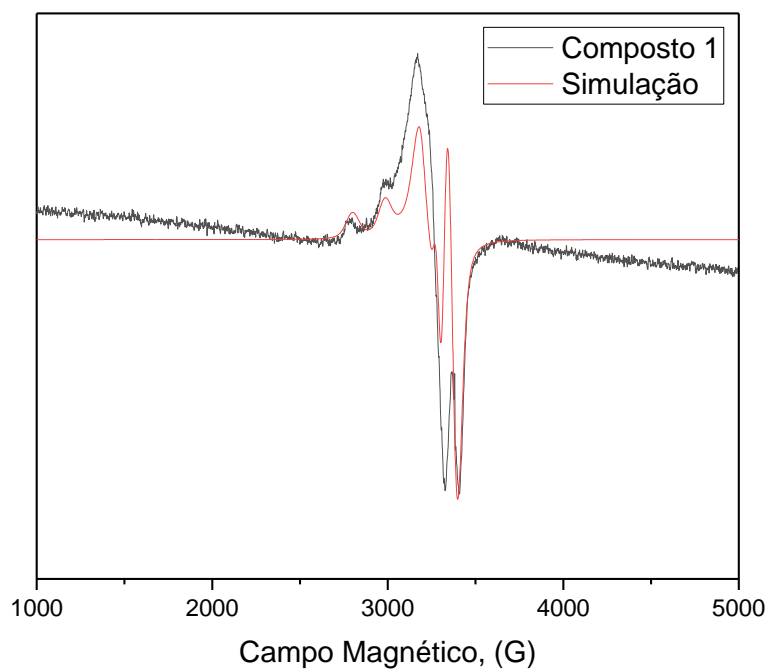


Figura 19. Espectro EPR do composto **1**, [Cu(saenim)], em solução de DMSO, a 77K.

O composto **1** apresentou g_{xy} igual a 2,067 (g_{\perp}), g_z igual a 2,205 ($g_{//}$), com A_z ($A_{//}$) igual a 181G. O ligante isaenim é um ligante tetradentado que dificulta a interação com o solvente. O espectro EPR mostra a presença de hiperfinas características de cobre, indicando que o elétron está mais presente no orbital do metal. Ao aplicar a fórmula semi-empírica de Sakaguchi⁶³, obtém-se uma relação g_z/A_z , com A_z em cm^{-1} , igual a 118, indicando que o cobre no complexo tende a apresentar uma geometria planar.

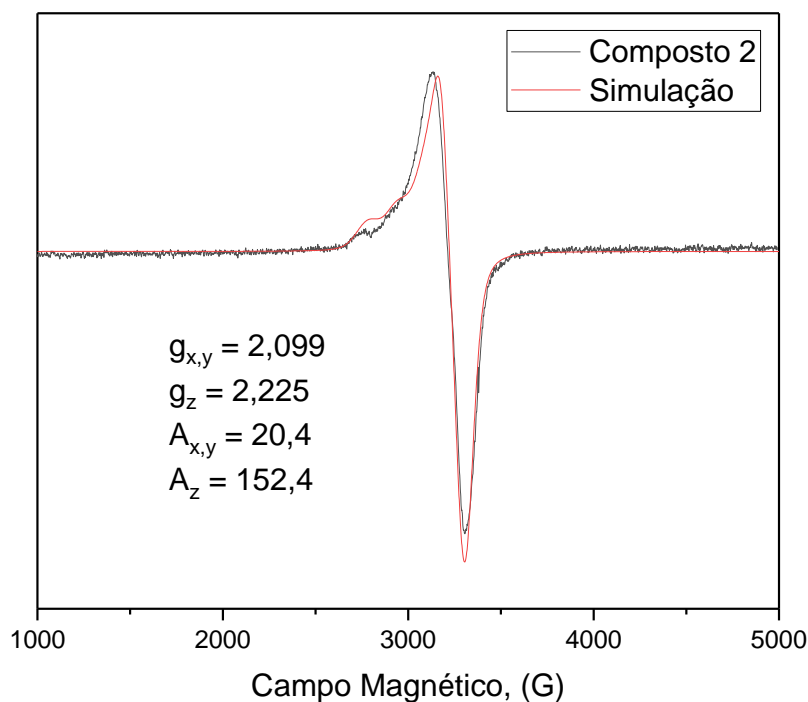


Figura 20. Espectro EPR do composto 2, [Cu(isabmz)(H₂O)], em solução de DMSO, a 77K.

O composto 2 apresentou g_{xy} igual a 2,099, g_z igual a 2,250 e A_z igual a 152G. O ligante isabmz é tridentado, apresentando uma quarta coordenação “livre” no cobre. Como vemos na análise por espectrometria de massa esse quarto sítio de coordenação está ocupado por uma molécula de água, fato que se reflete no alargamento das bandas na região entre 3000 e 3500cm⁻¹ do infravermelho. O sal do composto também se mostrou muito higroscópico.

No espectro EPR deste complexo observa-se a presença de apenas uma espécie, mostrando que o DMSO não consegue deslocar a água que ocupa a quarta coordenação do cobre. É importante ressaltar que apesar do IV apontar a presença das duas formas

tautoméricas ceto e enol no sólido, o espectro EPR foi realizado em solução de DMSO, que pode favorecer uma das formas frente a outra.

O espectro também evidencia uma interação hiperfina mais fraca, indicando uma interação menor do elétron com o cobre. Ao aplicar a fórmula de Sakaguchi, obtemos o valor de 140 para a relação g_z/A_z , indicando que o cobre tem uma geometria tetraédrica distorcida.

A distorção na geometria, juntamente com uma maior delocalização do elétron por uma possível interação com o ligante, podem explicar uma maior estabilidade para a ligação água-cobre, tornando-a menos lábil.

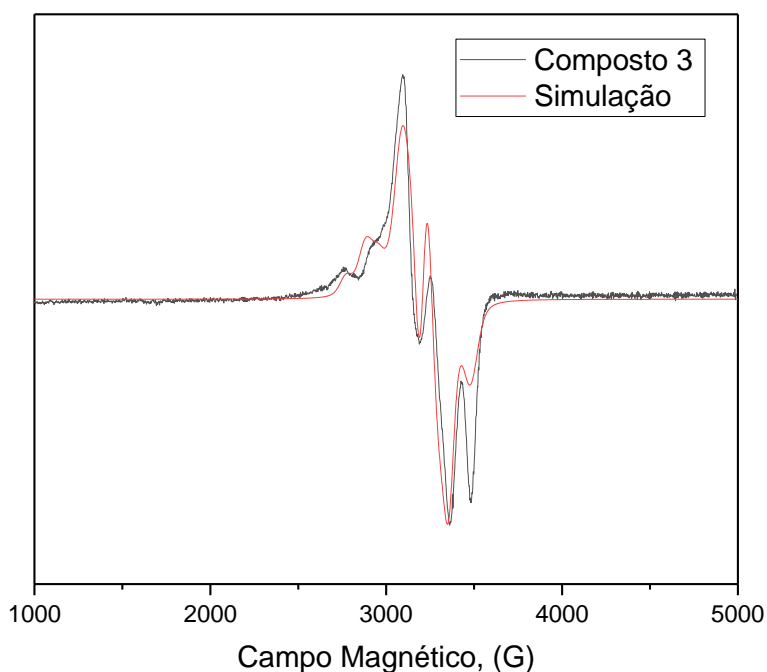


Figura 21. Espectro EPR do composto 3, $[Cu(apybmz)(H_2O)]$, em solução de DMSO, a 77K.

De forma semelhante ao composto 2, o composto 3 também possui um ligante tridentado, propiciando uma quarta coordenação “livre” no cobre. Porém, ao contrário

do composto **2**, no espectro EPR do composto **3** observamos a presença de duas espécies, além de uma interação mais forte entre elétron e metal, evidenciada pela presença de hiperfinas mais destacadas. Ao analisar as duas espécies observam-se valores muito próximos para seus parâmetros. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 2 abaixo. A segunda espécie pode ser explicada pela troca na quarta ligação do cobre, com a entrada de uma molécula de solvente, no caso DMSO, indicando uma maior labilidade dessa ligação.

Utilizando o método de Sakaguchi, os valores para as relações g_z/A_z obtidas para as duas espécies também são próximos, 110 e 116, indicando que a geometria do cobre nas duas espécies é aproximadamente planar.

Para comparação, os dados relativos aos compostos 4 e 5 também foram incluídos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros EPR determinados para os complexos estudados.

Compostos	A_z (G)	g_z	$g_{x,y}$	A_z (10^{-4}cm^{-1})	g_z/A_z (cm)
Composto 1	181,4	2,205	2,067	186,7	118
Composto 2	152,4	2,250	2,099	160,1	140
Composto 3	194,5	2,130	2,099	193,4	110
	183,4	2,220	2,105	190,1	116
Composto 4 ⁵⁷	172,6	2,259	2,065	186,0	121
Composto 5 ⁵⁷	186,5	2,255	2,102	194,0	116

A conversão dos valores de A de Gauss para 10^{-4}cm^{-1} pode ser realizada pela equação 1 mostrada abaixo.

$$A_{//} (10^{-4}\text{cm}^{-1}) = g_{//} \beta A_{//}(\text{G}) = 0,46686 \times 10^{-4} g_{//} A_{//}(\text{G}); \text{ onde } \beta = 1,39969 \text{ MHz/G} \quad (1)$$

1.3.3 Caracterização dos Compostos por Espectroscopia no UV/Visível

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível foi utilizada para determinar os valores de absorvidade molar das bandas características de cada composto. Os espectros foram feitos em solução DMSO, por conta da baixa solubilidade dos compostos. Em alguns casos não foi possível observar a banda referente à transição d-d do metal, pois não foi possível alcançar uma concentração alta para tal.

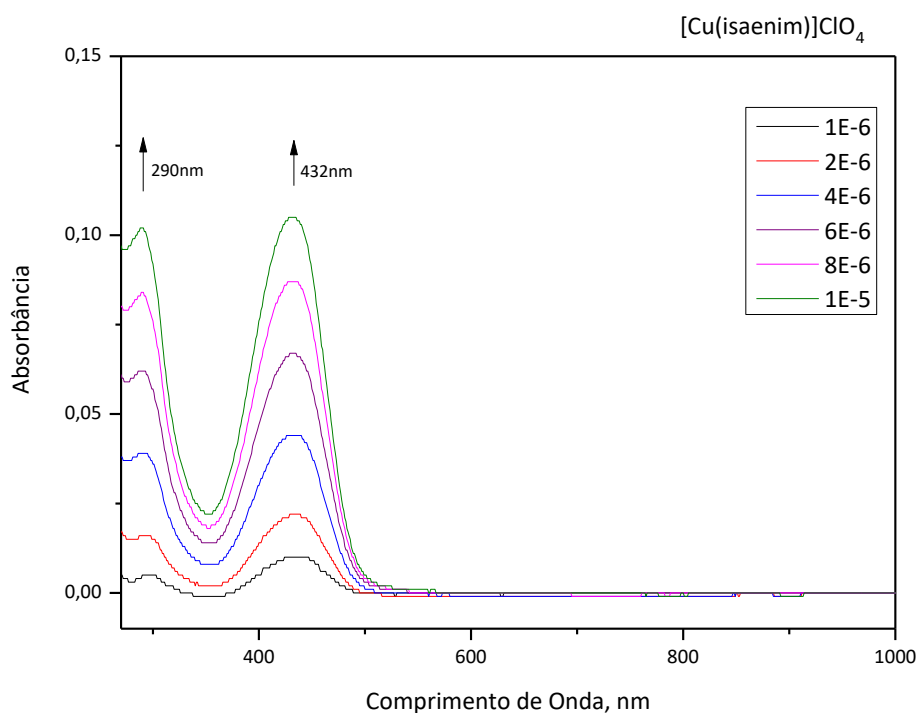


Figura 22. Espectro UV/Vis do composto 1, [Cu(isaenim)], em solução de DMSO.

Os valores de absorvidade molar calculados para as bandas do composto 1 são:

Tabela 3. Valores de absorvidade molar para as bandas do composto 1, em solução de DMSO.

Banda	Absorvidade Molar	Atribuição
290 nm	$1,11 \times 10^4$	IL
432 nm	$1,07 \times 10^4$	TCML

Bandas observadas para esse complexo em solução aquosa foram já descritas em trabalhos anteriores do grupo, referências 36 e 49.

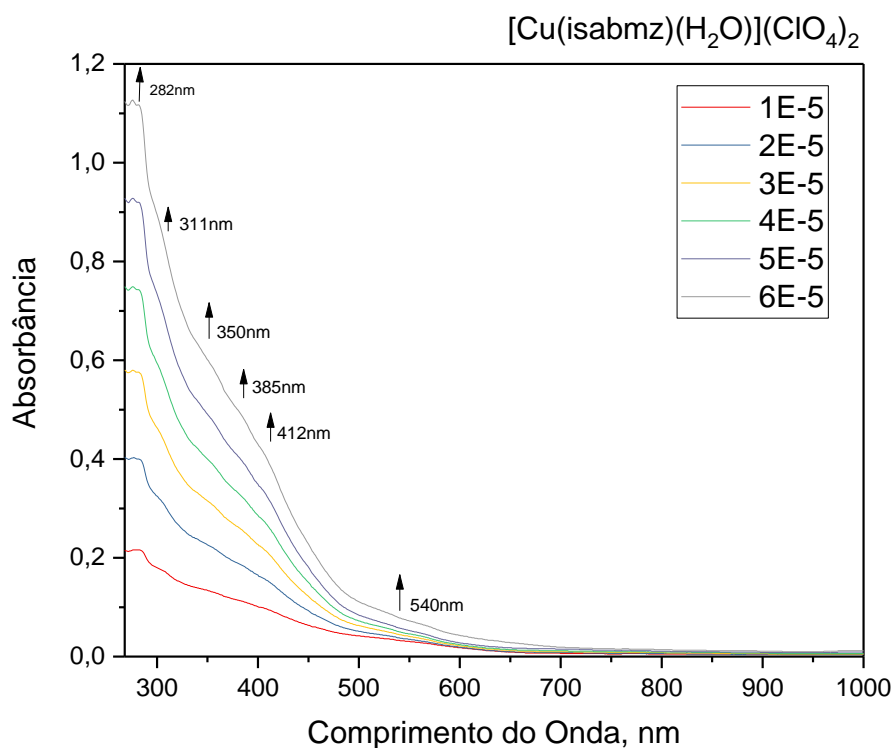


Figura 23. Espectro UV/Vis do composto 2, $[\text{Cu}(\text{isabmz})(\text{H}_2\text{O})]$, em solução de DMSO.

Os valores de absorptividade molar calculados para as bandas identificadas no composto **2** são:

Tabela 4. Valores de absorptividade molar para as bandas do composto 2, em solução de DMSO.

Banda	Absortividade Molar	Atribuição
282 nm	$1,78 \times 10^4$	IL
311 nm	$1,25 \times 10^4$	IL
350 nm	$9,19 \times 10^3$	IL
385 nm	$7,32 \times 10^3$	TCML
412 nm	$5,74 \times 10^3$	TCML
540 nm	$8,31 \times 10^2$	d-d

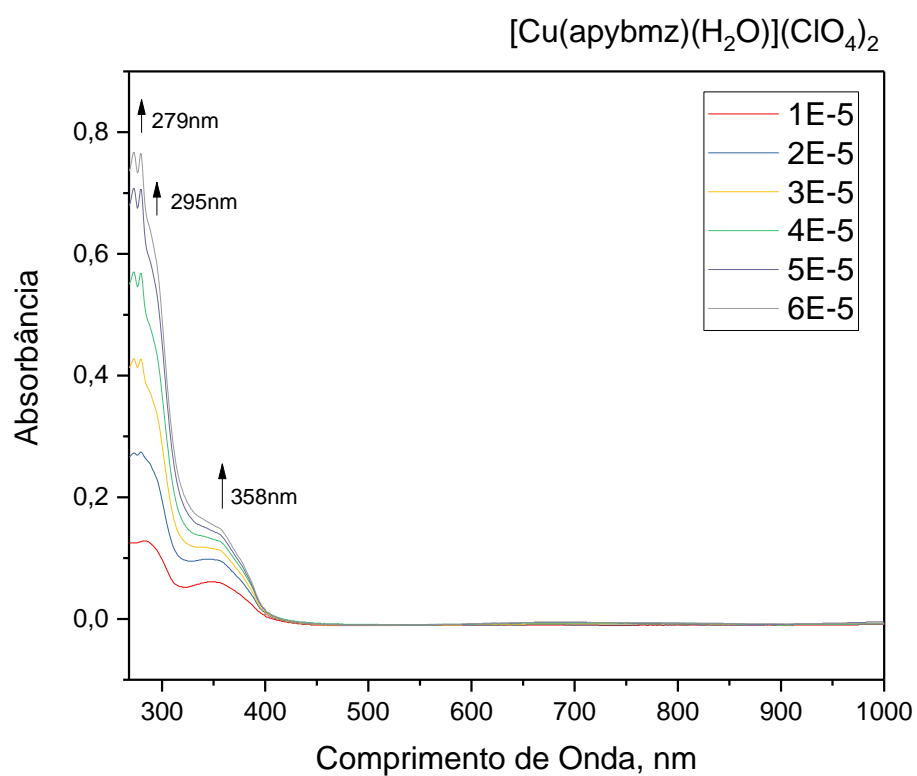


Figura 24. Espectro UV/Vis do composto 3, $[\text{Cu}(\text{apybmz})(\text{H}_2\text{O})]$, em solução de DMSO.

Os valores de absorvidade molar calculados para as bandas identificadas no composto **3** são:

Tabela 5. Valores de absorvidade molar para as bandas do composto 3, em solução de DMSO.

Banda	Absorvidade Molar	Atribuição
279 nm	$1,45 \times 10^4$	IL
295 nm	$1,05 \times 10^4$	IL
358 nm	$1,87 \times 10^3$	TCML

Para todos os compostos foi possível observar apenas as bandas referentes às transições metal-ligante ou transferências internas do ligantes. Mesmo as bandas em 432 nm do composto **1** e 540 nm, que estão na região do visível, correspondem a transições ligante-metal, fato suportado pelo alto valor de suas absorvidades molares.

1.3.4 Otimização das estruturas dos Complexos por DFT

As estruturas otimizadas por DFT podem ser observadas nas imagens abaixo.

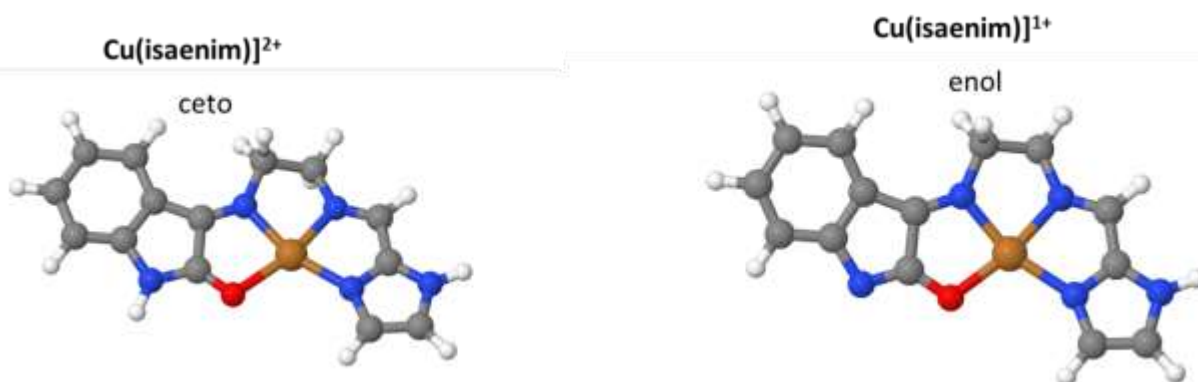


Figura 25. Estruturas otimizadas para as formas ceto e enol do composto 1.

3, com o composto 2 apresentando uma maior distorção tetraédrica em relação aos demais, mas ainda assim apresentando uma alta planaridade.

Os cálculos de DFT são uma otimização quântica das estruturas e funcionam muito bem para a otimização de estrutura, porém eles não levam em consideração fatores que também podem afetar a geometria, como interações intermoleculares e interações com o solvente. Apesar disso, ainda mostraram grande concordância com os resultados obtidos experimentalmente.

1.4 Conclusões

Foram sintetizados três complexos de cobre, a partir da síntese do ligante orgânico, seguida de metalação *in situ*. Os complexos foram caracterizados por análise elementar, espectrometria de massa, espectroscopia UV/Vis e Infravermelho e espectroscopia EPR.

Através da análise elementar e espectrometria de massa foi possível estimar para os complexos **1** e **2**, a forma tautomérica do ligante presente no sólido (enol ou ceto, respectivamente), suportadas pelos espectros de Infravermelho. Por espectroscopia UV/Vis foi possível determinar os valores de absorvidade molar para as transições internas do ligante e de transferência de carga metal-ligante. O complexo **4** foi isolado predominantemente na forma de enolato e o complexo **5**, ao contrário, na forma ceto.

A solubilidade dos complexos foi testada em água, etanol, metanol, DMSO, DMF e acetonitrila. O complexo **1** apresentou solubilidade em DMSO, DMF e Acetonitrila. O complexo **2** apresentou solubilidade apenas em DMSO e o complexo **3** apresentou solubilidade em todos os solventes testados. O composto **2** também se mostrou higroscópico.

Através da obtenção dos parâmetros de EPR, estimou-se a geometria do centro de cobre, baseado nas correlações semi-empíricas de Sakaguchi⁶³. Através do EPR pode-se também verificar a pureza dos complexos, como no composto **3**, onde se observam dois sinais atribuídos à troca de coordenação entre água e DMSO na solução analisada, devido à labilidade da quarta coordenação do cobre no complexo.

Todos os compostos preparados foram isolados e caracterizados pelas técnicas apresentadas e posteriormente tiveram sua reatividade verificada em ensaios biológicos com parasitas *Trypanosoma cruzi* (formas tripomastigotos e amastigotos).

Capítulo 2

Ensaio de Viabilidade Celular em Tripomastigotas

2.1 Considerações Iniciais

O método de viabilidade celular através da redução do reagente MTT é amplamente utilizado na literatura para ensaios *in vivo* (ou *in cellulo*), em estudos sobre citotoxicidade dos mais variados compostos, orgânicos, inorgânicos ou metalados, frente a células tumorais, em comparação com células não-tumorais^{65,66}.

No caso de estudos com parasitas, na literatura é comum encontrar ensaios de viabilidade com *Trypanosoma cruzi* executados de duas formas, com contagem em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer⁶⁶ e por espectroscopia na região do visível, utilizando o chamado teste com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)⁶⁷. No caso da contagem de células viáveis no microscópio, os desafios são maiores, já que os parasitas estão móveis no meio de cultura, e não fixados como nos testes usuais com células.

Em nosso trabalho, optou-se por utilizar preferencialmente o ensaio colorimétrico com monitoramento da redução do MTT pelas vantagens do método, como, por exemplo, maior praticidade na leitura e contagem feita por via espectroscópica e, portanto, com resultados menos dependentes do operador.

Este ensaio consiste na verificação da redução do MTT a formazan pela atividade mitocondrial dos parasitas ainda vivos, segundo a reação abaixo. O formazan tem coloração azul, podendo facilmente ser monitorado espectrofotometricamente ($\lambda = 565$ nm), permitindo que se correlacione a concentração de formazan formada com a quantidade de parasitas vivos no momento da adição do MTT, isto é, após um certo tempo de tratamento com o composto cuja atividade tripanocida quer-se estudar.

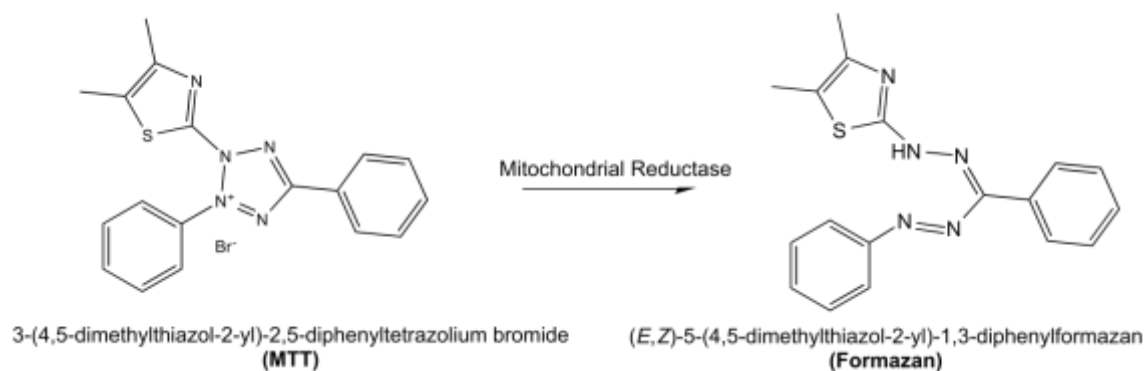


Figura 28. Reação de redução do MTT a Formazan.

A maior dificuldade enfrentada nesta metodologia consiste no fato de as formas tripomastigotas do parasita não serem células aderentes, o que impossibilita a lavagem com o meio de reação durante o ensaio para revelar o MTT. Outros pontos tiveram que ser otimizados, como a concentração de parasitas por mL em cada poço de leitura, volume e concentração de MTT utilizados, volume de SDS para revelar o MTT e tempo de incubação em estufa. Foram adicionados controles para o meio de cultura, pois o meio utilizado possui um indicador de pH (vermelho de fenol) que poderia interferir nas medidas de absorbância.

Os procedimentos apresentados abaixo correspondem aos métodos já otimizados, para determinação das variáveis citadas acima.

Além dos compostos de cobre(II), preparados e descritos no capítulo 1 (compostos **1**, **2** e **3**), também foram avaliados outros compostos preparados em nosso grupo (compostos **4** e **5**), com atividade antiparasitária previamente constatada e testados pelo método de contagem em câmara de Neubauer, com a finalidade de avaliar a diferença entre as técnicas e comparar os possíveis resultados.

Para comparação, utilizou-se os compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ indicados como compostos **4** e **5**, respectivamente. Os dois compostos estão ilustrados abaixo.

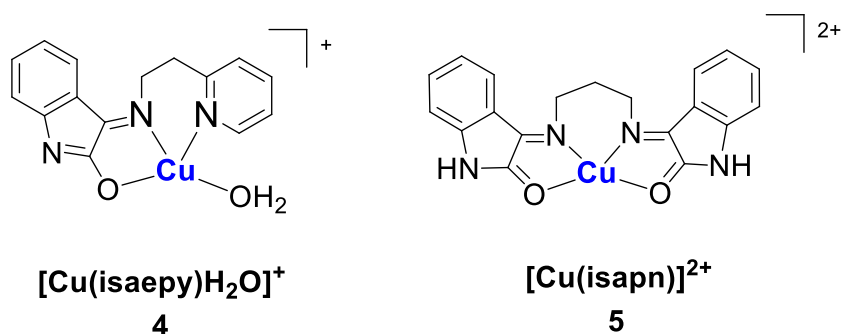


Figura 29. Estrutura dos compostos estudados anteriormente no grupo quanto à atividade tripanocida.

A viabilidade celular na presença dos compostos **4** e **5** foi previamente estudada no grupo utilizando o método de contagem em câmara de Neubauer⁵⁴. Esses resultados podem ser observados abaixo.

Tabela 6. Determinação dos valores de IC_{50} por Câmara de Neubauer, para os compostos 4 e 5 em tripomastigotas, após 24 e 48h de tratamento, a 37°C.

	IC_{50} <i>T. cruzi</i> 24h (μM)	IC_{50} <i>T. cruzi</i> 48h (μM)
Composto 4	$10,7 \pm 3,8$	$3,0 \pm 1,0$
Composto 5	$15,5 \pm 5,5$	$2,7 \pm 1,0$

Como células-controle para esses estudos foram escolhidas as linhagens Fibroblasto P4, comumente utilizadas na literatura e a LLCMK2, linhagem utilizada na rotina de cultivo dos tripanosomas e posteriormente também utilizada nos ensaios com a forma amastigota do parasita.

Decidiu-se por executar os experimentos apenas após 24h de incubação, pois os valores obtidos em 48h podem sofrer interferência por conta da morte natural dos parasitas causado pelo esgotamento dos recursos do meio.

2.2 Parte Experimental

2.2.1 Estudos de citotoxicidade celular pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) com células-controle, Fibroblastos P4 e LLCMK2

Os ensaios de citotoxicidade para células Fibroblasto P4 (célula de prepúcio humano) e LLCMK2 (célula epitelial de rim de macaco) foram feitos em colaboração com Rodrigo Bernardi Miguel (Fibroblasto P4) e Daniel Rodrigues da Silva (LLCMK2), pós-graduandos em nosso grupo. As células não tumorigênicas humanas fibroblastos P4 foram isoladas de tecidos, no laboratório da Profa. Silvyta Stuchi Maria-Engler, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. As células epiteliais de rim de *Macaca mulata* (Macaco Rhesus), LLCMK2, foram obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Para estes ensaios, 1×10^4 células da linhagem fibroblasto P4 ou LLCMK2, variando de acordo com o ensaio, foram semeadas em placa de 96 poços contendo meio DMEM (Dubelcco Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de SBF (Soro Fetal Bovino) e incubadas durante 24h a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) três vezes, sendo então adicionado aos poços, o meio de cultura contendo o composto de interesse em concentrações que variaram de 10 µM a 100 µM, além do grupo controle com 2% de

DMSO, utilizado nos testes com os compostos. A placa foi então mantida por 24h a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

Posteriormente a essa etapa, o meio de cultura foi retirado e as células foram novamente lavadas com PBS três vezes. Ao terminar a lavagem, foi adicionado meio de cultura contendo brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio [ou 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)], na concentração de 0,5 mg/mL. Após incubação com MTT por 3h, o sobrenadante foi removido e a cada poço foram adicionados 100µL de DMSO, para solubilizar o precipitado de formazan obtido na redução do MTT, seguido de leitura a 565nm, em espectrofotômetro.

2.2.2 Ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) com Tripomastigotas de *T. cruzi*.

Usualmente a determinação de atividade citotóxica contra parasitas *T. cruzi* em sua forma tripomastigota é realizada por contagem em câmara de Neubauer⁶⁸. Porém, pela dificuldade em fazer a contagem e os erros intrínsecos da técnica, optou-se por utilizar o método de ensaio colorimétrico utilizando a forma reduzida do MTT, Formazan⁶⁹, como indicador da atividade mitocondrial do parasita, indicando a viabilidade celular da cultura⁷⁰. Nesse ensaio foram utilizados tripanossomas da cepa Y, bastante utilizada e bem descrita na literatura⁷¹.

Inicialmente foi feita uma curva padrão para medir a resposta do método à variação na concentração de parasitas vivos no meio. Para tal foram utilizadas diferentes concentrações de parasita na forma tripomastigota, variando entre $6,25 \times 10^5$ e 1×10^7 , em meio MEM 2% SBF e concentração de MTT igual a 2,5mg/mL.

Foi utilizada uma placa de 24 poços para que os ensaios fossem realizados em duplicata. Em todos os poços foram adicionados 200µL da solução 2,5mg/mL de MTT. Em seguida foram adicionadas diferentes quantidades de parasita e o volume no poço foi completado para 1mL. Nas linhas A e C também foram adicionados 500 µL de SDS 10% antes da incubação, como controle de 100% de mortalidade. O modelo da placa pode ser observado a seguir, na Fig. 3:

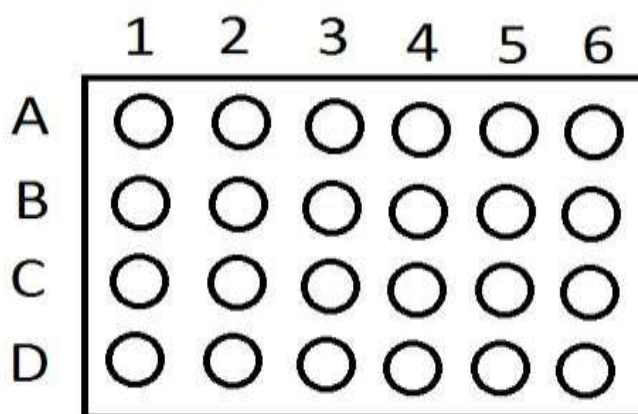


Figura 30. Ilustração da placa de cultura 24 poços.

A placa foi colocada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por três horas. Após esse período foram adicionados 200µL de SDS 10% aos poços para eliminar eventuais tripanossomas ainda vivos e solubilizar os cristais de Formazan formados pela redução do MTT. A solução foi homogeneizada e levada para leitura de absorvância em 565nm⁷². Nas posições A6 e C6 não foram adicionados parasitas, servindo de controle para a absorvância do próprio meio, pois este possui vermelho de fenol, um corante indicador de pH, utilizado na rotina de cultivo das células. A média do valor obtido para A6 e C6 foi subtraída dos valores medidos nos outros poços para diminuir a influência da absorvância do meio nas medidas. O ensaio foi feito sempre em duplicata.

Constatada a relação direta entre a quantidade de parasitas vivos no meio e a medida de absorvância no ensaio MTT, prosseguiu-se para os testes com os compostos.

Os experimentos foram realizados utilizando 1×10^6 parasitas/mL em cada poço, sendo a placa incubada por 24h em estufa a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 . Após o período de incubação, foram adicionados 200 μL de solução de MTT 0,5mg/mL e a placa foi novamente colocada na estufa por 2h. Infelizmente as medidas de absorvância para esses experimentos foram muito baixas, ficando abaixo do intervalo ótimo para a medida de absorvância, que idealmente deveria variar entre 0,2 e 0,8.

Foram então feitas alterações no método, procurando melhorar as medidas de absorvância. Os ensaios subsequentes foram também realizados com a placa de 24 poços. A disposição da placa pode ser observada na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, primeira faixa testada.

	1	2	3	4	5	6
A	100 μM	75 μM	50 μM	25 μM	10 μM	0 μM
B	SDS	SDS	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp
C	100 μM	75 μM	50 μM	25 μM	10 μM	0 μM
D	SDS	SDS	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp

As linhas A e C indicam a concentração do composto sendo testado, em soluções preparadas através de diluições a partir de uma solução-mãe, 5mM. Os poços B1 ao B3 e D1 ao D3 tiveram SDS adicionado no início do experimento, indicando 100% de morte celular. Este controle foi feito para garantir que o MTT não será reduzido mesmo que as células já estejam mortas. Os poços B4 a B6 e D4 a D6 são o controle do meio, isto é, sem parasitas no meio, quando podemos estimar a absorvância de fundo do próprio meio.

A concentração de parasita foi aumentada para $2,5 \times 10^6$ parasitas/mL, e posteriormente para 1×10^7 parasitas/mL, com tempo de incubação de 24h, e o tempo de

reação com MTT foi aumentado para 3 h. Estes ajustes visavam melhorar as condições de medida e leitura.

Após os ajustes citados acima, as medidas de absorvância se encaixaram na faixa considerada ótima para a técnica. Porém, após alguns experimentos, observou-se que a absorvância no meio estava muito próxima à observada para as maiores concentrações de composto, assim ao fazer a subtração para desconsiderar o meio o valor resultante era muito baixo ou negativo. Deste modo os próximos experimentos foram realizados com a mesma disposição de placa, mesmos tempos de incubação, porém alterando a concentração de parasitas para 2×10^7 parasitas/mL e a concentração de MTT foi aumentada para 1,5mg/ml. Após essa alteração as novas medidas de absorvância ficaram na faixa desejada.

Tabela 8. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, segunda faixa testada.

	1	2	3	4	5	6
A	15 μ M	10 μ M	7 μ M	5 μ M	2 μ M	0 μ M
B	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	SDS
C	15 μ M	10 μ M	7 μ M	5 μ M	2 μ M	0 μ M
D	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	SDS

Para os três compostos testados o valor do IC_{50} não pôde ser encontrado pois estava fora da faixa de concentração testada, estando abaixo de 10 μ M. Assim novos ensaios foram efetuados utilizando uma nova faixa de concentração, entre 2 e 15 μ M. Para os novos ensaios foi utilizada a disposição de placa exibida na Tabela 8. Nestes experimentos ainda não foi possível determinar o valor de IC_{50} para o composto 5. Assim um novo experimento foi planejado para uma nova faixa de concentração mostrada na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Distribuição de concentrações na placa de cultura de 24 poços, terceira faixa testada.

	1	2	3	4	5	6
A	3 μ M	2 μ M	1,4 μ M	1 μ M	0,4 μ M	0 μ M
B	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	SDS
C	3 μ M	2 μ M	1,4 μ M	1 μ M	0,4 μ M	0 μ M
D	SDS	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	Sem Tryp	SDS

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Curva padrão de Absorbância vs. concentração de parasitas pelo método MTT

Os valores de absorbância medidos pelo método supracitado estão expostos na Tabela 10. A concentração zero representa os valores para os poços controle, sem parasitas, mas ainda houve absorbância por conta do corante presente no meio. A média para os valores de absorbância do meio, medidos em duplicata, foi subtraída de todos os valores obtidos, para correção, retirando o efeito de absorbância do meio.

Tabela 10. Absorbâncias medidas para a curva padrão variando a concentração de tripomastigotas por mL de solução.

Absorbância/ Concentrações	0	6,25E5	1,25E6	2,5E6	5,0E6	1,0E7
Médias	0,26995	0,3365	0,3397	0,3686	0,4633	0,6663
Correção	0	0,0665	0,0697	0,0987	0,1934	0,3963
Erro	0,0090	0,0016	0,01591	0,0071	0,0065	0,0036

Pudemos então construir a curva da média das absorvâncias pela concentração de parasitas:

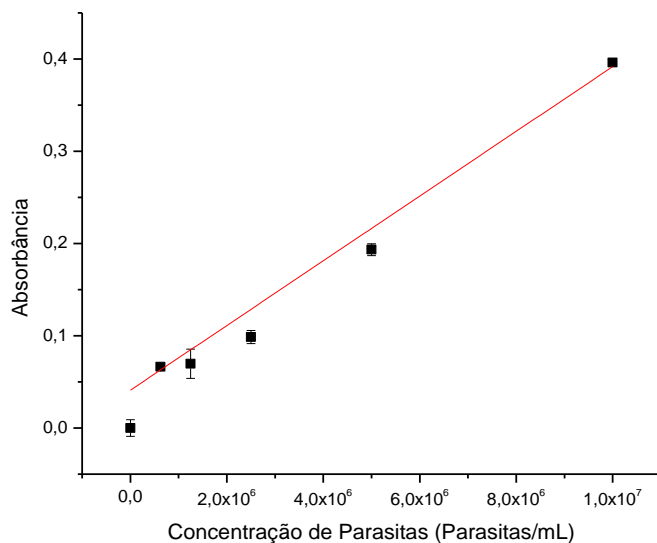


Figura 31. Curva padrão para a resposta da medida de absorvância ao variar a concentração de parasitas.

O valor de R^2 obtido foi de 0,9899, indicando uma boa correlação entre a concentração de parasitas por mililitro e a resposta em absorvância na leitura do Formazan, permitindo traçar uma correlação direta, linear, entre os dois parâmetros.

2.3.2 Ensaios de viabilidade celular em células-controle via MTT

Visando avaliar a toxicidade dos compostos estudados em células-controle, que serviram de modelo para as células hospedeiras humanas (Fibroblasto P4) e células LLCMK2, foram obtidos os valores de IC_{50} para as linhagens citadas, mostrados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Valores determinados de IC₅₀ após incubação das células modelo, LLCMK2 e Fibroblasto P4, por 24h, a 37°C, com cada um dos compostos de cobre estudados.

	LLCMK2 (µM)	Fibroblasto P4 (µM)
Composto 1	43,55 ± 1,9	>100
Composto 2	>100	>100
Composto 3	23,5 ± 3,1	8,33 ± 3,25
Composto 4	>100	>100
Composto 5	24,2 ± 13,2	51,2 ± 1,5

Os compostos **2** e **4** não mostraram atividade marcante (IC > 100 µM) em nenhuma das linhagens modelo. O composto **1** não mostrou atividade na linhagem de Fibroblasto P4, mas teve uma toxicidade mediana na LLCMK2, enquanto o composto **3** apresentou uma atividade acentuada em ambas as linhagens.

Os experimentos relacionados ao composto **5** com a linhagem LLCMK2 apresentaram alta variação entre os resultados obtidos para o IC₅₀, representado pelo alto valor do erro na medida, anômalo se comparado aos valores obtidos para os outros complexos. O experimento foi repetido seis vezes, e os valores mais discrepantes foram discriminados, sendo o valor médio resultante ilustrado na Tabela 11 acima.

2.3.3 Ensaio de viabilidade celular em tripomastigotas via MTT

Paralelamente aos ensaios de citotoxicidade com células-modelo, os complexos de cobre foram testados na forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.

Os resultados obtidos para as medidas de viabilidade celular frente ao parasita podem ser observados na Tabela 12 abaixo. Também foi calculado o índice de seletividade (I.S.) para os compostos estudados, comparando-se os valores obtidos para os IC₅₀ frente

ao parasita e às células-controle, ao dividir o valor obtido de viabilidade para uma determinada célula-controle pelo valor de viabilidade obtido no parasita. Um maior índice de seletividade indica uma atuação mais específica do composto nas células do *T. cruzi*, e, portanto, uma menor toxicidade do composto para humanos.

Tabela 12. Resultados de valores IC₅₀ dos complexos de cobre estudados frente a forma tripomastigota do *T. cruzi*, após 24h de incubação, a 37°C.

	IC ₅₀ (μM)	I.S. LLCMK2	I.S. Fibroblasto P4
Composto 1	3,93 ± 0,09	11,1	>25,4
Composto 2	5,39 ± 1,63	>18,5	>18,5
Composto 3	1,12 ± 0,15	21	7,4
Composto 4	6,11 ± 0,44	>16,4	>16,4
Composto 5	1,37 ± 0,12	17,7	37,4
Benznidazol⁷³	5,0		
Nifurtimox⁷³	8,5		

Os resultados obtidos, após 24h de incubação a 37°C, foram bastante promissores, com valores de IC₅₀ de alguns μmols/L (< 10 μM), e todos os compostos apresentaram bons índices de seletividade quando comparados frente às células-controle fibroblastos. Os compostos **3** e **5** foram os mais ativos, mostrando melhores valores de IC₅₀ frente ao parasita. Porém, o composto **3** também apresentou alta toxicidade frente à linhagem Fibroblasto P4, correspondente a células humanas.

Os compostos **1**, **2** e **4** apresentaram valores de IC₅₀ comparáveis aos fármacos comerciais, Benznidazol e Nifurtimox, enquanto os compostos **3** e **5** se mostraram mais eficientes que ambos os fármacos comerciais frente à forma tripomastigota do parasita.

Na literatura, inúmeros compostos foram descritos como antichagásicos ou anti-*T.cruzi*, incluindo **hidrazonas**⁷⁴, **tiosemicarbazonas**⁷⁵, e **tiazolidinonas**⁷⁶.

Uma série de novas tiazolidinonas foram planejadas, tendo como alvo a cruzaina, principal protease de tripanosomas. Elas foram sintetizadas e tiveram sua potencial atividade anti-parasitária avaliada frente a epimastigotas e tripomastigotas¹⁷. Os valores de IC₅₀ ficaram na faixa < 10 µM, porém os estudos constataram que a cruzaina não era alvo importante para esses compostos. Por outro lado, esses compostos causavam alterações na morfologia do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático (ER) com formação de vacúolos citosólicos, induzindo morte por necrose dos parasitas.

Nitro-derivados de tiosemicarbazonas foram estudados como agentes tripanocidas³², provavelmente porque nifurtimox e benznidazol, conhecidos fármacos para Doença de Chagas, atuam com redução de grupo nitro, com formação de espécies reativas de oxigênio, como radical superóxido, ou modificações em biomoléculas, causando danos celulares. Esses compostos foram testados contra formas epimastigotas do parasita, com exposição a concentrações dos compostos de 25 µM, por 5 dias. A coordenação de cobre(II) a essas tiosemicarbazonas aumentou sua atividade frente aos parasitas, provavelmente devido à grande estabilidade dos complexos formados, mudanças de lipofilicidade ou conformação mais favorável do ligante coordenado nas interações com possíveis alvos biológicos.

Complexos metálicos podem oferecer diversas vantagens em relação aos medicamentos já utilizados para doenças negligenciadas. Entre elas a possibilidade de mais de um mecanismo de ação, diversos alvos de interação ou inibição dentro da célula, síntese mais barata e a capacidade de sobrepujar mecanismos de defesa celular²⁹. Além

disso ao utilizar metais que são endógenos para o hospedeiro, podemos minimizar os efeitos colaterais, visto que metais como o cobre possuem a homeostase muito bem controlada pelo organismo⁷⁷.

Complexos de rutênio foram sintetizados a partir de um ligante orgânico, aril-4-oxotiazolil-hidrazona (ATZ), com atividade anti-tripanosoma já conhecida e com baixa toxicidade em células de mamíferos. Com o objetivo de aumentar a toxicidade apenas frente ao parasita, diversos complexos foram sintetizados ao fazer pequenas alterações na estrutura do ligante ATZ. As atividades dos complexos foram comparadas com as atividades de seus ligantes livres respectivos⁷³.

Os complexos de rutênio, em sua maioria, apresentaram atividade entre 3 e 8 μ M, estando em uma faixa comparável aos fármacos comerciais, Benznidazol e Nifurtimox, para a forma tripomastigota. Todos apresentaram considerável melhora em relação ao ligante livre, sem apresentar toxicidade para as células referência, ilustrando o quão benéfico pode ser a utilização de metais associados a ligantes orgânicos para o tratamento de doenças como o mal de Chagas.

2.3.4 Comparação de Resultados obtidos através de Método MTT e Contagem em Câmara de Neubauer

Também foi possível comparar os resultados de viabilidade celular obtidos via MTT com os resultados obtidos previamente por contagem em câmara de Neubauer, para os compostos **4** e **5**. Essa comparação pode ser observada na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13. Comparação entre os resultados de IC₅₀ obtidos previamente, em câmara de Neubauer, e recentes, com MTT, após incubação a 37°C por 24h.

	IC ₅₀ (Neubauer Chamber) ⁵⁴	IC ₅₀ (MTT)	Correlação
Composto 4	15,5 ± 5,5 µM	6,11 ± 0,44 µM	2,54
Composto 5	10,7 ± 3,8 µM	1,37 ± 0,12 µM	7,81

Observa-se que os valores obtidos pelo método com MTT são menores que os obtidos na câmara de Neubauer. Isso pode ser explicado por uma maior precisão do método, com menor dependência do operador, obtendo-se resultados através de medida espectrométrica, enquanto o método da câmara baseia-se na acuidade visual do operador⁷⁰. Isso pode ser constatado inclusive no erro das medidas, com uma maior discrepância entre os métodos sendo observada para o composto 5.

2.4 Conclusões

Todos os compostos estudados apresentaram valores promissores de IC₅₀, na faixa de 1 a 6 µM, indicando boa toxicidade frente à cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, em sua forma tripomastigota. Os complexos **3** e **5** foram os mais ativos. Porém, o composto **3** se mostrou muito tóxico nas linhagens celulares modelo para o hospedeiro, principalmente frente a Fibroblasto P4, com menor índice de seletividade encontrado.

Ao analisar o composto **3**, é interessante observar que ele, propositalmente, é o único que não possui isatina (1H-indol-2,3-diona) em sua estrutura. A isatina é um produto natural e endógeno ao corpo humano, sendo um metabólito derivado da adrenalina⁷⁸. É importante apontar que o composto **3** se mostrou o mais tóxico, para parasitas e células hospedeiras, em comparação com os demais compostos. Um dos

motivos para a sua toxicidade acentuada pode ser a ausência de isatina ou outro composto endógeno em sua estrutura.

Os compostos apresentaram uma eficácia semelhante aos fármacos comerciais mais utilizados, Benznidazol e Nifurtimox, e no caso dos compostos **3** e **5**, a concentração encontrada para inviabilizar 50% dos parasitas foi pelo menos 4 vezes menor em comparação com os fármacos.

Os valores obtidos para a viabilidade celular são compatíveis com estudos recentes apresentados na literatura^{44,79-81}, principalmente por serem obtidos em 24h. Complexos de cobre com diferentes classes de ligantes (triazóis, bipyridinas e fenantrolinas) foram testados na literatura, mostrando melhoras em relação aos ligantes livres, com valores de IC₅₀ reportados entre 0,1 a 15 µM^{82,83}.

Todos os complexos estudados apresentaram atividade antiparasitária compatível com a literatura (Tabela 14), referente à forma tripomastigota do parasita, também apresentando alto grau de seletividade (I.S. > 16). Na comparação entre as técnicas apresentadas, o ensaio de viabilidade com MTT foi mais preciso e mais sensível em relação à câmara de Neubauer, como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 14. Índice de seletividade frente a tripomastigotas para diferentes compostos da literatura.

Composto	IC ₅₀ (µM)	Índice de Seletividade (Tempo de Incubação)
[Pd(HL2)(L2)]Cl ⁸⁴		9,5 (120h)
[Pt(HL1)(L1)]Cl ⁸⁴		8,8 (120h)
[Au ^{III} (Hdamp)(L1 ⁴)]NO ₃ (4-NO ₃) ⁴³		9,79 (48h)
[Cu(4-MH)(dmb)(ClO ₄) ₂].2H ₂ O ⁸³		12,9 (72h)
<i>trans</i> -[Ru(tzdt)(Pph ₃) ₂ (bipy)]PF ₆ ⁸⁵		34 (24h)

Nesses estudos, os complexos de platina e paládio contém ligantes (HL) tiosemicarbazonas derivadas de 1-indanonas. O complexo de ouro também utiliza tiosemicarbazonas como ligante (Hdamp). O complexo de rutênio apresenta como ligantes bipyridina, trifenilfosfina e derivado da 1,3-tiazolidina-2-tiona, enquanto o composto de cobre refere-se a ligantes mistos diiminas (phen ou bipy) e 2-metoxibenzidrazida ou 4-metoxihidrazida.

Por se tratarem de complexos tridentados e tetradentados, os compostos estudados apresentam uma alta constante de formação com cobre, sendo extremamente estáveis, mesmo em meio biológico, apresentando constantes de estabilidade na ordem de $\log K_{ML} = 12$ em ensaios utilizando albumina como ligante competitivo⁸⁶⁻⁸⁸. Para comparação, essas constantes verificadas são da mesma ordem (10^{12}) que a constante de ligação de íons cobre no sítio N-terminal da albumina, que é seletivo para esses íons. Por conta dessa estabilidade, não houve a necessidade de testar o cobre livre frente aos parasitas⁸⁹.

Os compostos **1, 2, 4 e 5** foram selecionados para os ensaios com a forma amastigota do parasita. O composto **3** não foi escolhido por conta de seu valor semelhante de IC_{50} tanto frente ao Fibroblasto P4, quanto a células LLCMK2, isto é, devido a sua baixa seletividade em comparação com os demais compostos. A maior atividade do composto **3**, pode ser resultando da sua maior labilidade na quarta coordenação do cobre, como descrito no capítulo 1.

Para que um composto tenha sua atividade considerada promissora para um agente anti-chagásico ele deve apresentar o Índice de Seletividade (I.S.) ≥ 10 . Por esta razão, com I.S. = 7,4, o composto **3** não foi escolhido para os ensaios em amastigotas.

Capítulo 3

Ensaio de Inibição de Taxa de Infecção em Amastigotas

3.1 Considerações Iniciais

Os experimentos descritos nesse capítulo foram inicialmente planejados para a utilização da linhagem Fibroblasto P4 como célula-modelo e o software CellProfiler para a contagem das células totais e infectadas.

Para o melhor funcionamento, o CellProfiler necessita que a morfologia das células estudadas seja a mais arredondada possível. Considerando isso, foram feitos ensaios de imageamento, a fim de determinar se seria possível ajustar a concentração de células plaqueadas para que sua confluência favorecesse a análise. Em paralelo foram realizados estudos com anticorpos específicos para o *T. cruzi*, com o objetivo de melhorar as imagens, ao utilizá-los de forma conjunta ao DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), e assim otimizar o processo de contagem no software.

Porém, os ensaios realizados não se mostraram eficientes, principalmente em relação ao uso dos anticorpos. Assim, optou-se por não os utilizar e procedeu-se com a marcação apenas com DAPI. Também não foi possível encontrar uma concentração favorável para a utilização do Fibroblasto P4 como célula-modelo, e assim o roteiro foi alterado para a utilização da linhagem LLCMK2, que já era utilizada para o cultivo dos tripanossomas.

Após ensaios iniciais, o uso do *CellProfiler* também foi descartado, devido a sua dificuldade de manuseio. Optou-se então pela utilização do *Photoshop 19* como ferramenta de contagem e a contagem foi realizada manualmente.

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Cultura de Células LLCMK2

Células LLC-MK2 são cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (PBS), até atingir confluência e posteriormente são mantidas em meio DMEM suplementado com 2% SFB para posteriores experimentos. O repique das células consiste em duas lavagens com PBS 1x estéril e posterior tratamento com tripsina, durante 3 min a 37°C e diluição das células em meio DMEM 10% SFB. As células são submetidas às análises para contaminação por micoplasma, mensalmente.

3.2.2 Ensaio de Atividade Antiproliferativa em Amastigotas

As células LLCMK2 são colhidas da garrafa-mãe por lavagem com PBS (phosphate-buffering saline) estéril. Adicionam-se 3mL de tripsina, em seguida agita-se a garrafa para soltar as células aderidas à parede da garrafa. A garrafa é lavada com 12mL de meio MEM com 10% SFB, e o volume é transferido para um tubo Falcon e a concentração de células por mL é determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Em placa de cultura de 24 poços foram adicionadas lamínulas estéreis em todos os poços. Em cada poço foi adicionado 1mL de meio de cultura MEM com 10% de SFB contendo células da linhagem LLCMK2, proveniente de rim de macaco *Rhesus*, em concentração 5×10^4 células/mL. A placa foi cultivada em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24h.

Após 24h, o meio de cultura foi retirado e as células foram infectadas com a adição de 1mL de meio MEM 2% de soro, contendo 5×10^6 tripomastigotas por mL, em cada poço, incubadas por 2h.

Decorridas duas horas, o meio foi retirado e as lamínulas foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitas livres e 1mL de meio, MEM 2% SFB, foi adicionado em cada poço. A placa foi então cultivada em estufa por 48h, onde após 24h, o composto estudado foi adicionado ao meio. A disposição do composto é mostrada na Tabela 15 abaixo, onde C1 a C6 determinam diferentes concentrações do composto, C-DMSO o controle para 0,2% de DMSO e C-Positivo (C-Pos) o controle positivo, onde não há DMSO, nem composto. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,2%.

Tabela 15. Disposição das soluções na placa de 24 poços para ensaios com amastigotas.

	1	2	3	4	5	6
A	C1	C1	C1	C2	C2	C2
B	C3	C3	C3	C4	C4	C4
C	C5	C5	C5	C6	C6	C6
D	C-DMSO	C-DMSO	C-DMSO	C-Pos	C-Pos	C-Pos

Passadas 48h, o meio foi retirado e as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS. Foi adicionado então 1mL de solução de para-formaldeído 2%, com incubação por 40 minutos. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS para retirada do para-formaldeído e armazenadas em PBS para evitar secagem.

3.2.3 Microscopia de Fluorescência

A leitura das placas é feita pela retirada das lamínulas de cada poço, que são sequencialmente lavadas com água deionizada três vezes e colocadas sobre uma lâmina de vidro com uma gota de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), um marcador

fluorescente que se liga fortemente no DNA em regiões ricas em adenina-timina⁹⁰. Esse processo é executado com mínima presença de luz.

Após a marcação, as lamínulas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, com fonte de excitação entre 379 e 401nm, fazendo-se em média seis imagens por lamínula, em pontos aleatórios da mesma, constituindo dezoito imagens por grupo de contagem (três lamínulas para cada concentração).

3.2.4 Contagem de Células Totais e Infectadas.

As imagens foram tratadas utilizando a ferramenta de contagem do software Photoshop 19 Portable, para a determinação do número total de células e o total de células infectadas em cada imagem, podendo-se assim determinar a taxa de infecção para cada grupo testado. Todas as imagens necessitaram de ajustes de brilho e contraste, feitos também utilizando a ferramenta Photoshop (Figura 32). Foram analisadas no total 1547 imagens.

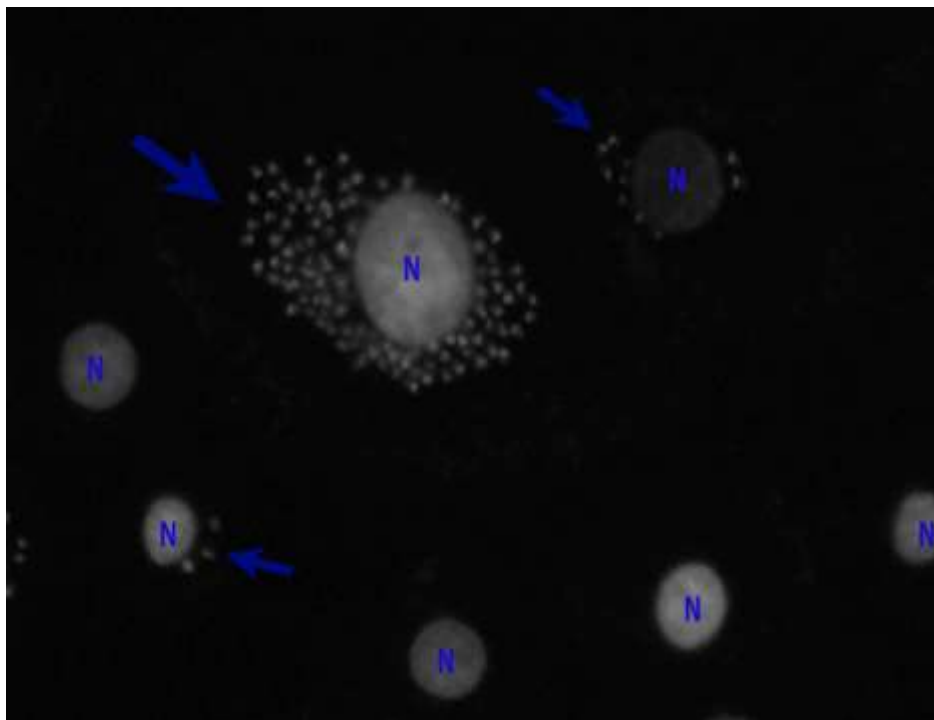


Figura 32. Exemplo de imagem feita com microscópio de fluorescência. N indica o núcleo das células hospedeiras. As setas indicam a presença de parasitas *T. cruzi* em sua forma amastigota, próximos ao núcleo dessas células (setas menores) ou já ocupando todo o seu citoplasma (seta maior).

3.3 Resultados e Discussões

3.3.1 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência com Fibroblasto P4

Inicialmente planejou-se utilizar o Fibroblasto P4 como célula-modelo para os ensaios de taxa de infecção. Nesse ensaio também foram utilizados anticorpos específicos de *T. cruzi* como marcadores celulares. Um anticorpo primário, policlonal anti-tripanosossoma total e um anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de camundongo marcado com substâncias fluorescente), que reconhece o anticorpo primário.

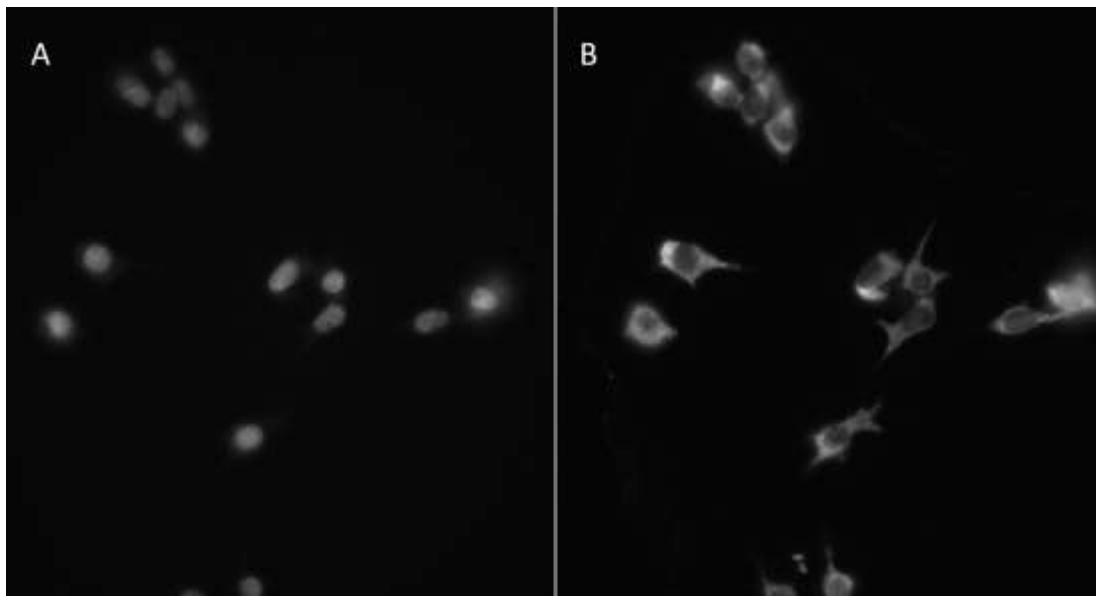


Figura 33. Microscopias de fluorescência com a linhagem Fibroblasto P4, marcado com A) DAPI e B) Anticorpos anti-tripanosoma.

Após diversas tentativas de diluição, a marcação específica para tripanossoma não foi eficiente, marcando não apenas o parasita, conforme ilustrado na Figura 33B, não fornecendo o resultado esperado para o ensaio.

Novos ensaios foram então realizados utilizando apenas o DAPI como marcador. Além de tornar o processo mais simples e rápido, a marcação com DAPI forneceu melhor resolução, porém inviabilizou a utilização do CellProfiler, pois o protocolo utilizado por ele requeria a utilização de duas marcações.

3.3.2 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência com LLCMK2.

Ensaio por microscopia de Fluorescência foram utilizados para determinar a taxa de infecção dos parasitas em culturas de células da linhagem LLCMK2. Nesses experimentos foram investigados os compostos **1, 2, 4 e 5**.

Inicialmente foram testadas diferentes condições para o plaqueamento das células, onde diferentes concentrações e volumes de meio de cultura foram testados a fim de otimizar a população de células por lamínula. Também foram testados diferentes tempos de crescimento para as células, variando de 24 a 48h entre o plaqueamento e a infecção.

As condições testadas podem ser observadas na tabela 16 abaixo. Todas as condições foram testadas com 0,5 e 1mL de meio de cultura.

Tabela 16. Condições testadas para plaqueamento em lamínula.

Tempo de Crescimento	Concentração de Células (células /mL)
24h	1×10^5
24h	1×10^4
24h	5×10^4
48h	1×10^4
48h	1×10^3

Dentre as condições testadas, a que conta com 24h de crescimento e concentração de 5×10^4 células por mL se mostrou a mais adequada para os experimentos. Concentrações menores, mesmo com mais tempo de incubação, não recobriram a lamínula de forma eficiente, deixando muitos espaços entre as células, o que dificultaria as medidas por microscopia posteriormente.

Concentrações maiores fizeram com que as células, ficassem muito confluentes, formando uma camada que se descolou da lamínula durante o período de incubação.

A partir da otimização do preparo das lamínulas e plaqueamento, procedeu-se para os experimentos com os compostos propostos.

3.3.2.1 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto **1**.

Inicialmente o composto 1 foi testado utilizando uma faixa de concentração de 100 a 10 μ M. Esse teste foi realizado propositalmente, sabendo que o IC₅₀ do composto sobre a linhagem utilizada é de 43,55 \pm 1,90 μ M. O objetivo desse ensaio foi observar o comportamento das células ao serem expostas tanto ao parasita, quanto ao composto.

Durante o experimento foi observado que as células morreram em sua totalidade para todas as concentrações testadas, mesmo em concentrações que estavam abaixo do IC₅₀ do composto.

Uma possível explicação para o resultado observado é a maior fragilidade das células hospedeiras. Apesar de sua resistência a fatores como parasitas, composto e DMSO 1% de forma isolada, sua combinação mostrou-se muito tóxica para a linhagem, causando a morte celular e fazendo com que as células descolassem da lamínula.

Após esse ensaio inicial, a faixa de concentração de testes foi ajustada para 10 a 1 μ M. Esses valores estão abaixo do IC₅₀ para as células e abrangem o valor de IC₅₀ encontrado para a forma tripomastigota.

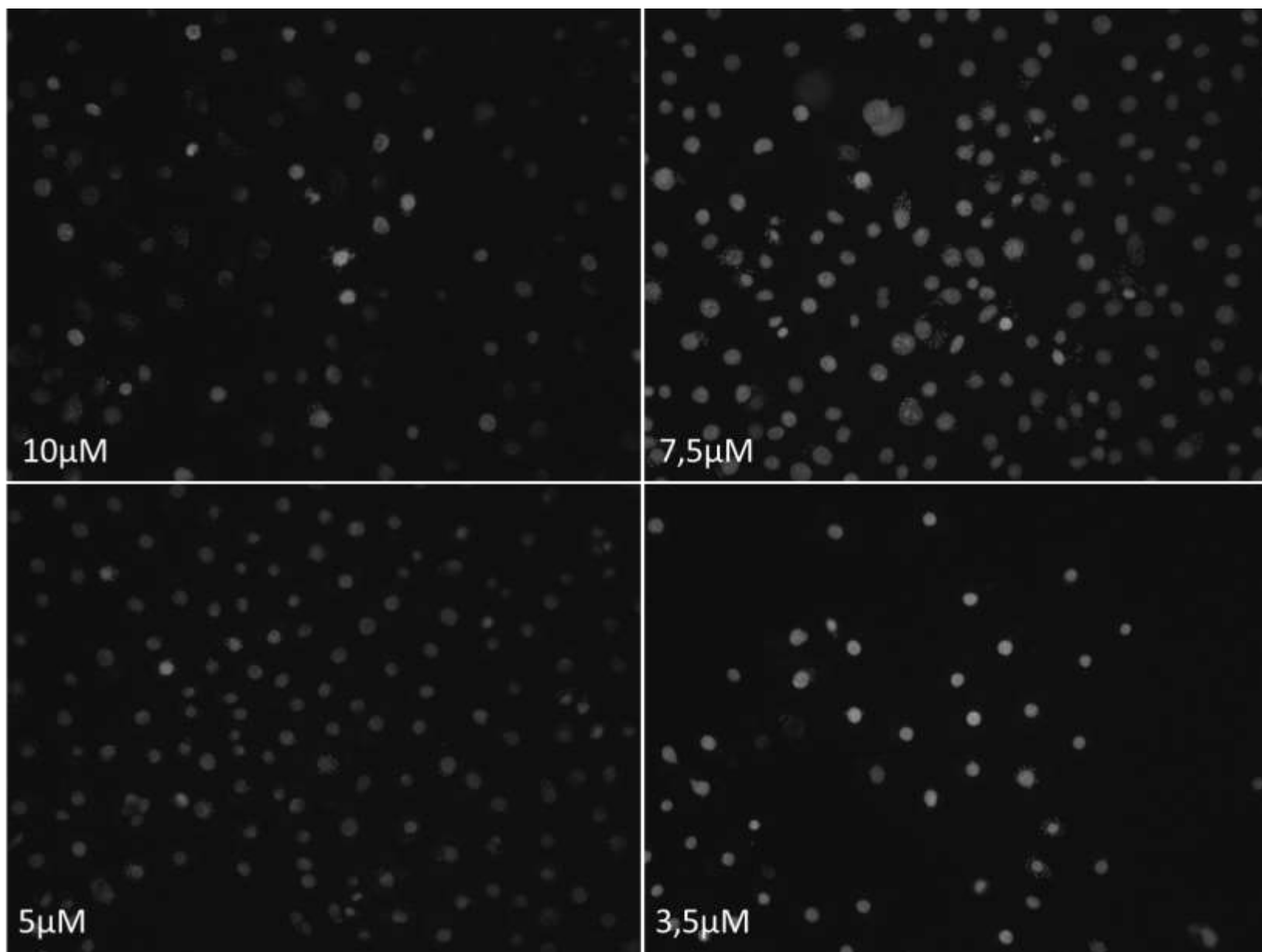


Figura 34. Microscopia de Fluorescência para o composto 1, concentrações de 10 a 3,5 μM

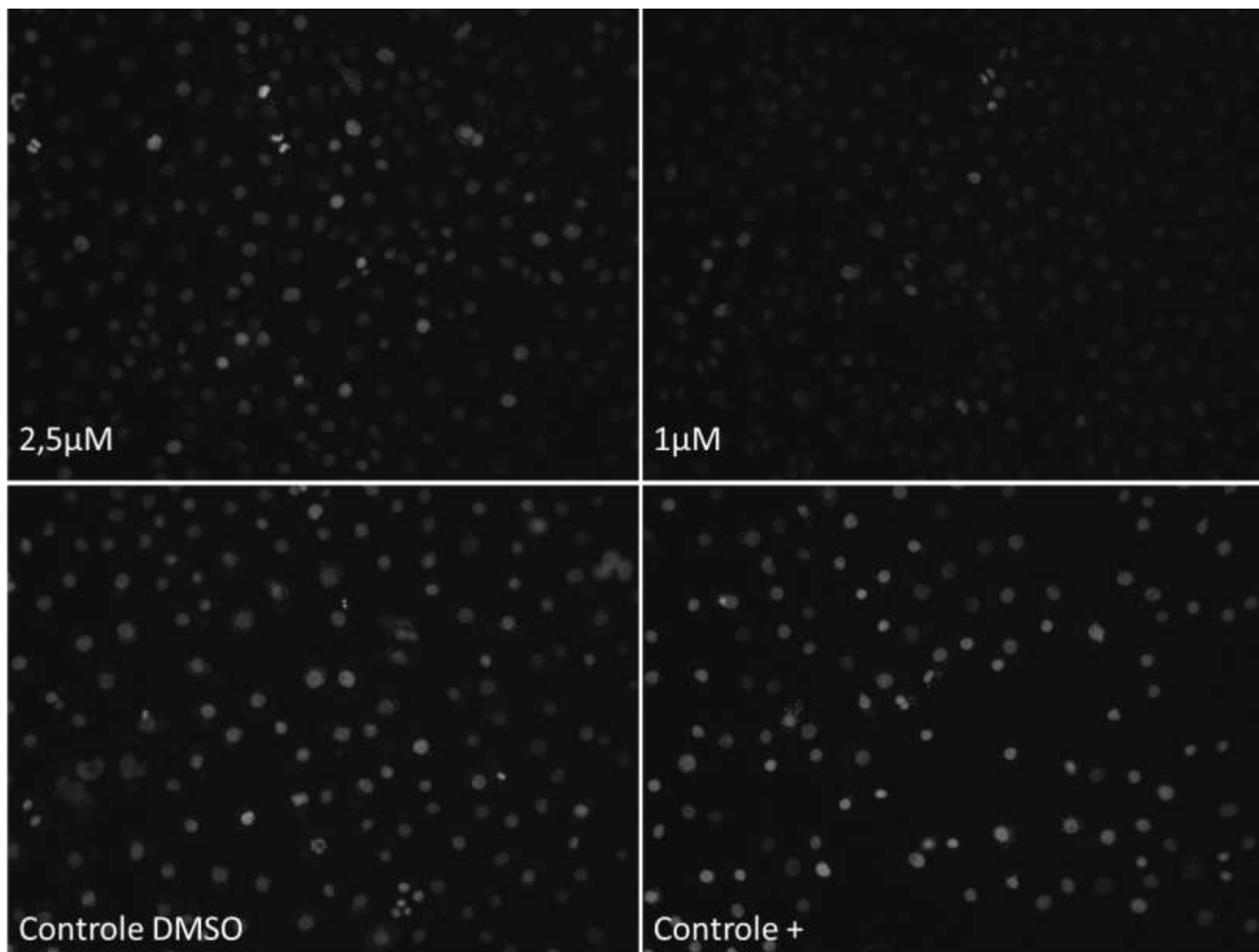


Figura 35. Microscopia de Fluorescência para o composto 1, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.

Com a nova faixa de concentração utilizada na cultura de células, observou-se a diminuição da morte celular, propiciando um bom recobrimento da placa de forma confluyente, como pode ser observado nas Figuras 34 e 35 mostradas anteriormente, comparando os poços com presença do composto aos controles.

Após a contagem das imagens com o auxílio do software Photoshop 19, pode-se determinar a taxa de infecção ao comparar o total de células por imagem com o total de células infectadas por imagem. Os resultados estão ilustrados na Figura 36.

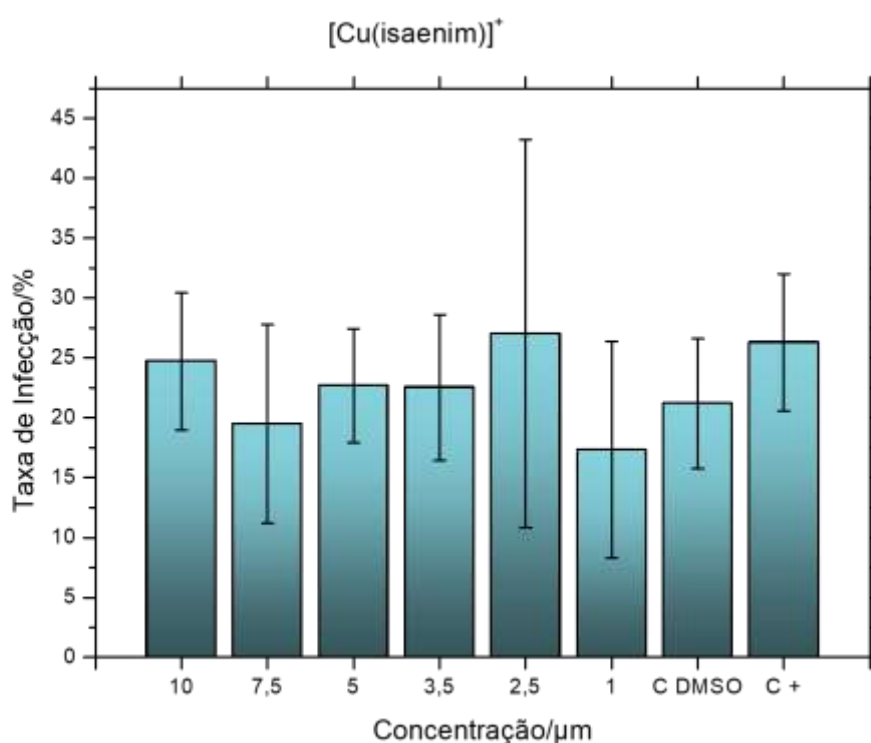


Figura 36. Taxa de infecção para o composto 1, determinada por contagem em Photoshop.

Após o tratamento com o composto nas concentrações utilizadas, não foi possível observar diferença significativa entre as medidas nos poços tratados e nos controles. Esses resultados podem ser devidos à ausência de efeito do composto sobre a forma amastigota, intracelular, ou podem ter ocorrido devido à baixa concentração do

composto utilizada, que deixou de ser tóxico para as células hospedeiras parasitadas, mas ao mesmo tempo não foi eficiente em reduzir a infecção.

3.3.2.2 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto **2**.

A exemplo do composto **1**, o composto **2** foi inicialmente testado com concentrações variando entre 5 a 50 μM . Semelhantemente, as células LLCMK2 parasitadas apresentaram alta taxa de morte celular e descolamento da lamínula. Assim como no composto **1**, sendo então as concentrações diminuídas para a mesma faixa do composto anterior, entre 10 a 1 μM .

Com a nova faixa de concentração o plaqueamento foi bem-sucedido, possibilitando a obtenção das imagens de microscopia mostradas em seguida, nas Figuras 37 e 38.

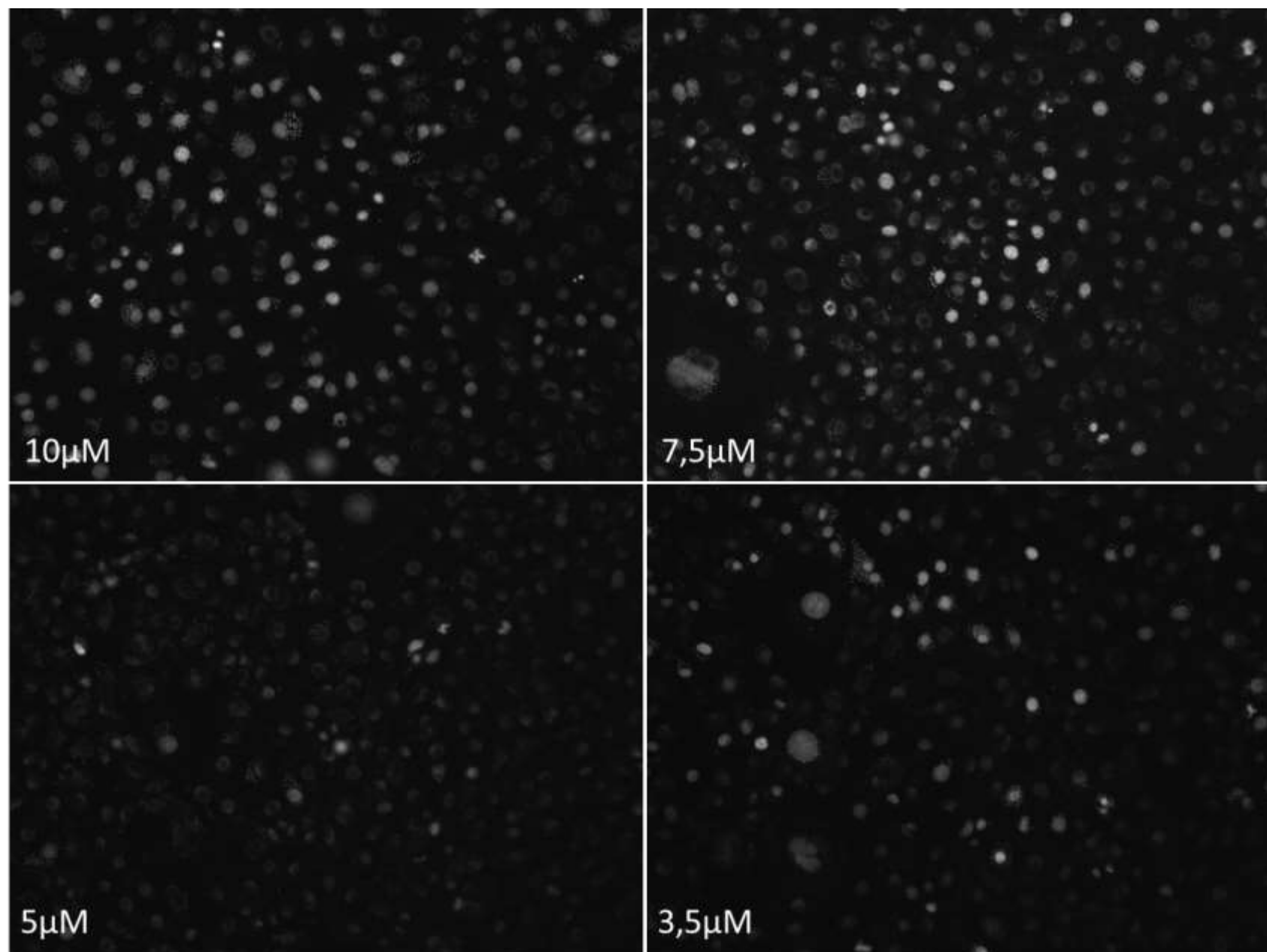


Figura 37. Microscopia de Fluorescência para o composto 2, concentrações de 10 a 3,5 μM .

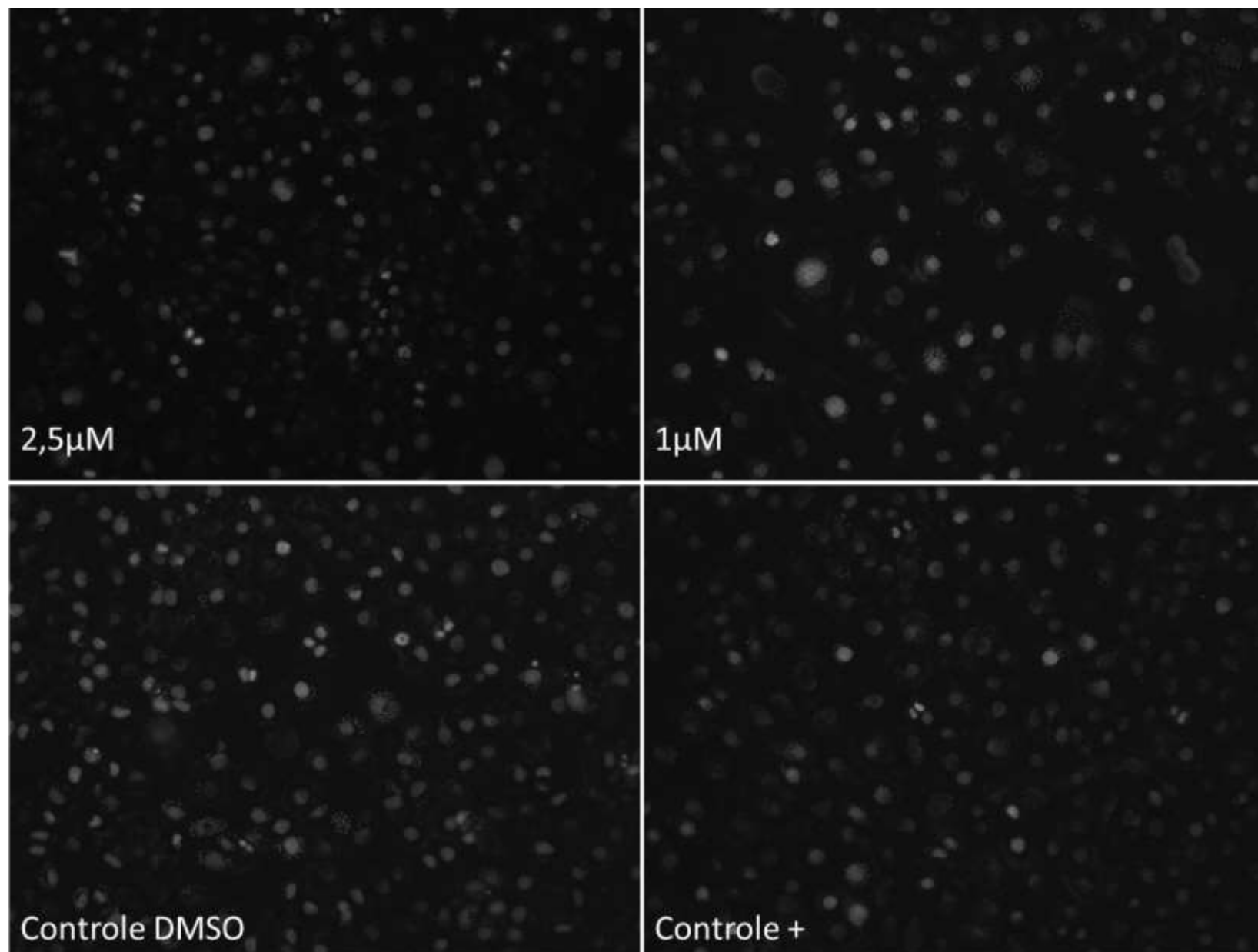


Figura 38. Microscopia de Fluorescência para o composto 2, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.

Para o composto **2** foram utilizadas as mesmas concentrações que para o composto **1**, visto que para este composto a faixa de concentrações maiores também se mostrou prejudicial para a cultura de células, impossibilitando a microscopia.

Observa-se, tanto na Figura 37 quanto na Figura 38, que as células tiveram um bom crescimento e estão com uma boa distribuição nas placas, não estando muito confluentes, nem muito espaçadas.

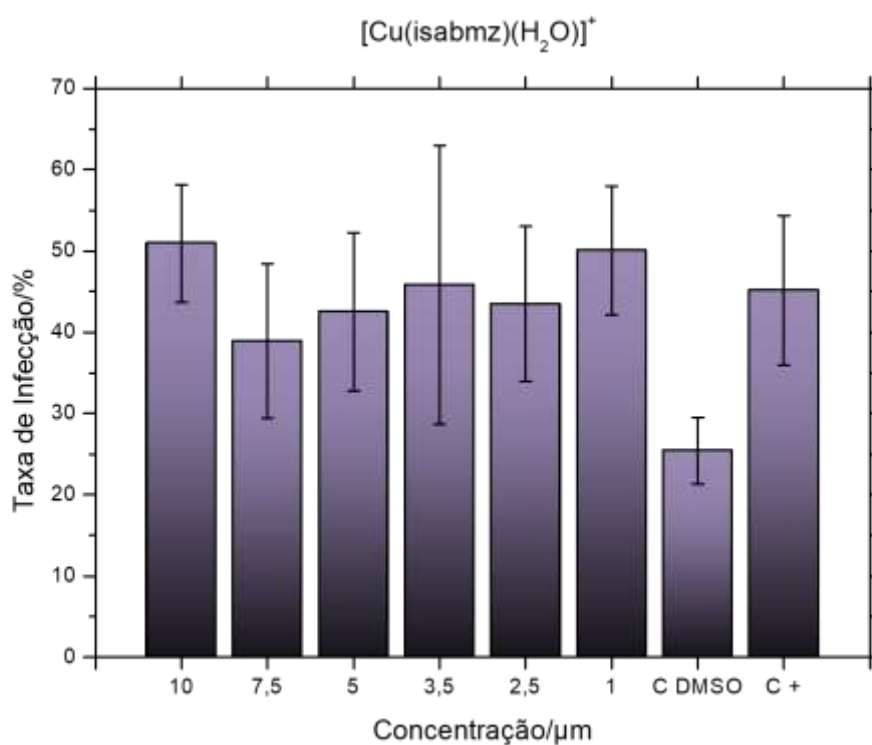


Figura 39. Taxa de infecção para o composto **2**, determinada por contagem em Photoshop.

Mais uma vez o resultado encontrado para a taxa de infecção não evidencia uma grande mudança entre as células tratadas com o composto e os controles. De forma inesperada o controle com DMSO apresentou uma taxa de infecção menor, mesmo em relação aos poços tratados com o composto contendo a mesma concentração de DMSO, sugerindo um possível erro experimental.

3.3.2.3 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto **4**.

A partir do composto **4** os ensaios foram feitos apenas de acordo com o protocolo estabelecido pelos experimentos anteriores. Assim, apenas a faixa de concentração de 1 a 10 μM foi testada.

As respectivas imagens de microscopia são mostradas nas Figuras 40 e 41, a seguir.

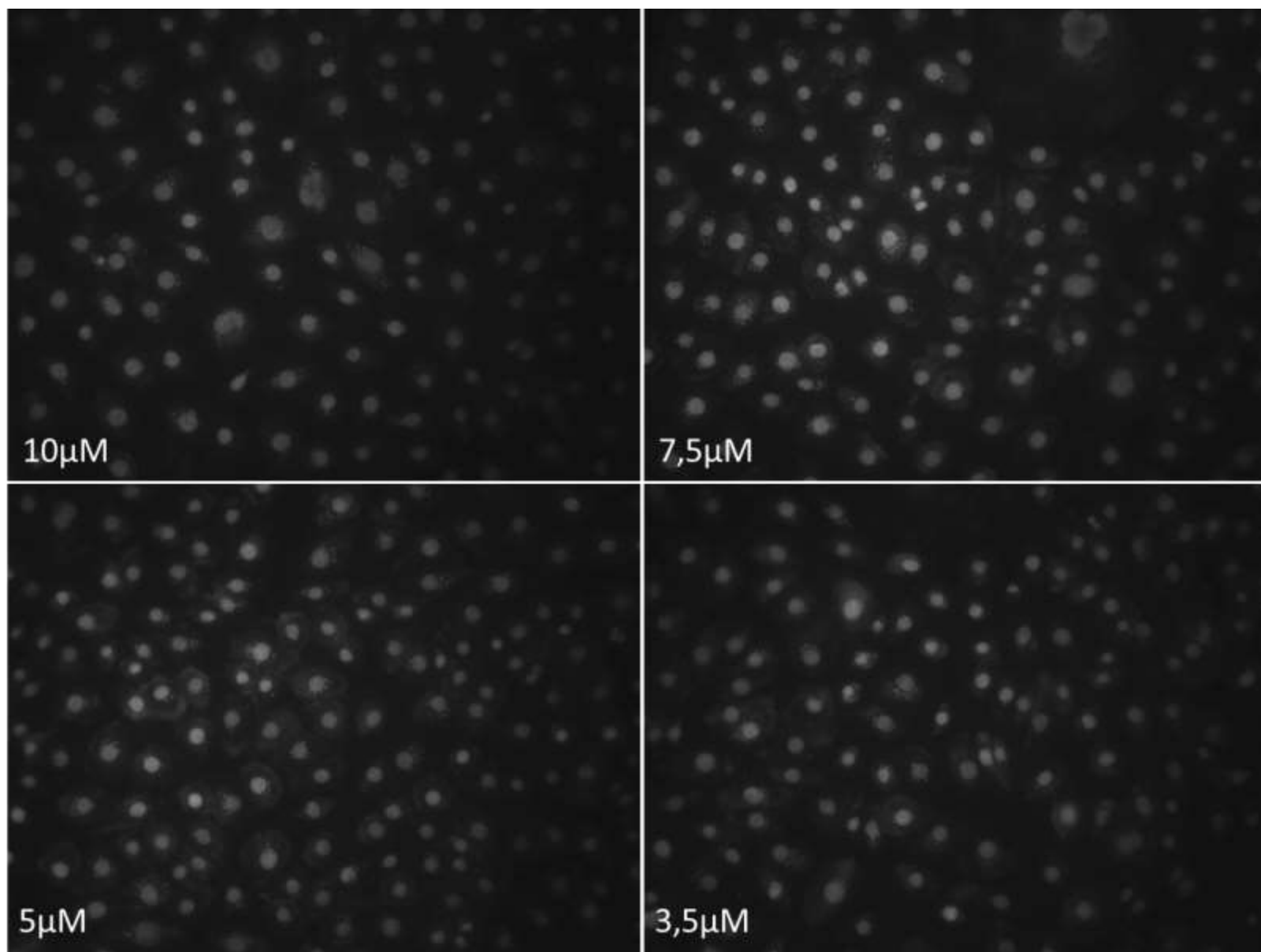


Figura 40. Microscopia de Fluorescência para o composto 4, concentrações de 10 a 3,5 μM.

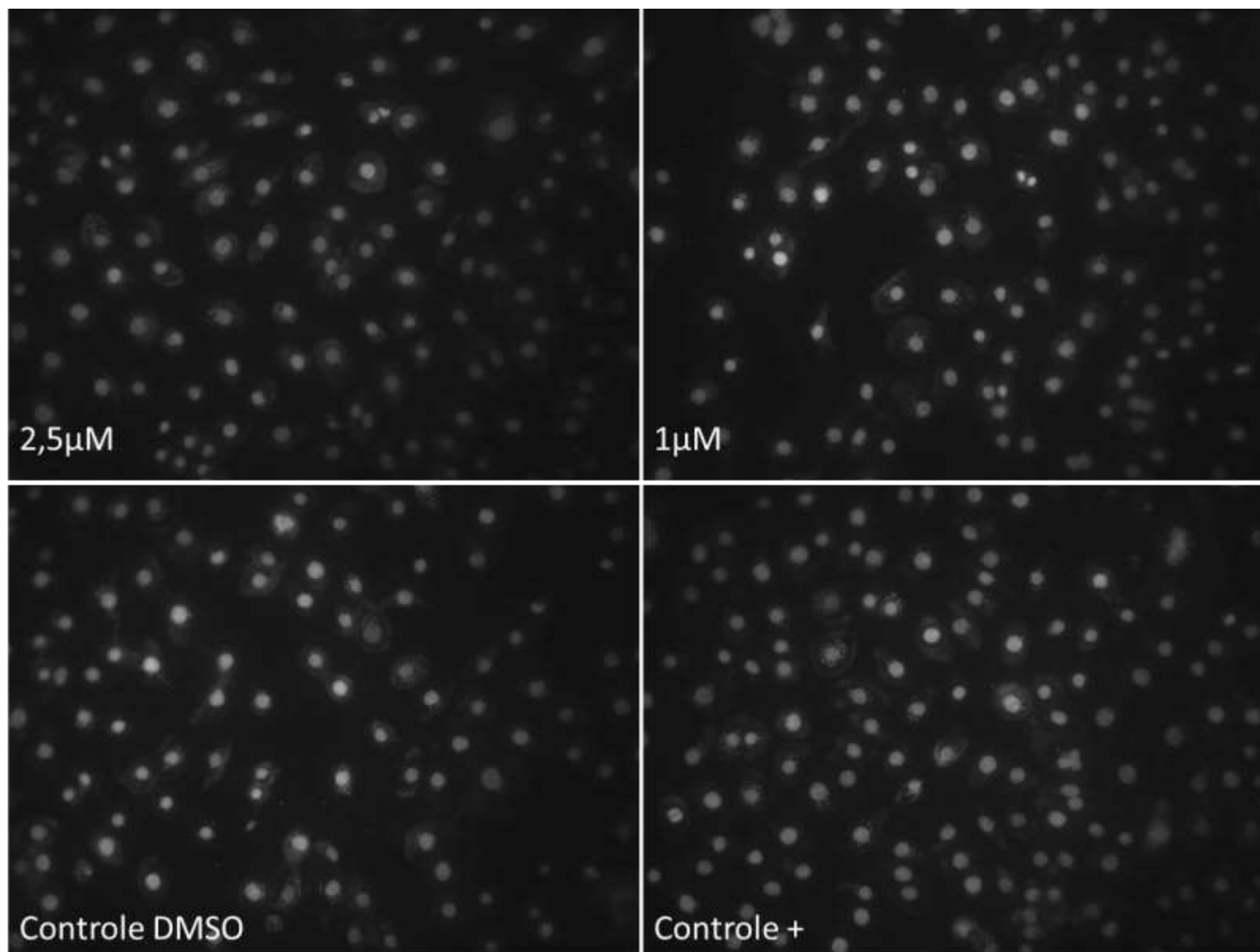


Figura 41. Microscopia de Fluorescência para o composto 4, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.

Podemos ver que a distribuição de células na lamínula ficou bastante homogênea e não excessivamente confluyente, favorecendo a contagem.

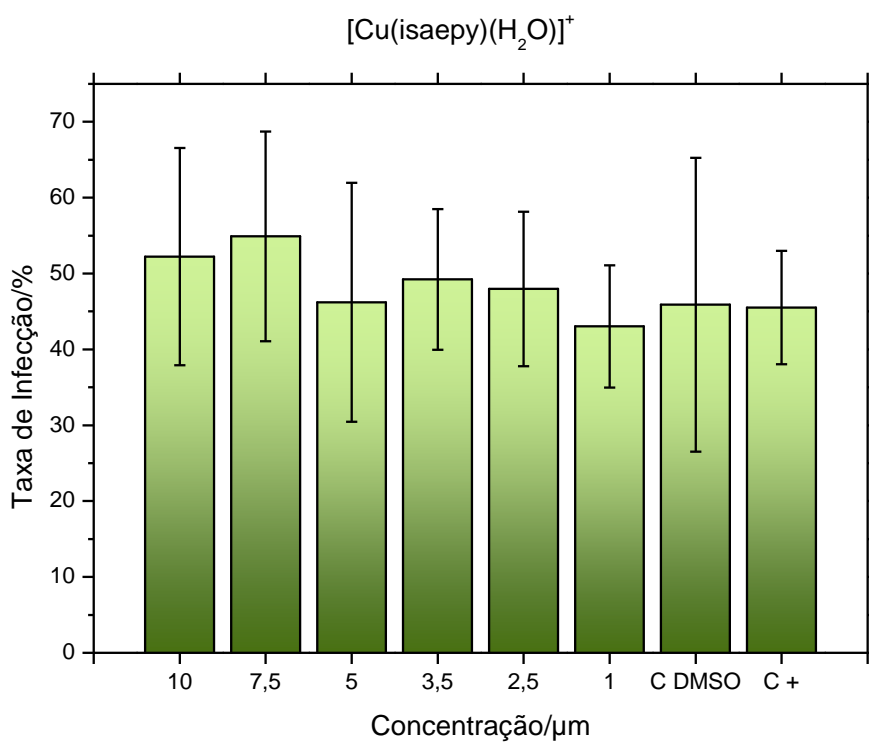


Figura 42. Taxa de infecção para o composto 4, determinada por contagem em Photoshop.

O composto 4 já havia sido testado em análise semelhante⁵⁴, utilizando macrófagos peritonais de camundongos, apresentando taxa de infecção entre 20 e 25%, em concentrações de 9,8 e 19,6 µM, indicando uma considerável taxa de inibição em relação ao controle, próxima a 40%.

Nos experimentos com LLCMK2, não foi possível observar uma inibição de infecção em relação ao controle, com uma taxa de infecção em todas as condições variando entre 45 e 50%, o que pode ser devida à faixa de concentração utilizada, que restringe o efeito do composto.

3.3.2.4 Ensaio de infecção por Microscopia de Fluorescência do composto **5**.

A exemplo do composto **4**, os experimentos com o composto **5** foram executados apenas na faixa de concentração entre 1 e 10 μM .

As imagens de microscopia correspondentes são mostradas das nas Figuras 43 e 44, a seguir.

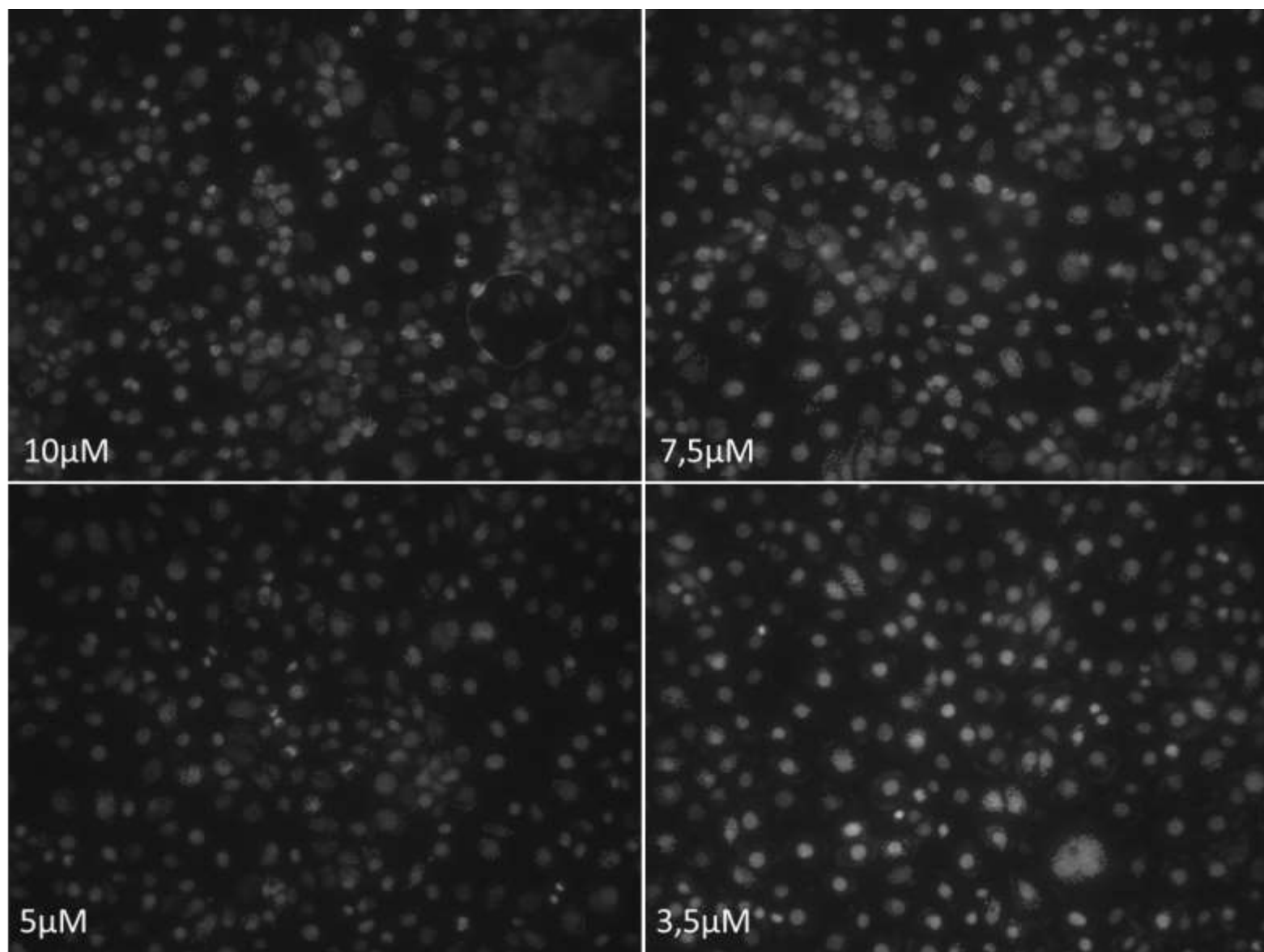


Figura 43. Microscopia de Fluorescência para o composto 5, concentrações de 10 a 3,5 μM .

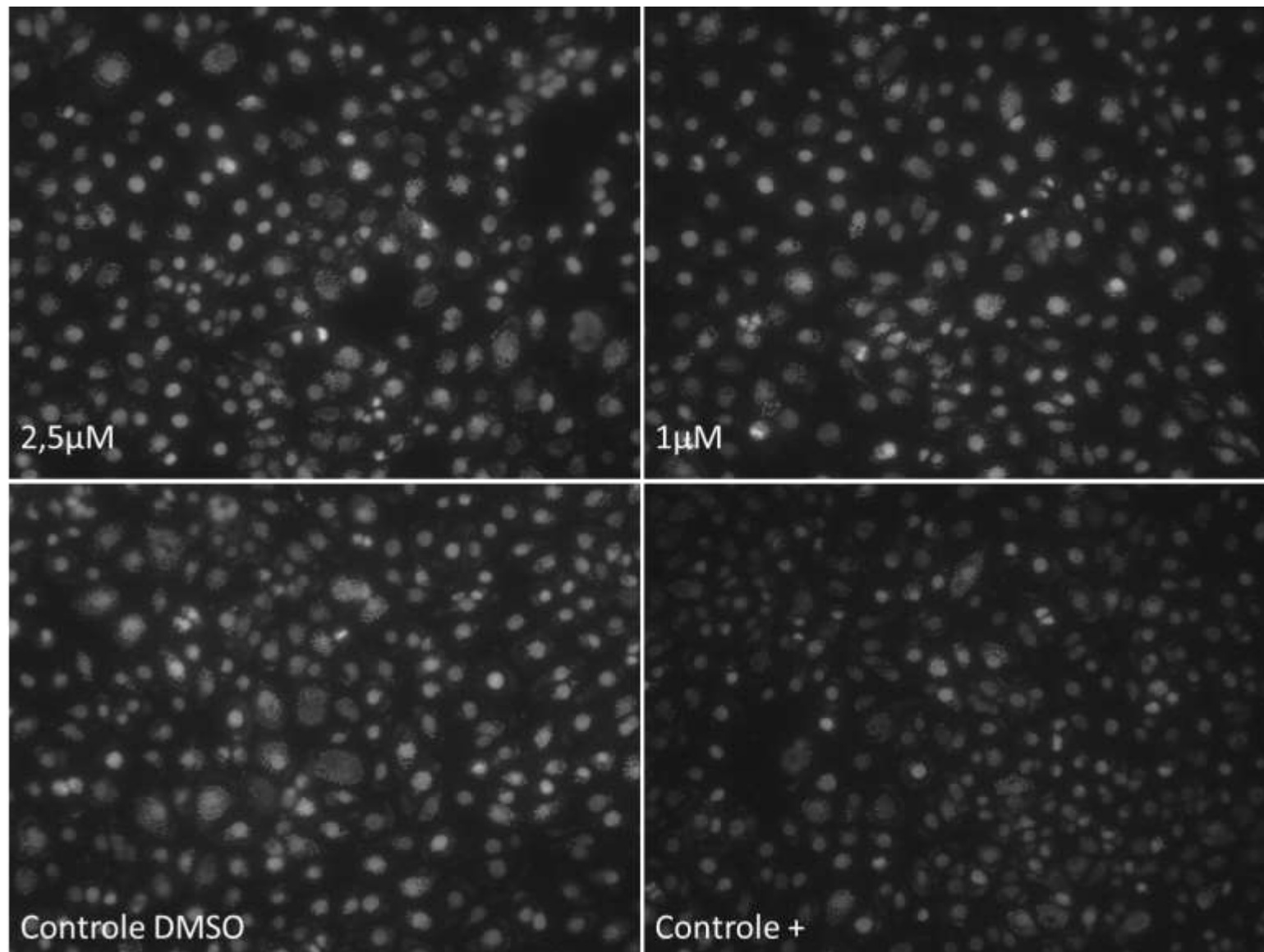


Figura 44. Microscopia de Fluorescência para o composto 5, concentrações 2,5 e 1 μM e controles.

Os experimentos para o composto **5** foram os últimos a serem conduzidos. Nas três triplicatas realizadas, as células cresceram de forma a ocupar mais as lamínulas, estando mais confluentes nas imagens apresentadas, mas sem comprometer o experimento.

As Figuras 43 e 44 mostram as células confluentes, mas ainda permitindo a diferenciação entre as células. O espaçamento entre as células é importante para identificar a quais células pertencem os parasitas nas imagens.

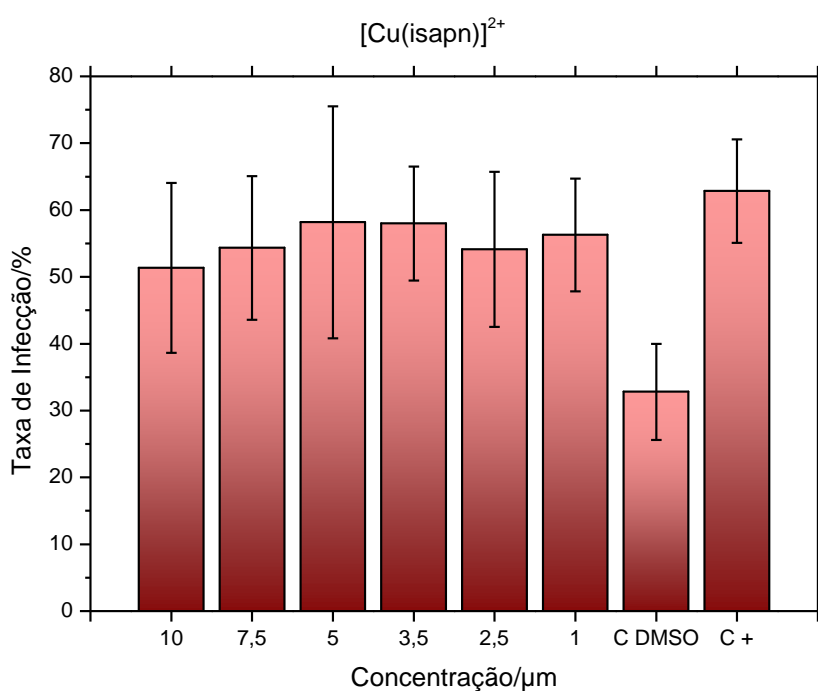


Figura 45. Taxa de infecção para o composto 5, determinada por contagem em Photoshop.

Podemos observar na Figura 45 que a exemplo dos experimentos anteriores, não foi possível observar uma diminuição significativa na taxa de infecção para as células tratadas com o composto. Nominalmente a concentração de $10\mu\text{M}$ apresentou uma média de 51%, um bom resultado se comparada com a média de 62% do controle. Porém, devido ao erro das medidas, eles não devem ser estatisticamente diferenciáveis.

A exemplo dos experimentos com o composto **2**, o controle com DMSO 1% apresentou uma taxa de infecção muito menor que o restante das medidas.

Semelhantemente ao que ocorreu com o composto **2**, para o composto **5** o controle DMSO apresentou uma média de células por imagem menor que os outros pontos medidos.

3.4 Conclusão

A proposta de otimização de um método para a determinação da taxa de infecção de células hospedeiras por *Trypanosoma cruzi*, a partir da contagem de imagens geradas por microscopia de fluorescência, utilizando DAPI como sonda fluorescente, e os compostos mais promissores apontados pelos experimentos do capítulo anterior e por estudos anteriores do grupo, foram executados com sucesso.

Através da contagem manual das imagens geradas, pode-se determinar a taxa de infecção em todos os experimentos propostos, apesar dos compostos testados não terem apresentado efetividade no tratamento das células infectadas. Isso poderia ser atribuído à faixa de concentração testada. Mesmo estando dentro da faixa apresentada no capítulo 2, para a indução de morte celular do tripomastigota de *T. cruzi*. No entanto, a sensibilidade aos compostos por amastigotas isoladas a partir das células infectadas não foi aqui verificada, uma vez que tripomastigotas e amastigotas são formas metabolicamente distintas. É frequente na literatura a descrição de drogas que afetam os tripomastigotas, livres, e não os amastigotas, no interior das células hospedeiras. Neste caso há uma maior complexidade, que depende também da concentração efetiva do composto no interior da célula hospedeira e que pode variar entre tipos celulares. As diferenças entre células poderia explicar os resultados distintos observados com o

composto 4 quando macrófagos⁵⁴ e células epiteliais (LLCMK2) foram utilizados nos testes de células infectadas. Nos testes de tratamentos com os compostos, além da porcentagem de células infectadas, o número de amastigotas intracelulares pode ser um parâmetro importante na análise, quando comparado com os controles. No caso dos compostos testados, os amastigotas intracelulares não foram determinados, uma vez que observando-se as imagens obtidas, não se detectou diferença significativa entre as células tratadas e os controles em cada experimento.

É importante ressaltar que outros estudos na literatura apresentam formas de medir a atividade antiparasitária frente à forma amastigota, utilizando métodos de medição como o MTT⁹¹ e também por imageamento em diferentes linhagens celulares com protocolos mais automatizados^{92,93}.

O principal desafio enfrentado nesses experimentos é a atividade dos compostos frente ao parasita, no meio intracelular, sem afetar de modo significativo as células hospedeiras. Algo que pudemos observar nos primeiros experimentos realizados, utilizando uma faixa de concentração maior, que se mostrou muito agressiva para as células parasitadas. Em concentração mais baixa, os compostos deixaram de ser tão agressivos à célula hospedeira (LLCMK2), porém não mostraram atividade marcante frente ao parasita. Outro ponto a considerar nesta conclusão, é que somente a cepa Y do *T. cruzi* foi utilizada nos ensaios descritos e uma vez que já é conhecida a grande variação de sensibilidade aos compostos entre as diferentes cepas, outras cepas do parasita¹⁵ deveriam ser testadas.

Apesar das adversidades encontradas, os experimentos se mostraram adequados, apresentando um método possível para a determinação da taxa de infecção de células parasitadas, em presença de compostos potencialmente tripanocidas.

Capítulo 4

**Cruzaína como possível
alvo da ação tripanocida de
complexos imínicos de
cobre**

4.1 Considerações Iniciais

Na literatura são diversos os estudos focalizados no desenvolvimento de compostos com atividade antiparasitária significativa, principalmente sobre doenças tropicais negligenciadas, conforme já discutido em capítulos anteriores. Todavia, como mencionado apenas dois fármacos, baseados em nitro compostos foram aprovados e são comerciais. Particularmente, uma gama bastante diversificada de compostos já foi descrita e avaliada como possíveis agentes antichagásicos, incluindo compostos orgânicos, naturais e sintéticos, e compostos inorgânicos metalados. Esses estudos foram realizados com diferentes formas do parasita, tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas, dificultando a comparação dos resultados, obtidos em condições experimentais bem diferentes (concentrações, tempos de tratamento, alvos biológicos, mecanismos de ação, etc.).

O foco, aqui neste trabalho, está principalmente nos possíveis alvos e modos de ação dos compostos preparados, comparativamente aos apresentados na literatura. Será dada ênfase sobre as investigações da atividade anti-tripanosossoma de complexos metálicos com ligantes nitrogenados como hidrazonas, tiosemicarbazonas e iminas, comparados aos nossos resultados com ligantes oxindolimínicos.

Para fins de diferenciação e de melhor entendimento, neste capítulo usaremos a notação IC_{50}^* para representar a concentração do composto necessária para reduzir a atividade da enzima estudada em 50% para diferenciar do IC_{50} observado em culturas celulares, que representa a concentração em que o composto inibe o crescimento celular em 50%.

4.1.1 Prováveis alvos e modos de ação de compostos tripanocidas

Diversos alvos biológicos foram descritos e testados em estudos sobre agentes anti-tripanosomas ou tripanocidas.⁹⁴ Em geral, esses alvos são proteínas ou peptídeos encontrados nos parasitas tripanossomatídeos⁹⁵. Dentre estes destacam-se cisteíno-proteases, como a cruzaina ou cruzipaina⁹⁶, tripanotiona redutase⁹⁷, topoisomerases^{98,99}, tioredoxina redutase¹⁰⁰ e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase^{101,102}. Há algum tempo, algumas patentes também vêm sendo depositadas, baseadas nesses estudos¹⁰³.

Um texto crítico sobre diferenças e similaridades entre os parasitas *T. cruzi* e o hospedeiro humano, visando o desenvolvimento de possíveis fármacos, é encontrado na literatura¹⁰⁴.

O genoma dos tripanossomatídeos, assim como de humanos, codifica uma larga faixa de proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de proteínas, processo importante para regular a atividade das mesmas e, por esta razão, essas proteínas têm sido alvos constantes em muitos estudos.

Outro alvo importante, a tripanotiona redutase (TR), é uma flavoproteína dimérica dependente de NADPH, que está presente em muitos tripanossomatídeos, onde é responsável por catalisar a redução da tripanotiona (Figura 46), mantendo sua homeostase. Esta enzima mantém um ambiente intracelular de caráter redutor, diminuindo a quantidade de EROS. Sua estrutura cristalina já foi determinada, compreendendo duas subunidades (com 968 resíduos de aminoácidos, dois grupos prostéticos FAD, dois íons maleato e 419 moléculas de água¹⁰⁵).

Analogamente, em mamíferos, essa função é feita pelas enzimas glutationa redutase (GR) e glutationa oxidase (GSSG), baseados no tripeptídeo glutationa (*L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina), os quais modulam o metabolismo e impedem parte do estresse oxidativo. A forma reduzida da glutationa (GSH) está presente em alta concentração intracelular (na faixa mM), sendo a principal responsável por manter um ambiente redutor dentro da célula. Entretanto, nos parasitas esse sistema é substituído pelas enzimas mencionadas, as tripanotiona redutases (TR), que participam do sistema tripanotiona peroxidase (vide Figura 47)¹⁰⁶.

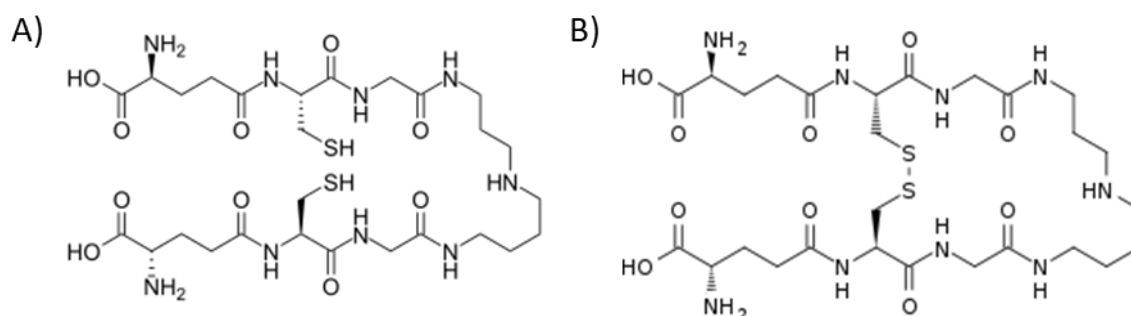


Figura 46. Forma reduzida T(SH)₂ (A) e oxidada TS₂ (B) da tripanotiona, ou N1, N8-bis(glutationil)espermidina.

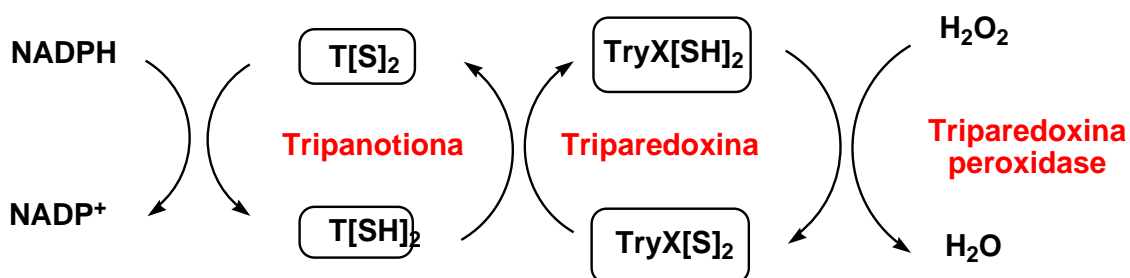


Figura 47. Esquema de reação da enzima tripanotiona redutase em tripanossomas

A inibição da enzima TR pode levar a um acúmulo de EROS, elevando o estresse oxidativo que gera dano nas estruturas celulares do parasita. Por esta razão, fármacos

geradores de EROS, como Nifurtimox ou Benznidazol, interferem na sua atividade, sendo esta enzima um alvo biológico bastante investigado. Dentre os conhecidos inibidores da TR não-peptídicos¹⁰⁷ e peptídicos¹⁰⁸, destacam-se fenotiazinas, como promazina, tiridazina, perfenazina e clorpromazina, responsáveis por causar forte inibição da TR (> 90%)¹⁰⁹ e que também apresentam atividade tripanocida contra as formas epimastigota e tripomastigota do parasita. Esses compostos atuam na mitocôndria, rompendo-a, ou desorganizando membranas.

Dentre os compostos peptídicos, dois deles, [*N*-benziloxycarbonil-Ala-Arg-Arg-4-metoxi- β -naftilamida] e [Bz-Leu-Arg-Arg- β -naftilamida] (vide Figura 48), mostraram elevada atividade inibitória, com valores das constantes K_i de 2,4 μ M e 13,8 μ M, respectivamente. Além disso, o primeiro mostrou seletividade satisfatória seletividade para a enzima parasítica (TR) comparado à enzima humana (glutathione redutase), conferindo um caráter importante a um fármaco, que agride mais o patógeno e em menor grau o paciente.

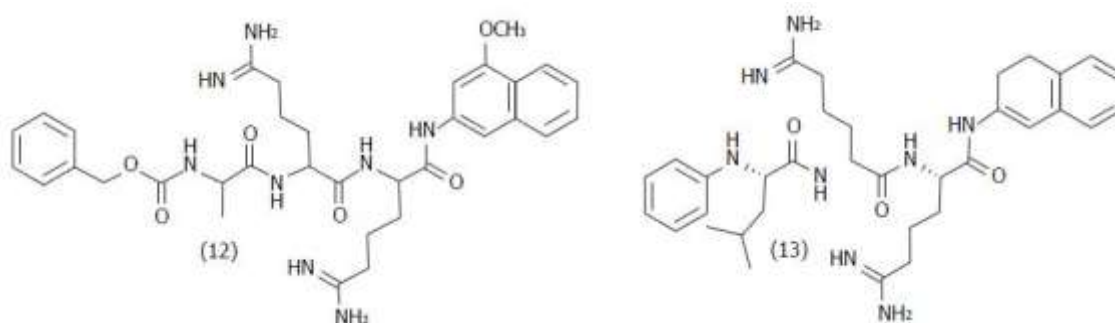


Figura 48. Estrutura de inibidores peptídicos da tripanotona redutase (TR), presente em *T. cruzi*.

Além da TR, a cruzipaina, a principal cisteíno-protease presente nos parasitas, é descrita como um alvo promissor em várias investigações visando um planejamento racional de fármacos^{110,111}. Sua estrutura ligada a um inibidor cetoéster é mostrada na

Figura 49.¹¹² A cruzipaína corresponde a proteína extraída e purificada a partir do *T. cruzi*, com 130 resíduos de aminoácidos na extensão do C-terminal, além do domínio catalítico, enquanto a cruzaina é a enzima recombinante truncada no C-terminal ao redor de 100 resíduos de aminoácidos, utilizada em muitos estudos.¹¹³

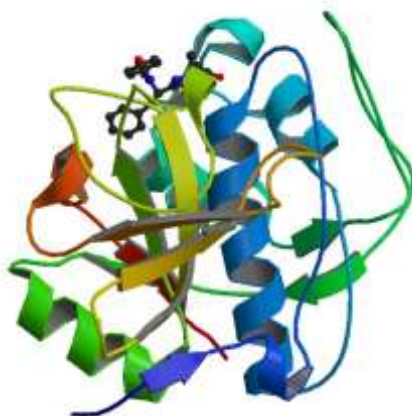


Figura 49. Estrutura da cruzaina ligada a um inibidor α -cetoester¹¹².

Uma outra publicação¹¹⁴ descreve a estrutura dessa proteína ligada a um derivado vinil-sulfona (vide Figura 50) e depositada no PDB (Protein Data Bank) sob código 1F2C.

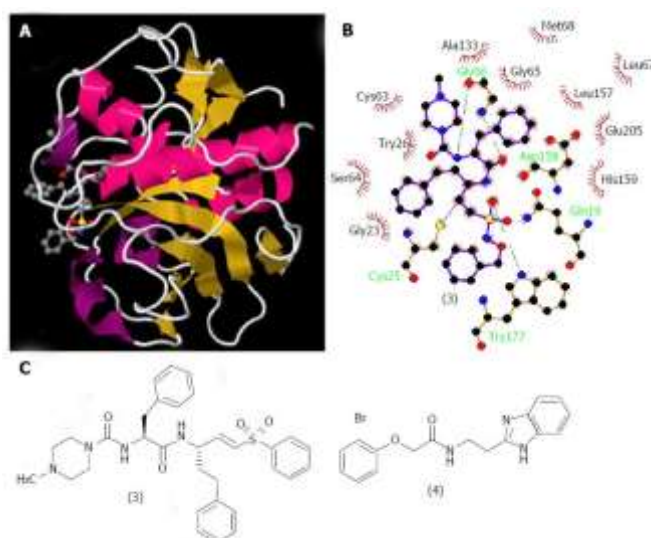


Figura 50. Estrutura tridimensional da cruzaina, (A) cristalizada com um derivado vinil-sulfona, depositada no PDB (Protein Data Bank) sob código 1F2C; (B) Representação esquemática em duas dimensões de seu modo de ligação; (C) Estruturas de dois derivados inibidores¹¹⁴.

Dentre os possíveis alvos citados, neste capítulo iremos explorar a cruzaina como possível alvo de inibição para os compostos estudados.

4.1.2 Cruzaína como alvo biológico

A cruzaina (EC 3.4.22.51), é uma proteína cisteíno-protease, presente nas várias etapas do ciclo de vida do *T. cruzi*, onde desempenha diversas funções ¹¹⁵. Portanto, constitui um alvo importante de inúmeras investigações visando o desenvolvimento de um composto quimioterápico eficiente, realizadas por diversos grupos de pesquisa,¹¹⁶ com diferentes compostos, e abrangendo mecanismos de inibição tanto reversível, como irreversível.¹¹⁷

Diferentes compostos, como análogos de uma indolamina, 8-cloro-N-(3-morfolinopropil)-5H-pirimido[5,4-b]indol-4-amina, contendo grupamentos indólicos, pirimidina, quinolina, foram testados sobre diferentes formas do parasita (vide Figura 51). Outros compostos contendo também os grupamentos anilina ou pirrol foram investigados quanto à sua atividade inibitória sobre a cruzaina.⁹⁶

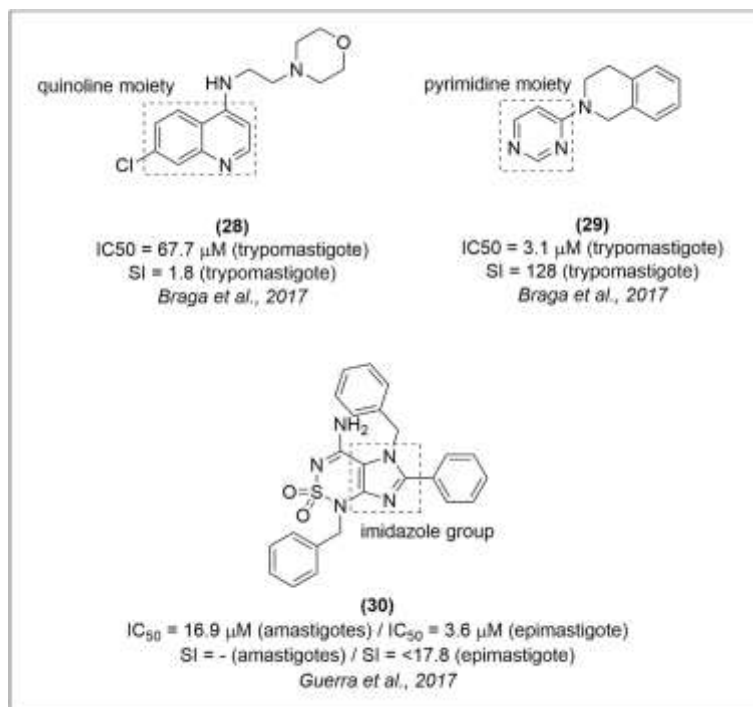


Figura 51. Estruturas de compostos derivados de indolamina contendo grupamentos quinolina, pirimidina ou imidazol, com boa atividade anti-tripanosossoma baseada na inibição da proteína cruzaina¹¹⁶.

Derivados de 4-aminoquinolina foram os mais ativos, apresentando IC₅₀ na faixa de 15 a 125 μM, sendo assim bastante tóxicos para o parasita *T. cruzi*. Entretanto, um dos derivados pirimidínicos, embora muito ativo sobre os parasitas, com índice de seletividade SI= 128, comparado a fibroblastos não-infectados, não inibiu significativamente a cruzaina.

Derivados de imidazol, desenvolvidos a partir de triagem ou varredura (*screening*) computacional, também foram sintetizados e tiveram sua atividade biológica avaliada. O composto mais ativo desta série (Fig 6, composto 30) mostrou ser altamente tóxico contra epimastigotas de *T. cruzi* de três cepas diferentes (Tulahuen 2, CL-clone B5 e Y), com valores de IC₅₀ de 4,5 μM, 3,6 μM, e 16,9 μM respectivamente. Este composto foi ainda ativo sobre as formas amastigotas (cepa CL-clone B5) com IC₅₀ de 19,9 μM. Sua

atividade inibitória sobre a cruzaina foi então verificada, apresentando valor de $IC_{50}=81 \pm 4 \mu M^{118}$.

Derivados arila de tiosemicarbazonas também apresentaram atividade anti-tripanosossoma baseada na inibição da cruzaina⁹⁷. Estudos de relações estrutura e reatividade (SAR) indicaram que substituintes halogenados ou apolares nos grupamentos arila favorecem tanto a atividade antiparasitária como a inibitória da cruzaina.

Em outro trabalho,¹¹⁹ planejou-se e sintetizou-se mais de 100 compostos tiosemicarbazonas que mostraram seletividade frente a *T. cruzi*, com IC_{50} na faixa nM, e que também inibiram cruzaina por mecanismo dependente do tempo de exposição.

Em artigo recente do grupo do Prof. Luís Carlos Dias, da Unicamp⁴⁶, descreve-se o planejamento através de SAR, em estudos de modelagem molecular, sínteses e avaliação de imidas cíclicas como inibidores da cruzaina, com IC_{50} na faixa 0,6 a 2,2 μM contra amastigotas intracelulares do parasita. Muitos dos compostos foram pouco tóxicos sobre fibroblastos humanos, com bons índices de seletividade para o parasita.

O mesmo grupo relatou mais de 40 análogos derivados de benznidazol, sintetizados para otimização de uma classe de inibidores não-covalentes da cruzaina, a partir de um composto líder co-cristalizado com a enzima (com $K_i = 0,8 \mu M$)⁴⁷. Cerca de 12 dos compostos estudados apresentaram valores de IC_{50}^* menores que 10 μM e mostraram-se inibidores competitivos reversíveis da cruzaina. Além disso, compostos derivados de isatina também já foram avaliados como inibidores de cruzaina, com IC_{50}^* entre 2 e 100 μM , comparando uma série de substituintes em diversas posições da estrutura da isatina, como o anel benzênico ou no nitrogênio indólico. Dentre os resultados reportados, a adição de compostos com grupamento benzil em conjunto com

a metilação da posição 5 do anel benzênico da isatina se mostraram mais eficientes para inibição da cruzaína¹²⁰.

Assim, baseado nesses estudos relatados, verificou-se a possível atividade inibitória de nossos complexos de cobre ou zinco com ligantes imínicos (a maioria derivados do oxindol isatina) frente à enzima cruzaína. Com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Wagner Alves de Souza Júdice, do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica, da Universidade de Mogi das Cruzes (Mogi das Cruzes, SP) pudemos obter resultados bastante promissores, conforme descritos abaixo.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Ensaio de inibição da enzima cruzaína

Para a realização dos ensaios de inibição, a cruzaína foi incubada em tampão acetato de sódio 100 mM, contendo EDTA 5 mM, cloreto de sódio 100 mM, Triton-X-100 0,01%, glicerol 20% em pH = 5,5, DTT (Ditiotreitol) 3mM, por 10 min a 37°C, sob agitação constante. Após incubação foi adicionado o substrato fluorogênico Z-FR-AMC para concentração final de 9,25 uM. O monitoramento da atividade enzimática da cruzaína foi realizado em espectrofluorímetro HITACHI F2700¹²¹ nos comprimentos de onda $\lambda_{ex} = 360$ nm e $\lambda_{em} = 480$ nm, em sistema óptico de 10 mm em cubetas de quartzo com volumes finais de 1 mL acompanhando a hidrólise do substrato Z-FR-AMC e quantificado a liberação de AMC livre em função do tempo fornecendo a taxa de hidrólise em UAF/min (Unidades Arbitrárias de Fluorescências por minuto).

Nos ensaios de inibição procedeu-se à adição de concentrações crescentes do composto focalizado até a estabilização do decaimento da atividade enzimática. Utilizou-se a equação 2 para determinação do potencial inibitório IC_{50}^* . No cálculo da atividade enzimática, comparou-se as velocidades iniciais da reação em DMSO, como controle. As correspondentes curvas de IC_{50}^* foram determinadas em pelo menos dois experimentos independentes, envolvendo pelo menos 4 concentrações, em triplicata. Ajustes das curvas não-lineares foram obtidos através do programa *Grafit 5.0.13*.

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} \quad (2)$$

Mecanismos de inibição da cruzaina foram verificados utilizando o mesmo procedimento descrito acima, com modificações. Foi mensurada a atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato obtendo-se uma curva hiperbólica retangular (Velocidade em UAF/min vs [substrato] (sendo UAF – Unidades Arbitrárias de Fluorescência) e analisada utilizando a equação de Michaelis-Menten (Equação 3).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

O mesmo ensaio foi realizado em pelo menos 4 diferentes concentrações fixas do composto. Os dados foram então analisados num gráfico e os respectivos parâmetros cinéticos de inibição foram determinados a partir dos gráficos das inclinações e interceptos das retas provenientes do gráfico dos inversos (Liveweaver-Burk) e analisados em programa *Grafit 5.0.13*.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Resultados de IC₅₀* para Inibição de Cruzaína.

Para o ensaio de inibição de cruzaína foram selecionados os compostos [Cu(isaenim)] (1), [Cu(isabmz)] (2) e [Cu(isapn)] (5), buscando aumentar o grau de entendimento em relação a interação com a proteína, baseada nas características dos compostos. Também foram testados um análogo de zinco para o composto 5, [Zn(isapn)] (6) e o ligante isapn livre (7).

Os valores de IC₅₀* obtidos para a inibição da atividade da cisteíno protease cruzaína podem ser observados na Tabela 17 abaixo.

Tabela 17. Potencial inibitório (IC₅₀*) dos compostos na atividade da cisteíno protease cruzaína. NI = Não Inibe.

Composto	IC ₅₀ * (μM)
[Cu(isaenim)] (1)	9,49 ± 0,63
[Cu(isabmz)] (2)	NI
[Cu(isapn)] (5)	12,48 ± 0,62
[Zn(isapn)] (6)	2,98 ± 0,41
Isapn (7)	20,14 ± 1,31

O valor encontrado de IC₅₀* para o composto 1 está em uma faixa muito próxima do calculado para o IC₅₀ frente à forma tripomastigota apresentado no capítulo 2. Já o composto 2 não apresentou inibição da cruzaína, embora, o mesmo composto tenha apresentado eficiência como tripanocida. Isso sugere que o efeito do composto 2 provavelmente não ocorre pela inibição da supracitada enzima.

Ao avaliar o composto **5** e seu análogo de zinco (**6**), junto com o ligante livre (**7**), observamos que o ligante livre isapn apresenta um maior valor de IC_{50}^* comparado com os compostos metalados, indicando que a presença do metal potencializa a atuação do ligante.

Comparando os compostos análogos com cobre (**5**) e zinco (**6**), observamos que o composto metalado com zinco é aproximadamente quatro vezes mais eficaz para a inibição da cruzáina, quando comparado com o de cobre. Isso pode indicar que a capacidade redox apresentada pelo cobre não tem grande impacto ou efeito no mecanismo de inibição.

4.3.2 Inibição da cruzáina pelo composto [Cu(isaenim)] (**1**).

Os resultados dos estudos de inibição da cruzáina estão apresentados nas Figuras 52 a 55, para os diferentes compostos testados.

Na Figura 52 tem-se os dados obtidos com o complexo **1**.

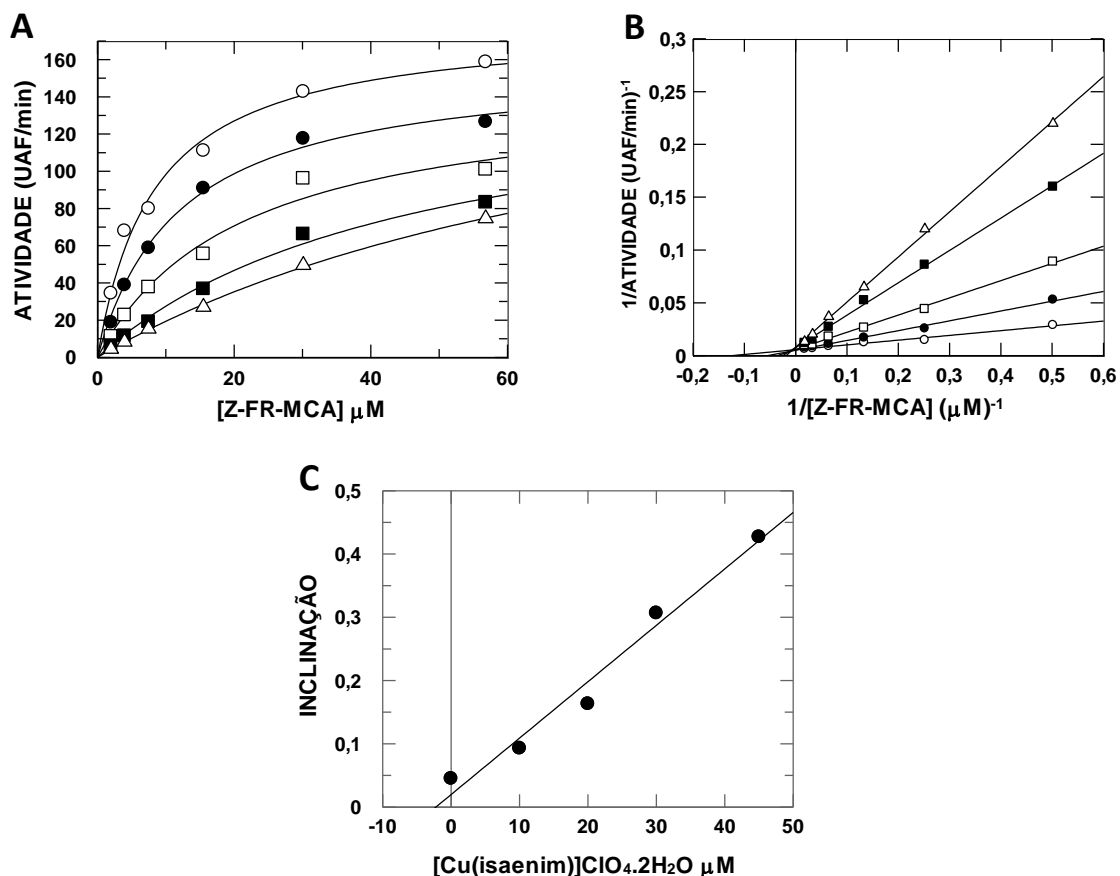


Figura 52. A) Gráfico de Michaelis-Menten para inibição com o complexo $[\text{Cu(isaenim)}]$ (1); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus concentração do inibidor. Em A e B: $\circ \rightarrow$ controle; $\bullet \rightarrow$ 10 μM ; $\square \rightarrow$ 20 μM ; $\blacksquare \rightarrow$ 30 μM ; $\triangle \rightarrow$ 45 μM .

Podemos observar pelo gráfico de Michaelis-Menten, atividade enzimática versus concentração do substrato, que com o aumento na concentração de composto convergem para um mesmo valor de velocidade máxima da reação, o que indica que o composto está atuando sobre a enzima de forma competitiva. Ao fazer o gráfico de Lineweaver-Burk (inverso da atividade versus inverso da concentração de substrato) observa-se que todas as curvas se cruzam no mesmo ponto de $1/v_0$, onde $1/v_0$ é igual a $1/V_{\text{max}}$. Isso indica que se trata de uma inibição competitiva.

O valor encontrado para a inclinação no gráfico de Lineweaver-Burk é diretamente proporcional ao K_m , sendo esta a constante de equilíbrio de formação do complexo enzima-substrato. Na Figura 52C verificamos uma correlação linear entre os coeficientes angulares das retas do gráfico de Lineweaver-Burk e a concentração de inibidor. Assim observamos que a reação mostra dependência linear com o aumento da concentração de inibidor e variação do K_m sem modificação da V_{max} , e pelos resultados apresentados, podemos afirmar que se trata de um mecanismo clássico de inibição competitiva linear simples.

4.3.3 Inibição da cruzaína pelo composto [Cu(isapn)] (5).

Analogamente, na Figura 53 são apresentados os resultados com o complexo [Cu(isapn)] (5).

Ao observar a Figura 53, podemos ver que o comportamento do complexo [Cu(isapn)] 5 é semelhante ao apresentado pelo complexo [Cu(isaenim)] 1, isto é, verifica-se um aumento linear da atividade inibitória da cruzaína com concentrações crescentes de inibidor sem alteração de V_{max} e, de acordo com os gráficos 51B e 51C, estabelece-se um mecanismo competitivo linear simples.

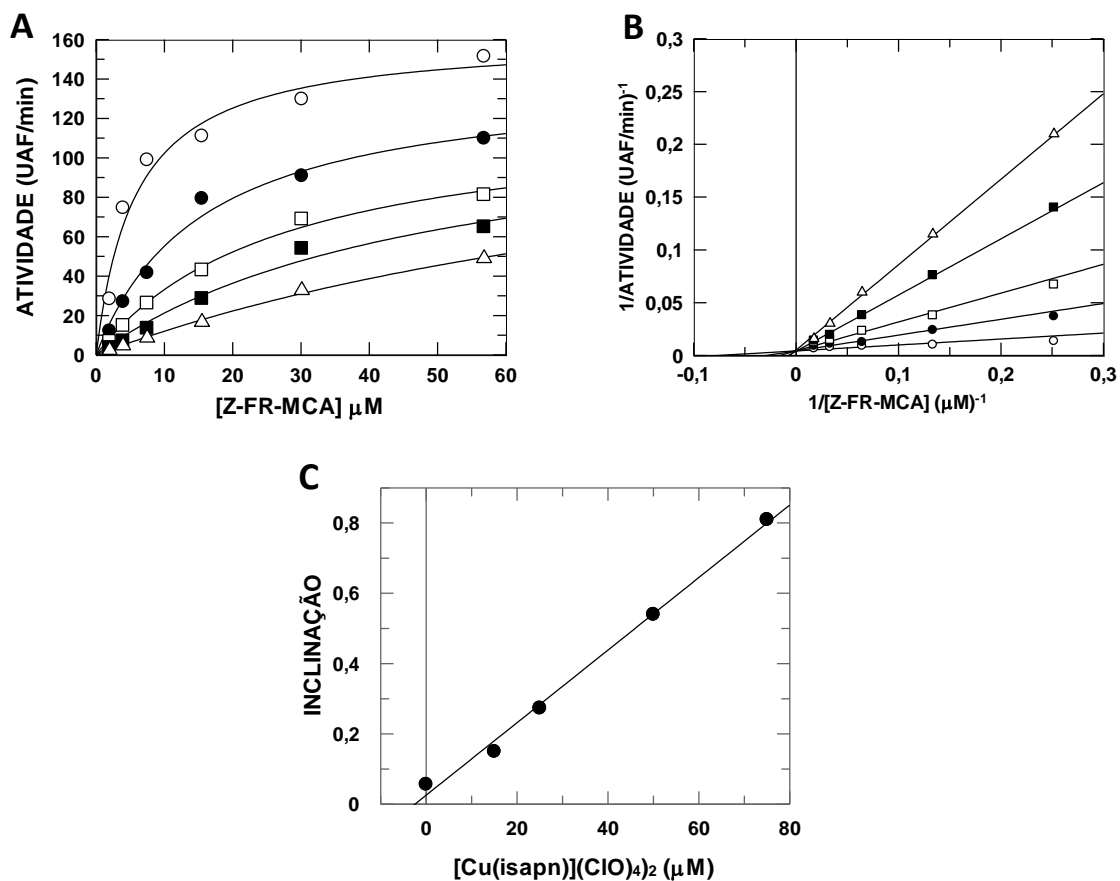


Figura 53. A) Gráfico de Michaelis-Menten para inibição com o complexo [Cu(isapn)] (5); B) Gráfico dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação versus concentração do inibidor. Em A e B:

○ → controle; ● → 10 μM ; □ → 20 μM ; ■ → 30 μM ; △ → 45 μM .

4.3.4 Inibição da cruzaina pelo composto [Zn(isapn)] (6).

Ao se comparar os resultados de inibição dos complexos análogos de isapn com íons de cobre(II) (5) e de zinco(II) (6), verifica-se que o composto de zinco foi mais ativo, como demonstrado na Tabela 17 (pág. 117), tendo seu valor de IC_{50}^* medido em aproximadamente 3 μM , comparado ao valor de aproximadamente 12,5 μM obtido para o complexo de cobre (5). O complexo de zinco também teve seu mecanismo investigado a partir dos resultados obtidos com o gráfico de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, mostrados na Figura 54.

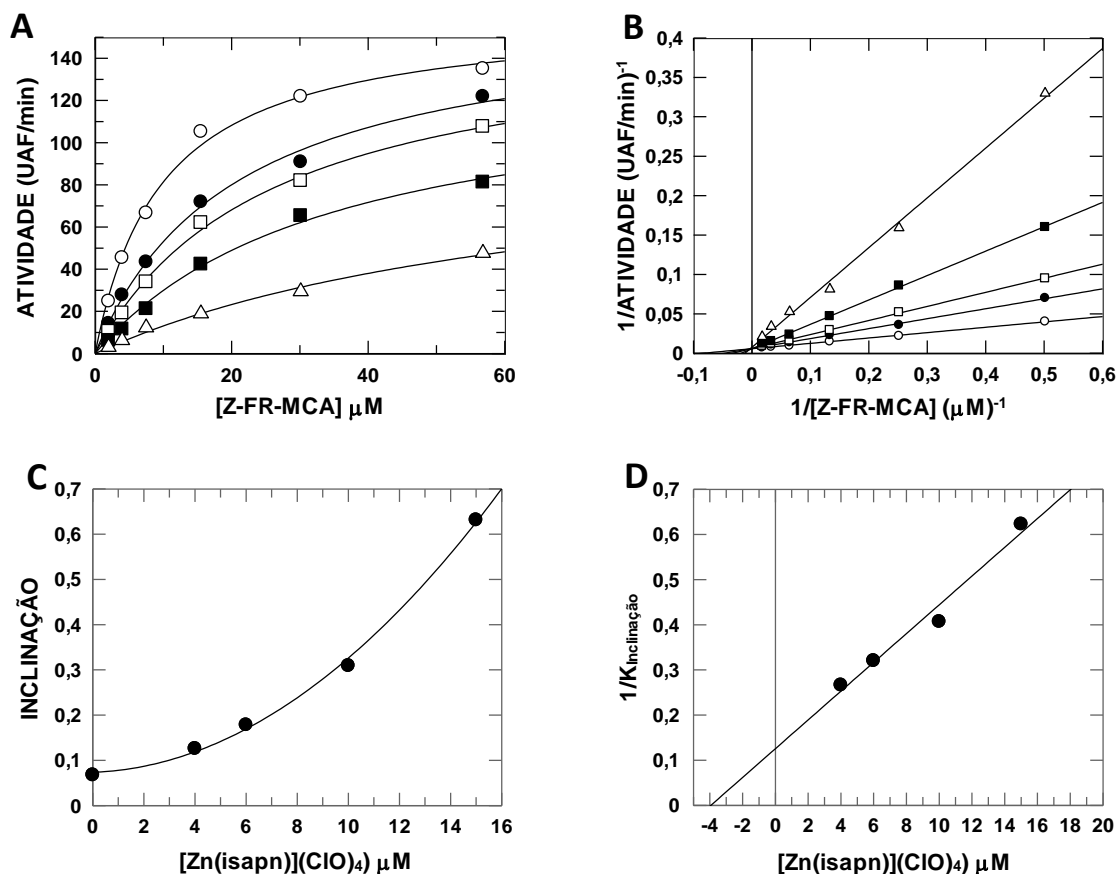


Figura 54. A) Gráfico de Michaelis-Menten relativo ao composto [Zn(isapn)] (6); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus concentração do inibidor; D) Gráfico $1/K_{\text{inclinação}}$ versus concentração do inibidor. Em A e B: $\circ \rightarrow$ controle; $\bullet \rightarrow$ 4 μM ; $\square \rightarrow$ 6 μM ; $\blacksquare \rightarrow$ 10 μM ; $\triangle \rightarrow$ 15 μM .

Observando apenas os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, poderíamos afirmar que também se trata de um mecanismo de inibição competitivo clássico, semelhante ao apresentado para os complexos de cobre mostrados acima. Porém, ao montar o gráfico da inclinação do gráfico B pela concentração do composto inibidor, vemos que este corresponde a uma parábola, diferentemente dos compostos de cobre 1 e 5, onde o mesmo gráfico (análogo) apresentou uma correlação linear.

Por conta da correlação entre a inclinação do gráfico de Lineweaver-Burk, apresentado na Figura 54C, ser uma função de segundo grau, podemos afirmar que o

efeito de inibição apresentado pelo composto de zinco **6** envolve a interação de duas moléculas de composto para uma de proteína. Podendo uma molécula de inibidor atuar no sítio catalítico da enzima e a segunda de forma alostérica, podendo existir um fator de cooperatividade entre as duas moléculas de inibidor, onde a entrada da primeira molécula no sítio de inibição pode favorecer ou dificultar a entrada da segunda.

4.3.5 Inibição da cruzaína pelo ligante livre isapn (**7**).

Para efeito de comparação, os experimentos também foram realizados com o ligante livre, isapn (**7**). Neste caso, o comportamento das curvas em função das concentrações do inibidor se assemelha com aquele observado com o composto [Zn(isapn)] (**6**), diferindo substancialmente dos gráficos verificados com o composto análogo de cobre [Cu(isapn)] (**5**).

Estes resultados indicam que se tem pelo menos dois mecanismos diferentes de ação inibitória frente a cruzaína: um competitivo, verificado com os complexos de cobre (**1**) e (**5**), e outro observado com o mesmo ligante livre isapn (**7**) ou com o complexo análogo de zinco (**6**), também competitivo, mas envolvendo duas moléculas do inibidor.

Observamos que os gráficos apresentados na Figura 55 são muito semelhantes aos observados na Figura 54.

O ligante livre apresentou um maior valor de IC_{50}^* , ou seja, é necessária uma concentração maior do composto para reduzir a atividade da enzima a 50%, quando comparado aos demais compostos testados. Apesar disso ele apresentou um mecanismo de ação semelhante ao composto **6**, onde observamos a atuação de duas moléculas de composto sobre uma de proteína, e que apresentou o melhor valor para IC_{50}^* entre os compostos testados.

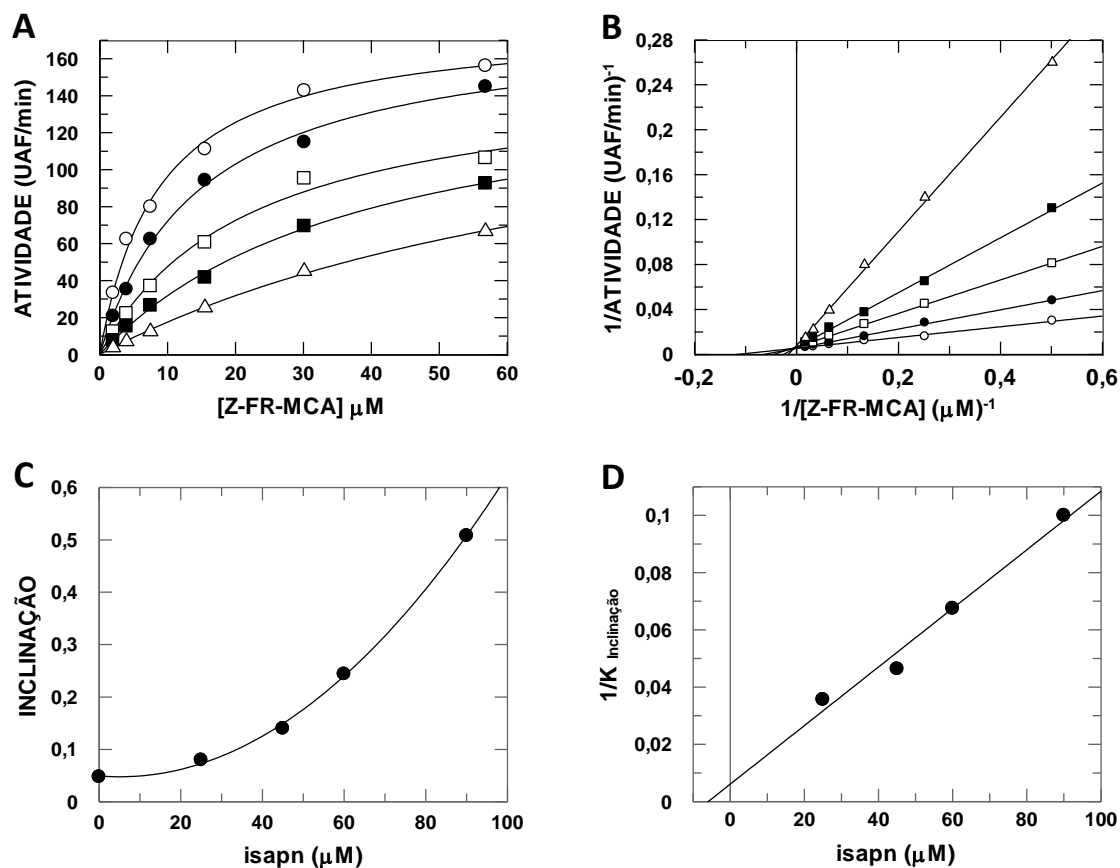


Figura 55. A) Gráfico de Michaelis-Menten referente ao ligante livre isapn (7); B) Gráfico correspondente dos inversos (Lineweaver-Burk); C) Gráfico da inclinação em B versus [isapn]; D) Gráfico $1/K_{\text{inclinação}}$ versus concentração do inibidor. Em A e B: $\circ \rightarrow$ controle; $\bullet \rightarrow$ 25 μM ; $\square \rightarrow$ 45 μM ; $\blacksquare \rightarrow$ 60 μM ; $\triangle \rightarrow$ 90 μM .

4.3.6 Parâmetros cinéticos obtidos e possíveis mecanismos de inibição.

Os valores para os parâmetros cinéticos determinados (vide Tabela 18) indicaram pelo menos dois tipos de mecanismo de ação desses compostos estudados, conforme mostrado nas Figuras 56 e 57.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos de inibição da cisteíno protease cruzaina, por complexos metálicos contendo os ligantes isapn ou isaenim, comparados aos valores de IC₅₀* (μM) ou correspondentes potenciais inibitórios.

COMPOSTOS	Ki	αKi	α	IC ₅₀ * (μM)
isapn (7)	328 ± 29	3,05 ± 0,31	0,0093	20,14 ± 1,31
[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ (5)	2,42 ± 0,12	-----	-----	12,48 ± 0,62
[Zn(isapn)](ClO ₄) (6)	15,9 ± 1,4	1,97 ± 0,23	0,124	2,98 ± 0,41
[Cu(isaenim)]ClO ₄ ·2H ₂ O (1)	2,21 ± 0,19	-----	-----	9,49 ± 0,63

A constante de equilíbrio **Ki** refere-se à formação da espécie EI (enzima-inibidor) e indica a afinidade do inibidor pela enzima. Quanto maior for **Ki**, maior será a interação do inibidor com a enzima, levando à inibição da formação da espécie ES (enzima-substrato) e, portanto, a um maior potencial inibitório do composto.

Pelos valores apresentados na Tabela 18 para o **Ki**, notamos que o ligante livre, isapn (7), possui uma altíssima afinidade pela enzima, tendo seu valor de **Ki** duas ordens de grandeza maior que o dos demais compostos. Entretanto, essa alta afinidade pela enzima não se traduz em um maior efeito inibitório, como mostrado nas Tabelas 17 e 17, onde o isapn apresentou o maior valor de IC₅₀*. Lembrar que IC₅₀* corresponde à concentração de composto que leva a 50% da atividade da enzima. Este comportamento pode ser interpretado através de uma mudança na conformação da enzima após a interação com o ligante isapn, levando a uma conformação mais fechada, que dificultaria ou facilitaria a interação com o substrato.

Um comportamento deste tipo foi descrito para a interação da cruzaina com um inibidor não-peptídico, 2-[2-(1H-1,2,4-triazol-5-ilsulfanil)etanoilamino]tiofeno-3-carboxamida ou **Nequimed176** (NEQ176).¹²²

Outra possibilidade seria haver uma interação do ligante livre isapn (**7**) num sítio alostérico que não afetaria significativamente a atividade da enzima.

Estudos de simulação, através de docking e dinâmica molecular, poderiam auxiliar bastante a elucidação dos modos de ação do ligante livre, comparado ao dos compostos metalados com cobre ou zinco.

Por outro lado, os complexos de cobre, **1** e **5**, mostraram altas afinidades pela cruzaina, com valores de K_i 2,21 e 2,42, respectivamente. Também apresentaram resultados promissores quanto à inibição da enzima, com valores de IC_{50}^* 9,49 μM e 12,48 μM , respectivamente. Entretanto, o complexo de zinco (**6**), apresentou um valor de K_i muito acima dos complexos de cobre, porém aproximadamente 21 vezes menor que o do ligante livre. Adicionalmente, este composto apresentou o melhor potencial inibitório da série estudada ($IC_{50}^* = 2,98 \mu\text{M}$).

Assim, os resultados levam a crer que o comportamento desses compostos frente à cruzaina é diferente, embora todos tenham apresentado um mecanismo de inibição do tipo competitivo.

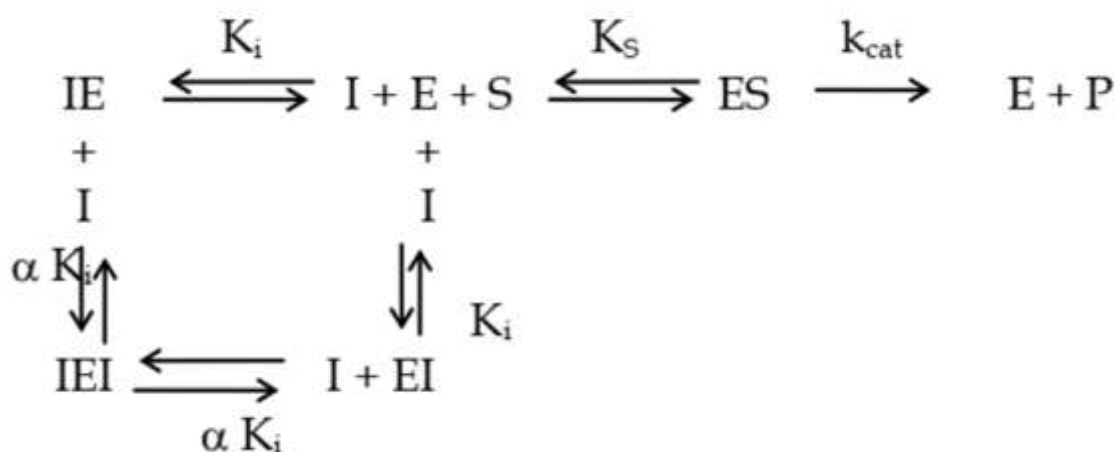
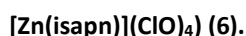


Figura 56. Mecanismo proposto para inibição da cruzaina pelos compostos isapn (**7**) e



No caso do ligante livre isapn (**7**) e do complexo de zinco, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO})_4$ (**6**), observou-se que o mecanismo ocorre com um equilíbrio competitivo de formação da espécie EI (Enzima-Inibidor) e IEI (Inibidor-Enzima-Inibidor) em relação à espécie ES (Enzima-Substrato). Esse esquema é proposto a partir da análise dos gráficos das Figuras 54C e 55C, definido como inibição competitiva parabólica com cooperatividade.

No esquema apresentado na Figura 56, o coeficiente α corresponde ao fator de cooperatividade entre as moléculas de inibidor, onde um valor de $\alpha \ll 1$ corresponde à cooperatividade positiva, isto é, onde a ligação da primeira molécula de inibidor à proteína favorece a interação com a segunda molécula. E um valor de $\alpha \gg 1$ corresponderia a cooperatividade negativa, em que a entrada da primeira molécula atrapalha a ligação da segunda.

A partir dos valores de α apresentados na Tabela 18, ambos os compostos estudados (**6** e **7**), apresentam cooperatividade positiva. Porém não é possível determinar qual dos sítios, catalítico ou alostérico, é ocupado primeiro.

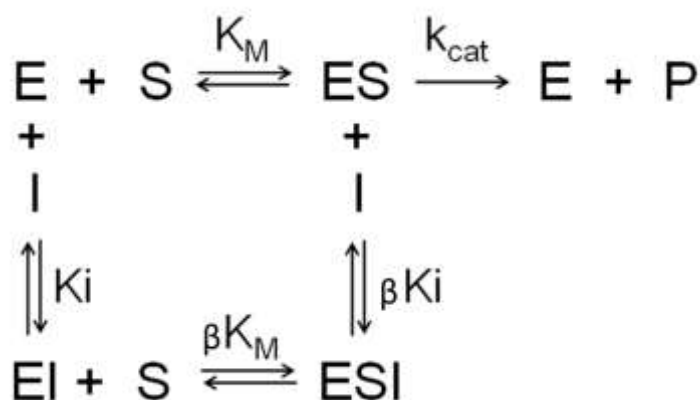


Figura 57. Mecanismo proposto pela inibição da cruzaina pelos compostos $[\text{Cu}(\text{isaenim})]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) e $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO})_4$ (**5**).

A Figura 57 ilustra o mecanismo clássico de competitividade¹²³, podendo um composto se ligar à enzima livre e ou ao complexo ES, neste caso com $\beta \neq 0$, definindo um mecanismo não-competitivo.

No caso da reação em presença dos complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ (**5**) e $[\text{Cu}(\text{isaenim})]\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**), tem-se a formação da espécie EI, e o gráfico da inclinação em função da concentração de composto (gráficos das figuras 52C e 53C) foi linear, indicando um mecanismo clássico competitivo. Dessa forma, para os compostos **1** e **5**, temos o valor de β igual a 0. Neste caso, a entrada dos inibidores ocorre apenas sobre a enzima (E) e não sobre o complexo ativado enzima-substrato (ES) (Figura 58).

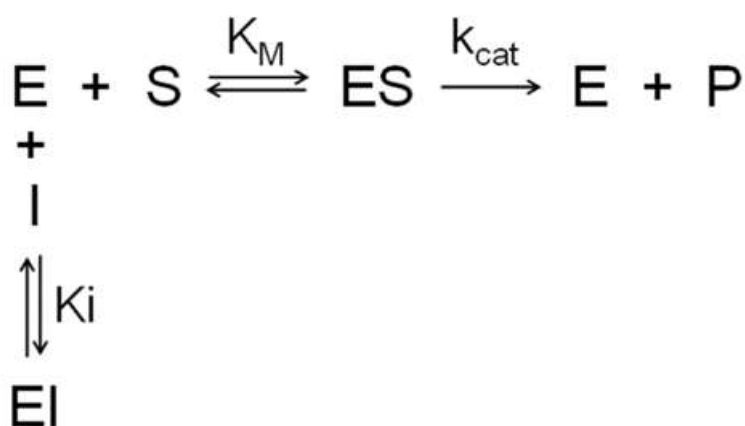


Figura 58. Mecanismo simplificado representando o mecanismo clássico de competitividade.

Um esquema semelhante de competitividade linear foi proposto para explicar o efeito de inibição observado na atividade protease da cathepsina B e L, em presença de um alcalóide natural, S4 (4-Deoxyraputindole C), com atividade antitumoral frente a linfomas e carcinomas¹²³. Neste caso, em particular, um mecanismo adicional de inibição não-linear com cooperatividade negativa também foi observado.

4.4 Conclusões

As investigações aqui descritas mostram que a cruzaina é um provável alvo biológico dos complexos de cobre ou zinco estudados, numa faixa de concentração até 20 μ M, conforme os gráficos apresentados. Todos os compostos metalados foram mais ativos que o ligante livre, verificado para os compostos contendo o ligante isapn, conforme mostrado pelos valores de IC₅₀* apresentados na Tabela 17.

Comparando-se os compostos de cobre, [Cu(isapn)](ClO₄)₂ (**5**) e [Cu(isaenim)]ClO₄·2H₂O (**1**), os valores de Ki obtidos são semelhantes e o seu provável mecanismo de ação é característico de um processo competitivo (formação de ES ou EI), denominado mecanismo clássico de competitividade. Porém, a consequente formação de uma espécie terciária **ESI** (Enzima-Substrato-Inibidor), não ocorre neste caso uma vez que $\beta=0$.

Ao contrário, no caso do ligante livre isapn (**7**) e o complexo correspondente de zinco [Zn(isapn)](ClO₄)₄ (**6**), o mecanismo proposto ocorre através da interação de duas moléculas de inibidor com a enzima, em que se caracteriza um mecanismo competitivo parabólico de cooperatividade, onde ambos os compostos estudados apresentaram cooperatividade positiva, ou seja, a entrada da primeira molécula de inibidor, seja no sítio catalítico ou alostérico, uma vez que o evento é randômico, favorece a entrada da segunda molécula. No caso do ligante livre, provavelmente tem-se uma mudança de conformação da enzima, já que a maior afinidade do inibidor não correspondeu a um maior potencial inibitório, ao contrário, levou a um valor de IC₅₀* maior.

Dos compostos estudados apenas o composto **2** não apresentou inibição frente à cruzaina. Uma possível explicação para tal é que por possuir um ligante mais volumoso,

o complexo **2** pode sofrer maior impedimento estérico, dificultando sua interação com a proteína e, portanto, sua capacidade de inibir a cruzaina.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Nossos estudos demonstraram uma boa atividade antitripanossoma dos diversos complexos investigados. Três complexos de cobre foram sintetizados e caracterizados utilizando diversas técnicas como Espectroscopia UV-Visível, Infravermelho, EPR, além de técnicas adicionais como análise elementar e espectrometria de massa.

Dentre os três complexos sintetizados, todos eles bases de Schiff, apenas dois contém a isatina como precursor, que é um composto endógeno, derivado do triptofano. Assim pudemos observar a influência da isatina na atividade dos compostos, principalmente sobre as células de hospedeiros, como a LLCMK2 e o Fibroblasto. O composto que não contém isatina em sua estrutura se mostrou muito mais tóxico a essas linhagens, especialmente comparado com os compostos que contém isatina em sua estrutura (Tabela 11).

Além dos compostos sintetizados, compostos previamente estudados pelo laboratório também tiveram sua atividade frente o *T. cruzi* avaliada através do método de leitura ótica com MTT e comparada com resultados anteriores obtidos por contagem em câmara de Neubauer.

O uso de metodologia MTT permitiu avaliar a atividade antitripanossoma dos compostos de forma menos dependente do operador, quando comparada com a contagem em câmara de Neubauer. O composto **3** foi o mais tóxico frente a forma tripomastigota do parasita, porém também foi muito tóxico quando testado em células hospedeiras. Por ter apresentado a seletividade mais baixa, o composto **3** foi descartado para os ensaios subsequentes com a forma amastigota do *T. cruzi*.

Os demais compostos apresentaram boa seletividade e valores de IC₅₀ compatíveis com a literatura.

Após os ensaios na forma tripomastigota, os compostos **1,2,4 e 5** foram testados frente à forma amastigota, responsável pela fase crônica da Doença de Chagas, através da otimização de um método para a determinação da taxa de infecção de células hospedeiras por *Trypanosoma cruzi*, a partir da contagem de imagens geradas por microscopia de fluorescência, utilizando DAPI como sonda fluorescente.

O principal desafio enfrentado nesses experimentos é a atividade dos compostos frente ao parasita, no meio intracelular, sem afetar de modo significativo as células hospedeiras. Algo que pudemos observar nos primeiros experimentos realizados, utilizando uma faixa de concentração maior, que se mostrou muito agressiva para a células parasitadas. Em concentração mais baixa, os compostos deixaram de ser tão agressivos à célula hospedeira (LLCMK2), porém não mostraram atividade marcante frente ao parasita.

Apesar das adversidades encontradas, os experimentos se mostraram adequados, apresentando um método possível para a determinação da taxa de infecção de células parasitadas, em presença de compostos potencialmente tripanocidas.

Uma comparação desses resultados com dados da literatura nem sempre é possível, devido à diversidade de condições experimentais utilizadas nesses estudos.

Com relação aos alvos identificados desses compostos tripanocidas, os compostos **1,2 e 5**, em adição a um composto análogo ao composto **5**, alterando o metal para zinco (composto **6**) e o ligante livre isapn (composto **7**), tiveram sua atividade inibitória sobre a cruzaina, uma cisteino-protease importante para o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, onde apenas o composto **2** não apresentou atividade inibitória na faixa de concentração testada.

Entre os outros compostos testados, foram observados dois mecanismos distintos. Os complexos de cobre (**1** e **5**) apresentaram o mecanismo clássico de competitividade, enquanto o complexo de zinco (**6**) e o ligante livre (**7**) apresentaram o mecanismo competitivo de cooperatividade positiva.

Para o futuro, os estudos com amastigotas podem ser refinados utilizando um método diferente, possivelmente testando os compostos diretamente sobre os amastigotas, após um procedimento de extração e purificação, podendo-se executar as análises via método com MTT.

Os possíveis mecanismos de ação dos complexos podem ser melhor estudados com experimentos de intercalação em DNA e geração de espécies reativas de oxigênio, que podem ajudar a elucidar a forma como os compostos estudados são capazes de afetar o *Trypanosoma cruzi*.

Referências

1. Burchmore, R. J. S. *et al.* Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3901–3906 (2003).
2. Pérez-Molina, J. A. & Molina, I. Chagas disease. *Lancet* **391**, 82–94 (2018).
3. World Health Organization. What is Chagas disease? *Chagas disease (American trypanosomiasis)* Available at: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>. (Accessed: 4th January 2020)
4. Zingales, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 240–253 (2012).
5. World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. Available at: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. (Accessed: 4th January 2020)
6. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Available at: <https://dndi.org/>. (Accessed: 4th January 2020)
7. Clayton, J. Chagas disease: Pushing through the pipeline. *Nature* **465**, 12–15 (2010).
8. Molina, I. *et al.* Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1899–1908 (2014).
9. De Rycker, M. *et al.* Identification of Trypanocidal Activity for Known Clinical Compounds Using a New *Trypanosoma cruzi* Hit-Discovery Screening Cascade. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–19 (2016).
10. Sales, P. A. *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 1289–1303 (2017).
11. Maya, J. D. *et al.* Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* **43**, 323–331 (2010).
12. Silva, J. J. N., Thiemann, O. H., Oliva, G. & Andricopulo, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nov.* **32**, 2444–2457 (2009).
13. Rajão, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environ. Mol. Mutagen.* **55**, 309–321 (2014).
14. Castro, J. A., De Mecca, M. M. & Bartel, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* **25**, 471–479 (2006).

15. Zingales, B. *et al.* A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 433–444 (2015).
16. da Silva, E. B. *et al.* Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. *Eur. J. Med. Chem.* **130**, 39–50 (2017).
17. Moreira, D. R. M. *et al.* Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *ChemMedChem* **9**, 177–188 (2014).
18. FONSECA-BERZAL, C. *et al.* Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different *Trypanosoma cruzi* strains. *Parasitol. Open* **1**, 1–10 (2015).
19. da Silva, C. F. *et al.* In vitro trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1295–1297 (2011).
20. Cerecetto, H. & Gonzalez, M. Anti-T. cruzi Agents: Our Experience in the Evaluation of More than Five Hundred Compounds. *Mini-Reviews Med. Chem.* **8**, 1355–1383 (2008).
21. Pinto, A. V. & De Castro, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. *Molecules* **14**, 4570–4590 (2009).
22. Lara, L. S. *et al.* Optimization of 1,4-Naphthoquinone Hit Compound: A Computational, Phenotypic, and In Vivo Screening against *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **26**, (2021).
23. Monteiro, M. E. *et al.* Synthesis, structure-activity relationship and trypanocidal activity of pyrazole-imidazoline and new pyrazole-tetrahydropyrimidine hybrids as promising chemotherapeutic agents for Chagas disease. *Eur. J. Med. Chem.* **182**, 1–13 (2019).
24. Silva, B. N. M. *et al.* Synthesis of New Thiosemicarbazones and Semicarbazones Containing the 1,2,3-1H-triazole-isatin Scaffold: Trypanocidal, Cytotoxicity, Electrochemical Assays, and Molecular Docking. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **15**, 240–256 (2019).
25. Sánchez-Delgado, R. A., Anzellotti, A. & Suárez, L. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis. *Met. Ions Biol. Syst.* **41**, 379–419 (2004).
26. Moreira, D. R. M., Leite, A. C. L., dos Santos, R. R. & Soares, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr. Drug Targets* **10**, 212–231 (2009).
27. Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L. & Gambino, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and

- perspectives. *Drug Discov. Today* **15**, 1070–1078 (2010).
28. Brown, R. W. & Hyland, C. J. T. Medicinal organometallic chemistry – an emerging strategy for the treatment of neglected tropical diseases. *Medchemcomm* **6**, 1230–1243 (2015).
 29. Ong, Y. C., Roy, S., Andrews, P. C. & Gasser, G. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. *Chemical Reviews* **119**, 730–796 (2019).
 30. Gambino, D. & Otero, L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chim. Acta* **393**, 103–114 (2012).
 31. Barbosa, M. I. F. *et al.* Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. *J. Inorg. Biochem.* **136**, 33–39 (2014).
 32. Perez-Rebolledo, A. *et al.* 4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant in vitro anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 939–948 (2008).
 33. Navarro, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1619–1626 (2009).
 34. Benítez, J. *et al.* A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1386–1394 (2009).
 35. Gambino, D. Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2193–2203 (2011).
 36. Pessoa, J. C., Etcheverry, S. & Gambino, D. Vanadium compounds in medicine. *Coord. Chem. Rev.* **301–302**, 24–48 (2015).
 37. Sánchez-Moreno, M. *et al.* In vitro and in vivo trypanosomicidal activity of pyrazole-containing macrocyclic and macrobicyclic polyamines: Their action on acute and chronic phases of chagas disease. *J. Med. Chem.* **55**, 4231–4243 (2012).
 38. Fontecave, M., Gräslund, A. & Reichard, P. The function of superoxide dismutase during the enzymatic formation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **262**, 12332–12336 (1987).
 39. Steverding, D., Kolosevska, K. & Sánchez-Moreno, M. Trypanocidal activity of tetradentated pyridine-based manganese complexes is not linked to inactivation of superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **192**, 1–5 (2018).
 40. Oliveira, A. P. A. *et al.* Investigation of the antitrypanosomal effects of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-derived hydrazones and their antimony(iii) and bismuth(iii) complexes. *New J. Chem.* **43**, 18996–19002 (2019).
 41. Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F. & Santini, C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **9**, 185–211 (2009).

42. da Silveira, V. C. *et al.* Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.* (2008). doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.033
43. Maia, P. I. D. S. *et al.* Organometallic gold(III) complexes with hybrid SNS-donating thiosemicarbazone ligands: cytotoxicity and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Dalt. Trans.* **46**, 2559–2571 (2017).
44. Caballero, A. B. *et al.* Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 526–534 (2014).
45. Esteban-Parra, G. M. *et al.* Lanthanide(III) Based Complexes Containing 5,7-Dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine as Long-Lived Photoluminescent Antiparasitic Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, 308–317 (2020).
46. Ferreira, R. A. A. *et al.* Structure-Based and Molecular Modeling Studies for the Discovery of Cyclic Imides as Reversible Cruzain Inhibitors With Potent Anti-Trypanosoma cruzi Activity. *Front. Chem.* **7**, 1–21 (2019).
47. Ferreira, R. S. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-Trypanosoma cruzi agents. *J. Med. Chem.* **57**, 2380–2392 (2014).
48. Lewis, D. L., Estes, E. D. & Hodgson, D. J. The infrared spectra of coordinated perchlorates. *J. Cryst. Mol. Struct.* **5**, 67–74 (1975).
49. Machado, I. P., Pedroso, C. C. S., Carvalho, J. M. De & Teixeira, V. C. Designing New NIR Persistent Luminescence Materials : Eu³⁺ - and Yb³⁺ -Doped Rare Earth Oxysulfides.
50. Isaepy, C. & Isapn, L. I. Índice de infecção 48 horas Índice de infecção Viabilidade de macrófagos.
51. Shelke, S. A., Th Sigurdsson, S., Shelke, S. & Sigurdsson, S. Site-Directed Spin Labeling for EPR Studies of Nucleic Acids. in *Nucleic Acids and Molecular Biology* **31**,
52. Pedido patente BR 10 2013 026558-6, depositado em 15/10/2013; Protocolado no INPI sob no. 018130040120.
53. A. M. da Costa Ferreira, P. A. D. Petersen, H. M. Petrilli, and M. R. C. Molecular Basis for Anticancer and Antiparasite Activities of Copper-Based Drugs. in *Redox-Active Therapeutics* (eds. Batinić-Haberle, I., Rebouças, J. S. & Spasojević, I.) (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-30705-3
54. Sabino, G. L. Investigação da reatividade de complexos de cobre com ligantes bases de Schiff frente a infecções parasitárias. (Universidade de São Paulo, 2014).
55. Silveira, V. C. Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre(II) com

- Ligantes Inspirados em Biomoléculas. (2008).
56. Cavicchioli, M. *et al.* Oxidative assets toward biomolecules and cytotoxicity of new oxindolimine-copper(II) and zinc(II) complexes. *Inorganics* **7**, 1–17 (2019).
 57. Couto, R. A. A. IMOBILIZAÇÃO DE COMPLEXOS OXINDOLIMÍNICOS DE COBRE E ZINCO EM ARGILAS BEIDELITAS. (Universidade de São Paulo, 2016).
 58. Stoll, S. & Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178**, 42–55 (2006).
 59. Neese, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **8**, 4–9 (2018).
 60. Neese, F. The ORCA program system. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2**, 73–78 (2012).
 61. Weigend, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 1057–1065 (2006).
 62. Hodgson, J. B. & Thornton, A. The infrared spectra of imidazole complexes of first transition series metal(ii) nitrates and perchlorates. *J. Mol. Struct.* **66**, 81–92 (1980).
 63. Sakaguchi, U. & Addison, A. W. Spectroscopic and redox studies of some copper(II) complexes with biomimetic donor atoms: implications for protein copper centres. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 600 (1979).
doi:10.1039/dt9790000600
 64. Caramori, G. F., Parreira, R. L. T. & Ferreira, A. M. D. C. Isatin-Schiff base copper(II) complexes-A DFT study of the metal-ligand bonding situation. *Int. J. Quantum Chem.* **112**, 625–646 (2012).
 65. Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. Vitr.* **12**, 251–258 (1998).
 66. Tominaga, H. *et al.* A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* **36**, 47–50 (1999).
 67. Stacey, G. N. Cancer Cell Culture, MTT assay. *Methods Mol Biol* **731**, 79–91 (2011).
 68. Schlesinger, M. *et al.* Disrupted ADP-ribose metabolism with nuclear Poly (ADP-ribose) accumulation leads to different cell death pathways in presence of hydrogen peroxide in procyclic Trypanosoma brucei. *Parasit. Vectors* **9**, 173 (2016).
 69. Michael V. Berridge, A. S. T. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474–482 (1993).

70. Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. & Gómez-Barrio, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* **86**, 999–1002 (2000).
71. Neto, V. A. Origin of the 'y strain' of *trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **52**, 171 (2010).
72. Riss, T. L., Niles, A. L. & Minor, L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. *Assay Guid. Man.* 1–23 (2004). doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
73. Donnici, C. L. *et al.* Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological characterization and structure-activity relationships. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 5038–5043 (2009).
74. Greenbaum, D. C. *et al.* Synthesis and Structure - Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **47**, 3212–3219 (2004).
75. Leite, A. C. L. *et al.* Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 3749–3757 (2006).
76. Pizzo, C. *et al.* Synthesis of 2-Hydrazolyl-4-Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against *Trypanosoma Cruzi*. *Chem. Biol. Drug Des.* **77**, 166–172 (2011).
77. Wang, T. & Guo, Z. Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **13**, 525–537 (2006).
78. d'Ischia, M., Palumbo, A. & Protà, G. Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* **44**, 6441–6446 (1988).
79. Bollini, M. *et al.* New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 1437–1444 (2009).
80. Varela, M. T. *et al.* Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents - Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **26**, 1180–1183 (2016).
81. Santos, S. S., de Araújo, R. V., Giarolla, J., Seoud, O. El & Ferreira, E. I. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2020). doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105906
82. Boutaleb-Charki, S. *et al.* Copper (II) complexes of [1,2,4]triazolo [1,5-a]pyrimidine derivatives as potential anti-parasitic agents. *Drug Metab. Lett.* **3**, 35–44 (2009).
83. Paixão, D. A. *et al.* In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 157–166 (2019).

84. Santos, D. *et al.* Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones. *J. Inorg. Biochem.* **117**, 270–276 (2012).
85. Corrêa, R. S. *et al.* Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. *J. Inorg. Biochem.* **156**, 153–163 (2016).
86. da Silveira, V. C. *et al.* Oxindole-Schiff base copper(II) complexes interactions with human serum albumin: Spectroscopic, oxidative damage, and computational studies. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1331–1341 (2009).
87. Miguel, R. B. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase CDK1 by oxindolimine ligands and corresponding copper and zinc complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 1205–1217 (2015).
88. Katkar, P. *et al.* Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity. *Metallomics* **6**, 117–125 (2014).
89. Castelli, S. *et al.* Comparative studies of oxindolimine-metal complexes as inhibitors of human DNA topoisomerase IB. *J. Inorg. Biochem.* **186**, 85–94 (2018).
90. Kapuscinski, J. DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* **70**, 220–233 (1995).
91. De Souza, V. A. *et al.* Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **15**, 303–307 (2005).
92. Engel, J. C. *et al.* Image-based high-throughput drug screening targeting the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3326–3334 (2010).
93. Nohara, L. L., Lema, C., Bader, J. O., Aguilera, R. J. & Almeida, I. C. High-content imaging for automated determination of host-cell infection rate by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Int.* **59**, 565–570 (2010).
94. Rivera, G., Bocanegra-Garcia, V., Ordaz-Pichardo, C., Noguera-Torres, B. & Monge, A. New Therapeutic Targets for Drug Design Against *Trypanosoma cruzi*, Advances and Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3286–3293 (2009).
95. Soeiro, M. N. C. & de Castro, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 105–21 (2009).
96. Braga, S. F. P. *et al.* Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. *Bioorganic Med. Chem.* **25**, 1889–1900 (2017).
97. Wanderlan Pontes Espíndola, J. *et al.* Synthesis and structureactivity

- relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 818–835 (2015).
98. Gonzales-Perdomo, M., De Castro, S. L., Meirelles, M. N. S. L. & Goldenberg, S. *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1707–1714 (1990).
 99. Fragoso, S. P., Mattei, D., Hines, J. C., Ray, D. & Goldenberg, S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **94**, 197–204 (1998).
 100. Lessa, J. A. *et al.* Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1729–1739 (2011).
 101. Linares, G., Ravaschino, E. & Rodriguez, J. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases. *Curr. Med. Chem.* **13**, 335–360 (2006).
 102. Maya, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **146**, 601–620 (2007).
 103. Duschak, V. & Couto, A. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2**, 19–51 (2008).
 104. Sueth-Santiago, V., Decote-Ricardo, D., Morrot, A., Freire-de-Lima, C. G. & Lima, M. E. F. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World J. Biol. Chem.* **8**, 57 (2017).
 105. Zhang, Y. *et al.* The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **5**, 52–61 (2008).
 106. Fairlamb, A., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. & Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science (80-)*. **227**, 1485–1487 (1985).
 107. Benson, T. J. *et al.* Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase: Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. *Biochem. J.* **286**, 9–11 (1992).
 108. McKie, J. H. *et al.* Specific peptide inhibitors of trypanothione reductase with backbone structures unrelated to that of substrate: Potential rational drug design lead frameworks. *Amino Acids* **20**, 145–153 (2001).
 109. Rivarola, H. W. & Paglini-Oliva, P. a. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Curr. Drug Targets. Cardiovasc. Haematol. Disord.* **2**, 43–52

- (2002).
110. Barr, S. C. *et al.* A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5160–5161 (2005).
 111. Mckerrow, J. H. *et al.* Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 263–269 (2009).
 112. Choe, Y. *et al.* Development of α -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 2141–2156 (2005).
 113. Judice, W. A. S. *et al.* Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6578–6586 (2001).
 114. Brinen, L. S. *et al.* A target within the target: Probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. *Structure* **8**, 831–840 (2000).
 115. Palos, I. *et al.* Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual screening, in vitro and in vivo studies. *Molecules* **22**, (2017).
 116. Scarim, C. B. *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. *Eur. J. Med. Chem.* **155**, 824–838 (2018).
 117. Silva, J. R. A. *et al.* Assessment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible and Irreversible Covalent Inhibition Mechanism. *J. Chem. Inf. Model.* **60**, 1666–1677 (2020).
 118. Guerra, A. *et al.* Novel Imidazo[4,5-c][1,2,6]thiadiazine 2,2-dioxides as antiproliferative *trypanosoma cruzi* drugs: Computational screening from neural network, synthesis and in vivo biological properties. *Eur. J. Med. Chem.* **136**, 223–234 (2017).
 119. Du, X. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **45**, 2695–2707 (2002).
 120. Chiyanzu, I. *et al.* Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **13**, 3527–3530 (2003).
 121. da Cunha, G. A. *et al.* Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies. *J. Inorg. Biochem.* **203**, 110944 (2020).
 122. Hoelz, L. V. B. *et al.* Molecular dynamics simulations of the free and inhibitor-bound cruzain systems in aqueous solvent: insights on the inhibition mechanism

- in acidic pH. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34**, 1969–1978 (2016).
123. Vital, W. D. *et al.* 4-Deoxyraputindole C induces cell death and cell cycle arrest in tumor cell lines. *J. Cell. Biochem.* **120**, 9608–9623 (2019).

ANEXOS:

Espectrogramas dos complexos **1**, **2** e **3** de cobre(II) testados neste trabalho quanto à sua atividade tripanocida. Esses espectros foram obtidos na Central Analítica do IQ-USP.

Equipamento: MICROTOF – Bruker Daltonics; Nebulizer: 0.4 Bar; Dry gas: 5 l/min

Temperatura: 200 °C; HV: 4500 V. Modo de aquisição: Positivo

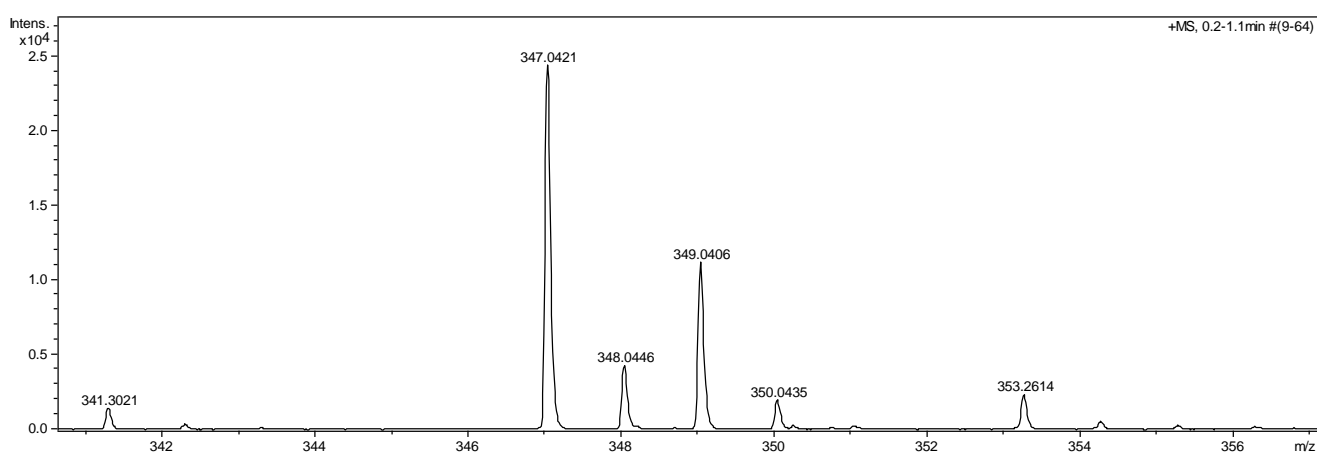


Figura 59. Espectrograma do composto 1, Cuisaenim.

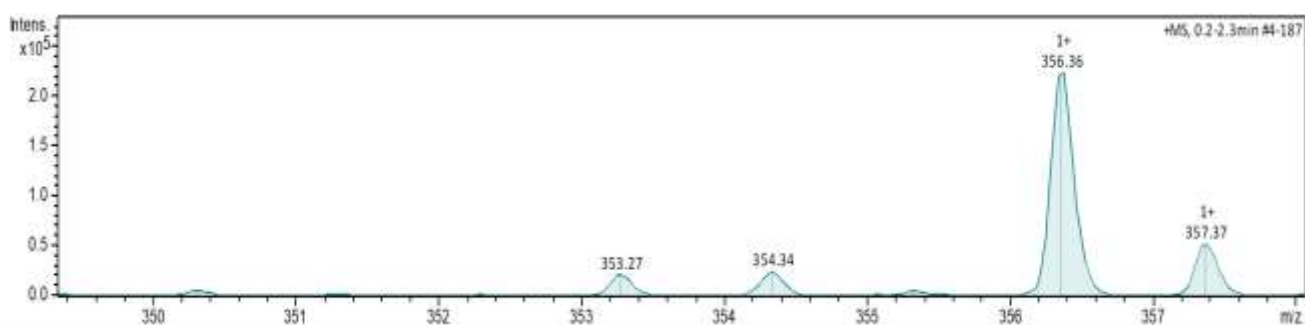


Figura 60. Espectrograma do composto 2, Cuisabmz.

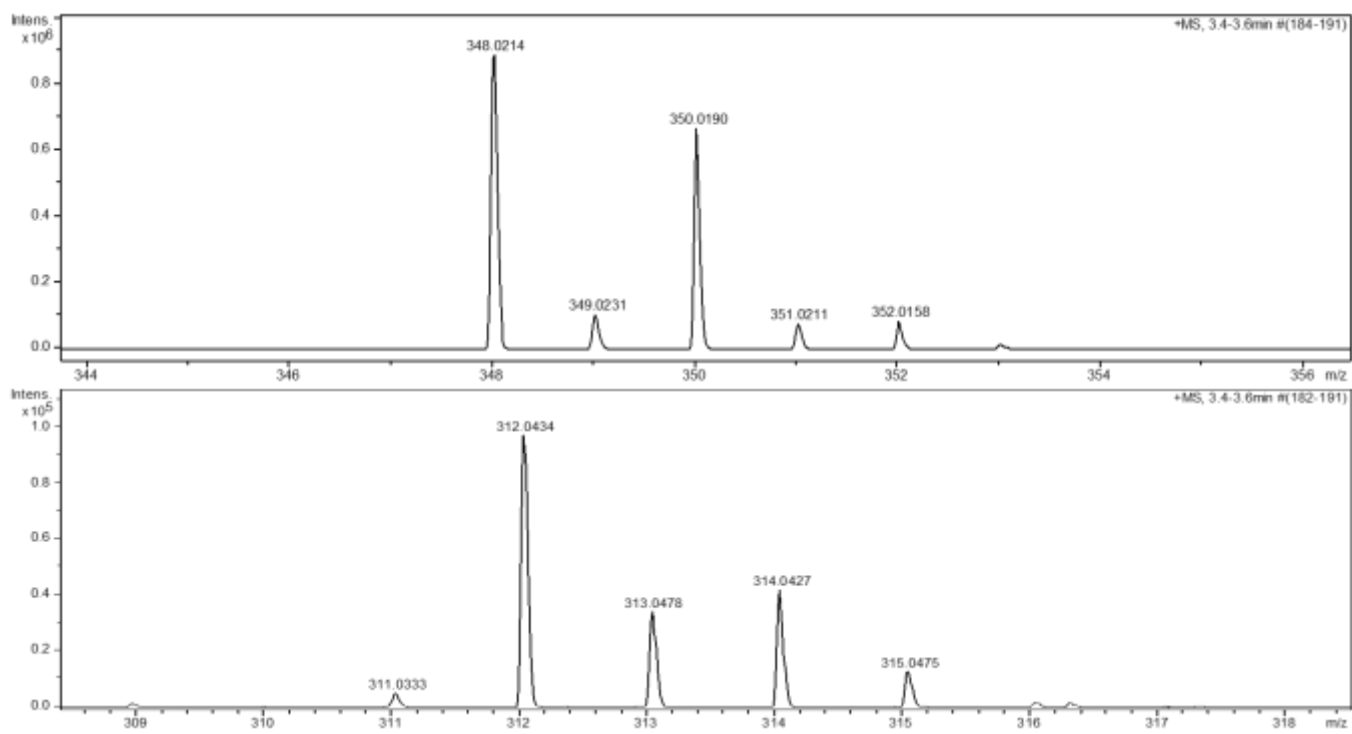


Figura 61. Espectrogramas do composto 3, Cuapybmz.

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: **Marcelo Cecconi Portes**

Local e data de nascimento: São Paulo, 10/07/1989

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio COC Vila Yara, Osasco, 2006

Ensino Superior: Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014, Bacharel em Química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CAPES, 01/11/2014 a 31/10/2018 – IQ USP

PUBLICAÇÕES

1. **PORTES, MARCELO CECCONI**; VÉRAS, LEIZ MARIA COSTA ; LEITE, JOSÉ ROBERTO ; MAFUD, ANA CAROLINA ; MASCARENHAS, YVONNE PRIMERANO ; LUZ, ADAMOR ELEIEL VIRGINO ; DE LIMA, FILIPE CAMARGO DALMATTI ALVES ; DO NASCIMENTO, RAFAEL RODRIGUES ; PETRILLI, HELENA MARIA ; PINTO, PEDRO LUIZ SILVA ; ALTHOFF, GERHARD ; FERREIRA, ANA MARIA DA COSTA . Structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine-metal complexes, and anthelmintic activity. *JOURNAL OF COORDINATION CHEMISTRY*, v. 69, p. 1-21, 2016.
2. DARIO, BRUNO SOARES ; FERNANDES NETO, FRANCISCO ; **PORTES, MARCELO CECCONI** ; BONI FAZZI, RODRIGO ; RODRIGUES DA SILVA, DANIEL ; PETERSON, ERICA J. ; FARRELL, NICHOLAS PATRICK ; CASTELLI, SILVIA ; DESIDERI, ALESSANDRO ; PETERSEN, PHILIPPE A.D. ; PETRILLI, HELENA MARIA ; DA COSTA FERREIRA, ANA MARIA . DNA binding, cytotoxic effects and probable targets of an oxindolimine-vanadyl complex as an antitumor agent. *NEW JOURNAL OF CHEMISTRY*, v. 43, p. 17831-17840, 2019.
3. SANTOS, DANILO ORMENI ALMEIDA ; GIORDANO, LUIDGI ; BARBARÁ, MIGUEL AGUIRRE STOCK GREIN ; **PORTES, MARCELO CECCONI** ; PEDROSO, CÁSSIO CARDOSO SANTOS ; TEIXEIRA, VERÔNICA CARVALHO ; LASTUSAARI, MIKA ; RODRIGUES, LUCAS CARVALHO VELOSO . Abnormal co-doping effect on the red

persistent luminescence SrS:Eu ,RE materials. *Dalton Transactions*, p. 16386-16393, 2020.

APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

1. PORTES, M. C.; ALVES, M. J. M.; FERREIRA, A. M. C. (2016) Imine complexes of essential metals showing antiparasite activity towards Chagas Disease and Leishmaniosis. In: **XVIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry (BMIC)** em São Pedro, de 25 a 30 de setembro de 2016.
2. PORTES, M. C.; ALVES, M. J. M.; FERREIRA, A. M. C. (2017) Imine copper(II) complexes showing antiparasite activity toward Chagas Disease. In: **18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC)** em Florianópolis, de 31 de julho a 4 de agosto de 2017.