**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

GUSTAVO LEVENDOSKI SABINO

**Investigação da reatividade de complexos metálicos
com ligantes bases de Schiff frente a infecções
parasitárias**

**Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
08/outubro/2014

GUSTAVO LEVENDOSKI SABINO

**Investigação da reatividade de complexos metálicos
com ligantes bases de Schiff frente a infecções
parasitárias**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química*

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Ana Maria da Costa Ferreira

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S116i Sabino, Gustavo Levendoski
Investigação da reatividade de complexos metálicos com ligantes
bases de Schiff frente a infecções parasitárias / Gustavo Levendoski
Sabino. - São Paulo, 2014.
98p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Ferreira, Ana Maria da Costa

1. Química bioinorgânica I. T. II. Ferreira, Ana Maria da Costa,
orientador.

546.3 CDD

*Aos meus pais pelo exemplo, incentivo
e apoio em todas as minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À professora Ana Maria da Costa Ferreira, pela excelente orientação, pelo apoio, compreensão e principalmente por todos os ensinamentos durante o período do mestrado. Sou muito grato por todo o incentivo, carinho e por acreditar e apostar na minha capacidade.

À professora Leda Quércia Vieira e sua aluna Grazielle Alves Ribeiro, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por terem me recebido em seu laboratório e pela colaboração nos experimentos com *Trypanosoma cruzi*. Agradeço também aos alunos, Raysson, Peter e Brenda e a todos os integrantes do LAGI por todo apoio durante o desenvolvimento dos trabalhos no ICB da UFMG.

À professora Antonia Tavares do Amaral pelo equipamento para desenvolvimento dos estudos de fluorescência.

Aos professores Breno Espósito, Vera Constantino, Helena Petrilli e seus alunos pelas discussões nos seminários de grupo.

Ao Ricardo A. Alves Couto pelo auxílio e ajuda na realização de experimentos e utilização dos equipamentos do laboratório e em especial pela síntese e caracterização dos complexos de zinco utilizados neste trabalho.

Agradeço aos funcionários do IQ-USP, em especial à Maria Aparecida Paiva Lopes (Cida) por ser prestativa, compreensiva e estar sempre presente para nos auxiliar.

Aos amigos que fizeram e fazem parte do grupo Maurício, Saulo, Ricardo, João, Esther, Naresh, Adriana, Camila, Rodrigo, Suzana, principalmente a Queite por todos os ensinamentos através de sua experiência, agradeço também a Cléia e ao amigo Bruno Dário por me ajudarem a desenvolver os experimentos.

Agradeço especialmente as primeiras pessoas que me incentivaram nos estudos, meus pais Valmir e Sonia que sempre me apoiaram, me incentivaram, passaram comigo por decepções e pelas maiores alegrias, que confiaram e sempre acreditaram no meu potencial, à eles que sempre me mostraram o caminho a seguir e me ajudam a continuar atrás de meus sonhos. Agradeço a minha irmã por todo amor e carinho, ao meu cunhado pela companhia e ao meu sobrinho Mateus por nos trazer alegria e motivação. Agradeço a toda minha família e principalmente minhas avós por sempre me incentivarem nos estudos.

À Amanda Domingues por me ajudar, aconselhar e apoiar durante esta caminhada.

Aos meus amigos que me ajudaram de forma direta e indireta, e aos amigos que conheci na vida acadêmica Marcos, Philipe, Filipe, Rafael, Alfredo, Gustavo, Carol, Ana Paula, Douglas, Rute e ao amigo Kassio.

Aos professores Makoto, Maria de Fátima, Melina, Francisco, Reinaldo, Danitza pelo incentivo e esclarecimentos em relação ao mundo acadêmico.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de mestrado. A Capes pelo auxílio financeiro. A FAPESP. Ao INCT Redoxoma.

E a todos que direta e indiretamente participaram da realização deste trabalho, que torceram e torcem por mim e sempre estão juntos comigo a cada vitória e que sempre torceram pelo sucesso na realização deste trabalho.

“É preciso força pra sonhar e perceber,
que a estrada vai, além do que se vê”
Marcelo Camelo

RESUMO

Sabino, G.L.- **Investigação da reatividade de complexos metálicos com ligantes bases de Schiff frente a infecções parasitárias**.2014, 98 páginas.Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Ligantes oxindolimínicos foram sintetizados através de procedimentos já desenvolvidos em nosso laboratório, a partir do 2,3-dioxindol (isatina) e aminas ou diaminas selecionadas, e em seguida metalados. Foram investigados dois complexos de cobre(II) com os ligantes *isaepy*, preparado a partir de 2-(2-aminoetilpiridina) e *isapn*, a partir de 1,2-diaminoetano, e os correspondentes complexos de zinco(II). Após caracterização por diversas técnicas, sua reatividade com relação a biomoléculas (HSA e DNA) foi verificada, através de medidas de fluorescência e dicróismo circular. Posteriormente, sua reatividade antiparasitária frente a *T. cruzi* foi testada. Todos eles apresentaram atividade tóxica frente às formas tripomastigota e amastigota do parasita, com índices de seletividade bastante promissores, quando comparados à droga atualmente em uso (*benzonidazol*) e outras alternativas descritas na literatura. Anteriormente estes complexos já haviam demonstrado atividade pró-apoptótica frente a diversas células tumorais, baseado em sua capacidade de gerar espécies reativas (EROs) e de inibir proteínas específicas, como a topoisomerase humana IB. Os resultados aqui obtidos deram origem a um pedido de patente (**BR10 2013 026558-6**, depositado junto ao INPI em 15/outubro/2013) visando o possível desenvolvimento de novos fármacos para a doença de Chagas.

Palavras-chave: cobre; zinco; atividade antiparasitária; *T. cruzi*; doença de Chagas.

ABSTRACT

Sabino, G.L.-**Investigations on the reactivity of metal complexes with Schiff-base ligands towards parasite infections.** 2014, 98 p. Masters Thesis- Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Oxindolimine ligands were synthesized by procedures previously developed in our laboratory, from 2,3-dioxindole(isatin) and amines or selected diamines, by condensation reactions, followed by metallation. Two copper(II) complexes with *isaepy* and *isapn* ligands, prepared from 2-(2-aminoethylpyridine) and 1,2-diaminoethane respectively, and their corresponding complexes of zinc(II) were investigated. After characterization by various techniques, their reactivity with respect to biomolecules (HSA and DNA) was verified, through measurements of fluorescence and circular dichroism. Subsequently, their antiparasitary reactivity against *T. cruzi* was tested. All complexes tested presents toxic activity against trypomastigote and amastigote forms of the parasite, with promising selectivity index, compared to drugs currently in use (benznidazole) and other alternative compounds described in literature. Previously, these complexes had shown pro-apoptotic activity against several tumor cells, based on their ability to generate reactive species and inhibit specific proteins, such as topoisomerases. The results obtained here gave rise to a patent application (**BR10 2013 026558-6**, deposited on INPI in October 15th, 2013), looking for a possible development of new drugs for Chagas disease.

Keywords: copper; zinc; trypanocidal activity; *T. cruzi*; Chagas disease.

Esquema dos complexos estudados

[Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂

[Cu(isapn)](ClO₄)₂

[Zn(isaepy)Cl₂]

[Zn(isapn)]ClO₄

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Panstrongylus megistus*, o Barbeiro, vetor da doença de Chagas.

Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 3. Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas: **(1)** nifurtimox, **(2)** benzonidazol.

Figura 4. Mecanismos de ação propostos para os fármacos benzonidazol e nifurtimox.

Figura 5. Reação genérica da formação de uma imina.

Figura 6. Tautômeros de equilíbrio ceto-enólico da isatina.

Figura 7. Síntese do ligante (isapn), formado a partir de isatina e 1,3-diaminopropano.

Figura 8. Preparação do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ na forma de perclorato.

Figura 9. Síntese do ligante (isaepy), a partir de isatina e 2-aminoetilpiridina.

Figura 10. Preparação do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ na forma de perclorato.

Figura 11. Preparação do composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ na forma de perclorato.

Figura 12. Preparação do composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ na forma de cloreto.

Figura 13. Espectro vibracional no Infravermelho (FTIR) do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ em KBr, por refletância difusa.

Figura 14. Espectro vibracional no Infravermelho (FTIR) do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ em KBr, por refletância difusa.

Figura 15. Espectro ^1H RMN do ligante *isapn*, em DMSO- d_6 , a temperatura ambiente.

Figura 16. Espectro de massa do ligante *isapn*, em metanol.

Figura 17. ^1H RMN do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, em MeOH- d_4 , em pH aparente pH 5, a temperatura ambiente.

Figura 18. ^1H RMN do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, em MeOH- d_4 , em pH aparente pH 7, a temperatura ambiente.

Figura 19. Espectros de massa do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, dissolvido em metanol/água (9:1).

Figura 20. Equilíbrios ceto-enólicos referentes ao complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, com as espécies ceto-ceto, ceto-enol e enol-enol.

Figura 21. Curva analítica padrão da amplitude dicróica, em 564nm, versus concentração da espécie $[\text{Cu}(\text{HSA})]$ formada, usando $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ como titulante.

Figura 22. Curva analítica padrão da amplitude dicróica, em 354nm, versus concentração da espécie $[\text{Zn}(\text{HSA})]$ formada usando o composto $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ como titulante.

Figura 23. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, em tampão fosfato 50mM, pH=7,4.

Figura 24. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 25. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 26. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Figura 27. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA, na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

Figura 28. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 29. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 30. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Figura 31. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de concentrações variáveis de brometo de etídio (EB) ao DNA (30 μM).

Figura 32. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA, na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 33. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Figura 34. Variações verificadas na Intensidade de Fluorescência em função de concentrações crescentes dos complexos de zinco estudados.

Figura 35. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

Figura 36. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 37. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 38. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Figura 39. Variação no *melting point* após incubação do DNA com os compostos de cobre(II) e zinco(II) estudados, em função de rb.

Figura 40. Comparação entre os valores de LC_{50} frente a macrófagos, para os compostos estudados, analisados após 24 h de incubação, a 37°C.

Figura 41. Comparação entre os valores LC_{50} , frente a macrófagos, para os compostos estudados, analisados após 48 h de incubação, a 37°C.

Figura 42. Valores de IC_{50} , para os compostos testados frente às formas tripomastigotas, após o período de incubação de 24 h, a 37°C.

Figura 43. Valores de IC_{50} , para os compostos testados frente às formas tripomastigotas, após o período de incubação de 48 h, a 37°C.

Figura 44. Análise da quantidade de amastigotas pela quantidade total de macrófagos (expressa pelos macrófagos infectados e macrófagos não infectados) em função da concentração de diferentes complexos, após 24h de incubação, a 37°C.

Figura 45. Análise da quantidade de amastigotas pela quantidade total de macrófagos (expressa pelos macrófagos infectados e macrófagos não infectados) em função da concentração de diferentes complexos, após 48h de incubação, a 37°C.

Figura 46. Análise da inibição da proliferação de amastigotas pela quantidade total de macrófagos, utilizando compostos de Cu^{2+} , após 24h e 48h de incubação, a 37°C.

Figura 47. Análise da inibição da proliferação de amastigotas pela quantidade total de macrófagos, utilizando compostos de Zn^{2+} , após 24h e 48h de incubação, a 37°C.

Figura 48. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, em função das concentrações dos compostos testados, após o período de incubação de 24 h, a 37°C.

Figura 49. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, em função das concentrações dos compostos testados, após o período de incubação de 48 h, a 37°C.

Figura 50. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, utilizando compostos de Cu^{2+} . Incubação por 24 ou 48h, a 37°C.

Figura 51. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, utilizando compostos de Zn^{2+} . Incubação por 24 ou 48h, a 37°C.

Figura 52. Índices de Infecção calculados após o período de 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos, a 37°C.

Figura 53. Índices de Infecção calculados após o período de 48h de incubação com diferentes concentrações dos compostos, a 37°C.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Reagentes utilizados durante as sínteses e caracterização dos complexos com suas respectivas porcentagens (%) de pureza e procedência.
- Tabela 2.** Solventes utilizados com suas respectivas porcentagens (%) de pureza e procedência.
- Tabela 3.** Resultados de análise elementar para os compostos sintetizados.
- Tabela 4.** Principais bandas, em cm^{-1} , dos compostos de cobre(II) e suas atribuições.
- Tabela 5.** Principais bandas (em cm^{-1}) e suas atribuições verificadas para os complexos de zinco(II).
- Tabela 6.** Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos de cobre(II) estudados.
- Tabela 7.** Valores das constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos em experimentos competitivos com HSA.
- Tabela 8.** Porcentagens estimadas de α -hélice para HSA usando o programa K2D3⁸⁰, através das curvas de dicroísmo circular.
- Tabela 9.** Valores da Concentração Letal a 50% de macrófagos ($\text{LC}_{50} \pm \text{EP}^*$) incubados com os compostos estudados, a 37°C, durante os períodos indicados.
- Tabela 10.** Valores da Concentração Inibitória a 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi* ($\text{IC}_{50} \pm \text{EP}^*$) dos compostos estudados, após incubação, a 37°C, durante os tempos indicados.
- Tabela 11.** Valores dos índices de seletividade (IS) para os compostos testados, após 24 e 48h de incubação, a 37°C, com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Tabela 12.** Comparação dos valores das constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos, com valores de literatura para a inserção do íon metálico na HSA.
- Tabela 13.** Valores dos índices de seletividade (IS) para os compostos testados, em comparação com benzonidazol, após diferentes tempos de incubação a 37°C.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	dicroísmo circular
Cu, Zn-SOD	Superóxido dismutase de cobre e zinco
DMEM	"meio de eagle modificado por dulbecco"
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxi-ribonucleico
EB	brometo de etídeo
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
epy	2(2-aminoetilpiridina)
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Espectrometria de massa <i>electrospray</i>
HSA	albumina humana
IC ₅₀	concentração correspondente a 50% da atividade tripanocida frente a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>
isa	Isatina
IV	Infravermelho
LC ₅₀	concentração letal a 50% dos macrófagos
MM	massa molar
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
pn	1,3-diaminopropano
RMN	ressonância magnética nuclear
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
dmtp	dimetiltriazolpirimidina
mpo	mercaptopiridina
isn	isonicotinamida
im	Imidazol
rb	<i>binding ratio</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Doença de Chagas.....	18
1.2 Tratamento da doença de Chagas.....	23
1.3 Cobre e zinco como elementos essenciais.....	26
1.4 Ligantes do tipo bases de Schiff.....	28
1.5 Complexos metálicos como potenciais metalofármacos.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL I– Síntese e caracterização.....	33
3.1. Reagentes e Soluções.....	33
3.2. Sínteses.....	34
3.2.1. Composto [Cu(isapn)](ClO ₄) ₂ – Composto 1.....	34
3.2.2. Composto [Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂ – Composto 2.....	35
3.2.3. Composto [Zn(isapn)](ClO ₄) - Composto 3.....	36
3.2.4. Composto [Zn(isaepy)Cl ₂] – Composto 4.....	36
3.3. Métodos de Caracterização e Instrumentação.....	37
3.3.1. Análise Elementar.....	37
3.3.2. Espectroscopia na região do Infravermelho.....	37
3.3.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear, ¹ H RMN.....	37
3.3.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	38
3.3.5. Dicroísmo circular.....	38
3.3.6. Fluorescência.....	38
4. PARTE EXPERIMENTAL II– Interação com Biomoléculas.....	39
4.1. Medidas de Dicroísmo Circular (CD): Estabilidade Termodinâmica.....	39
4.2. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificações na Estrutura Secundária da HSA.....	39
4.3. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de Fluorescência.....	39
4.4. Dicroísmo circular no monitoramento de interações dos complexos com DNA.....	40

4.5. Medidas do ponto de fusão (<i>melting point</i>) do DNA.....	40
5. PARTE EXPERIMENTAL III – Atividade antiparasitária frente ao <i>T. cruzi</i>.....	41
5.1. Manutenção dos parasitos e das células LLCMK ₂	41
5.2. Compostos empregados e preparo das amostras.....	41
5.3. Teste de viabilidade em macrófagos peritoneais.....	42
5.4. Efeito dos compostos sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	42
5.5. Avaliação do efeito dos compostos sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	43
5.6. Análises gráficas e estatísticas.....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1. Síntese e Caracterização dos Complexos.....	44
A) Análise Elementar.....	44
B) Espectroscopia na região do infravermelho.....	45
C) Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear, ¹ H RMN.....	48
D) Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	51
6.2. Interações com Biomoléculas.....	54
6.2.1. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular (CD) com HSA.....	54
6.2.2. Modificação na estrutura secundária da HSA monitorada por CD.....	60
6.3. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de Fluorescência.....	64
6.4. Estudo da Interação dos Complexos de Cobre com o DNA através de Dicroísmo Circular.....	67
6.5. Medidas da temperatura de fusão (<i>melting point</i>) do DNA.....	70
6.6. Atividade antiparasitária frente ao <i>T. cruzi</i>	72
6.6.1. Teste de viabilidade em macrófagos peritoneais.....	72
6.6.2. Efeito dos compostos sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	74
6.6.3. Índice de seletividade.....	76
6.6.4. Efeito dos compostos sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	78
A) Avaliação da quantidade de amastigotas pelo número total de macrófagos..	79
B) Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados.....	82

C) Determinação dos índices de infecção.....	85
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	98
PEDIDO DE PATENTE	
SÚMULA CURRICULAR	

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas parasitárias afetam mais de um bilhão de pessoas, o que representa um sexto da população mundial, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹. A organização não governamental Médico Sem Fronteiras (MSF) e a OMS propuseram a classificação das doenças em: globais (ocorrem no mundo todo), negligenciadas (ocorrem preferencialmente em países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (exclusiva dos países em desenvolvimento)².

Segundo a OMS, as doenças negligenciadas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, representando um forte entrave ao desenvolvimento dos países³. Essas denominações representam uma evolução do termo “doenças tropicais” por abranger os contextos de desenvolvimento político, econômico e social⁴. As doenças negligenciadas são um sério problema de saúde pública, e a necessidade de alternativas terapêuticas é clara, porém as indústrias farmacêuticas estão baseadas no lucro, sendo assim o setor de pesquisa e desenvolvimento das indústrias privadas está focado nas doenças globais, pois assim será mais fácil obter retorno dos investimentos. O desenvolvimento de um fármaco exige investimentos de grande porte, que só têm retorno financeiro se o medicamento for vendido em larga escala. As doenças negligenciadas afetam, geralmente, pessoas com baixo poder aquisitivo e sem influência política, sendo assim não geram o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas⁵, e conseqüentemente estas doenças não possuem ainda um tratamento eficaz, devido à ausência de pesquisa ou ao fato de esforços serem ainda insipientes para encontrar fármacos mais eficientes para seu tratamento.

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descrita em 1909, pelo médico Carlos Chagas, em um trabalho em que não apenas foi identificado o agente etiológico, como também o vetor e o modo de transmissão da doença. Até os dias atuais, a doença de Chagas é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina⁶.

De acordo com a classificação das doenças proposta pela OMS, a doença de Chagas é classificada como doença negligenciada, e nem sequer há números oficiais seguros sobre a doença no mundo⁴. O investimento na busca de novos fármacos para esta doença é ainda muito pequeno,^{5,7} embora diversos grupos de pesquisa, na área acadêmica, estejam investigando novas alternativas.

A doença de Chagas é transmitida nos países endêmicos principalmente por insetos conhecidos como barbeiros (transmissão vetorial), vide Figura 1, porém existem outras formas de transmissão como a transfusão de sangue, transplante de órgãos, e transmissões oral e congênitas.⁵ Há também o risco de infecção por via oral, através de ingestão de comida e bebida contaminadas com as fezes de um triatomíneo levando o parasita,⁸ conforme o ocorrido em 2005 em Santa Catarina, onde a cana-de-açúcar possivelmente foi moída com o inseto infectado, provocando a transmissão da doença a humanos.⁹

Figura 1. *Panstrongylus megistus*, o Barbeiro, vetor da doença de Chagas.

(Fonte: http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/imagens/his/1C_zoom.jpg)

No Brasil o governo praticamente erradicou os novos casos de Chagas por meio da transmissão vetorial (barbeiro), porém em 21 países da América Latina a situação é diferente. Estima-se que existam aproximadamente 8 milhões de infectados que continuam sem acesso adequado a exames diagnósticos e medicamentos adequados.⁷

Atualmente a doença de Chagas não está restrita apenas aos países subdesenvolvidos, ela vem ultrapassando as fronteiras da região e começa a se tornar um problema de saúde pública também nos Estados Unidos, Espanha, Austrália, Japão e Canadá, onde a migração de latinos é mais intensa. A maioria dessas pessoas vieram de regiões endêmicas e estão infectadas, pois receberam órgão transplantado ou sangue de pessoas com Chagas, ou nasceram de mães chagásicas, ou seja, não foram infectados por meio da transmissão vetorial.⁷

O agente causador da doença de Chagas é um protozoário flagelado da espécie *Trypanosoma cruzi*. Seu complexo ciclo biológico envolve um hospedeiro invertebrado e um vertebrado, e apresenta diferentes formas: a *epimastigota*, forma replicativa presente no vetor, a *trypomastigota*, forma infectante e sanguínea circulante no hospedeiro e a *amastigota*, forma de replicação intracelular.^{6,10}

Trypanosomiasis, American (Chagas disease) (*Trypanosoma cruzi*)

Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

(Fonte: http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_suppl/fig_tab/nature09220_F1.html)

O *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas infectantes. O hospedeiro invertebrado ingere formas tripomastigotas (não replicativas) e no lúmen do trato digestivo diferencia-se para a forma epimastigotas (replicativas), e após a replicação, desenvolvem-se as formas tripomastigotas metacíclicos (infectantes). O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando este é picado por um inseto infectado, o qual deposita as fezes contaminadas ao redor da picada, o parasita penetra na corrente sanguínea através da pele lesionada ou da mucosa. Ao entrar na corrente sanguínea as formas tripomastigotas invadem as células e diferenciam-se para as formas amastigotas (replicativas). Quando as células estão cheias de formas amastigotas, o parasita diferencia-se para a forma tripomastigota e se dissemina pela corrente sanguínea invadindo outras células.^{11, 12}

O ciclo se completa quando o inseto ingere o sangue de um vertebrado contaminado. A invasão dos protozoários através de lesões na pele ou de mucosas resulta em posterior ataque de células no hospedeiro, tais como macrófagos, fibroblastos e células musculares estriadas e lisas.¹¹ Após a invasão da célula, os tripomastigotas estão contidos dentro de uma estrutura conhecida como vacúolo parasitóforo,

da qual eles escapam, diferenciam-se em amastigotas e replicam-se no citosol. Após nove ciclos de divisão binária, amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas com alta mobilidade que são então liberados, após a ruptura da célula hospedeira.¹³ Em resumo, após a invasão celular, as formas tripomastigotas diferenciam-se na forma amastigota, para que se multipliquem e sejam posteriormente liberadas na forma tripomastigota.

Quando a transmissão ocorre através do vetor, ocorre uma reação inflamatória no local da inoculação do *T. cruzi*. Na inoculação via cutânea observa-se o desenvolvimento de um nódulo furuncular com um edema central discreto, conhecido como chagoma. Se a inoculação ocorrer através da mucosa conjuntiva, o paciente desenvolve um edema bpalpebral, unilateral e assintomático e conjuntivite com linfadenopatia regional ipsilateral, referido como sinal de Romaña ou complexo oftalmoganglionar. Os chagomas podem persistir por semanas, até que desapareçam espontaneamente.¹⁴

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda é efetuado por microscopia, devido à alta parasitemia, através da identificação de tripomastigotas em esfregaço de sangue periférico ou pela técnica de concentração de sangue como micro-hematócrito ou Strout.^{14,15} Na fase crônica da doença ocorre o declínio da parasitemia, e devem ser usados pelo menos dois testes sorológicos separados para confirmar a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, através de um ensaio convencional ou recombinante de imunoadsorção enzimática (ELISA), ensaio de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta ou Western Blot (WB). Estes testes não apresentam sensibilidade ou especificidade suficiente para serem utilizados sozinhos, por isso devem ser utilizados dois métodos diferentes para que o diagnóstico tenha sua precisão aumentada.^{14,15} Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem fornecer um diagnóstico definitivo da doença, durante sua fase aguda, e com eficácia variável, quando na sua fase crônica. Embora na microscopia estes métodos estejam limitados ao grau de parasitemia, eles ainda são utilizados especialmente para fins de pesquisa.¹⁴

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda, que dura em média 2 meses, sendo sucedida por uma fase crônica, que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro.⁶ As manifestações clínicas da fase aguda, caracterizada pela alta parasitemia, começam de 6 a 10 dias após a infecção e permanecem por aproximadamente dois meses.¹⁶ Em grande parte dos casos, a fase aguda da doença é oligossintomática, principalmente em adultos, dificultando o diagnóstico, por não ser valorizada pelo agente de saúde e também pelo paciente.⁶ Além disso, em alguns casos pode-se apresentar um quadro febril e se sintomático manifesta-se como uma doença semelhante à gripe, dentro de 1 a 2 semanas de exposição. O paciente apresenta febre prolongada, mal estar, náusea, vômito e diarreia e pode ainda apresentar outras manifestações clínicas, como miocardite, alterações

eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia.^{6,14} A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios que envolvem o cérebro (por ex., meningoencefalite).⁶ A detecção da doença é portanto, dificultada devido à ausência de sintomas específicos.

A fase crônica se instala à medida que os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda reduzem de intensidade. Uma miocardite focal se instala durante a fase indeterminada da doença, com possibilidade de aumentar a magnitude e abrangência, devido à destruição das fibras cardíacas e aumento da fibrose⁶. Na fase crônica da doença os níveis de parasitemia permanecem abaixo dos níveis detectáveis no hospedeiro e nesta fase crônica podem ocorrer principalmente complicações cardíacas, digestiva e cardiodigestiva¹⁷.

Na maioria dos casos de pacientes chagásicos crônicos, a doença permanece assintomática por um longo período, e cerca de 10% dos pacientes avançam para estágios de lesões digestivas como megaesôfago e megacólon, caracterizada por disfunções gastrointestinais e neuronais no sistema digestivo. Lesões no megaesôfago provocam disfagia com odinofagia, combinados com dor epigástrica, regurgitação, hipersalivação e desnutrição em casos graves. As lesões no megacólon afetam o segmento sigmóide, reto ou cólon descendente ou ambos e produz uma distensão abdominal, obstrução intestinal devido ao fecaloma ou volvo sigmóide.^{6,13,17}

Cerca de 30% dos casos de pacientes chagásicos crônicos desenvolvem a forma cardíaca da doença, com distúrbios de condução, danos irreversíveis ao miocárdio, arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo secundário e, principalmente, podem chegar à cardiopatia chagásica crônica, lesão mais grave da doença e a forma mais comum de doença miocárdica de etiologia não-isquêmica.^{6,15} A doença de Chagas é uma das principais causas de cardiomiopatia infecciosa em todo o mundo.⁵ Nesta fase da doença, a saúde dos pacientes geralmente se deteriora rapidamente, levando geralmente o indivíduo a óbito devido à insuficiência cardíaca.¹⁸ Conforme citado anteriormente, os pacientes chagásicos podem desenvolver manifestações relacionadas ao sistema cardiovascular ou ao digestivo e, em muitos casos, ambos os sistemas ficam comprometidos, caracterizando as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas crônica, sendo denominada cardiodigestiva.^{15,19}

1.2 Tratamento da doença de Chagas

Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas foram desenvolvidos em meados da década de 60 e têm sido utilizadas até os dias atuais, sendo o *nifurtimox* (Lampit®, da Bayer), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido **(1)** e o *benzonidazol* (Rochagan®, Rodanil®, da Roche, Lafepe), N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida **(2)**. Suas estruturas são mostradas na Fig. 3. Estes fármacos são eficazes na etapa aguda da doença, porém não apresentam o mesmo efeito na fase crônica da doença. Apesar de serem muito utilizados, causam severos danos colaterais, como perda de peso, sonolência, náuseas, hipersensibilidade, vômitos, polineuropatia, dermatite, depressão da medula óssea, dentre outros.^{6,16,19,20}

Figura 3. Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas: **(1)** nifurtimox, **(2)** benzonidazol. (Fonte: www.sigmaaldrich.com)

Atualmente no mercado brasileiro está disponível apenas o benzonidazol, produzido e comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), depois de os direitos de patente e tecnologia terem sido cedidos ao governo brasileiro pelo grupo suíço Roche®, em 2003. Desde 2008 a Lafepe é a única fabricante de benzonidazol no mundo, sendo responsável pela fabricação e distribuição do fármaco para os países endêmicos e não endêmicos.^{19, 20}

Estes fármacos atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, onde o grupo nitro (-NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (-NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂ (vide Figura 4). Este processo inicia-se pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase que leva à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂•) e à subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). No caso do benzonidazol, este radical nitro formado estaria envolvido com o efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* como, por exemplo, DNA e citocromo

P450. Já o nifurtimox atua através do ciclo redox e depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*), uma vez que o nitro ânion radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e conseqüentemente regenera o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox. O íon radical superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{3+} , forma o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o íon hidroxila (OH^-). A espécie radicalar hidroxil é a principal responsável pelo efeito tripanocida, através de mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T.cruzi*, modificando a viabilidade do parasita.⁶

Figura 4. Mecanismos de ação propostos para os fármacos benzonidazol e nifurtimox. (Fonte: L. C. Dias, M. A. Desso, *Química Nova*, 2009, **32**(9), 2444-2456)

Para o desenvolvimento de um tratamento eficaz, devem ser levados em consideração quais são os principais alvos moleculares. Atualmente os principais alvos moleculares ou estratégias analisados para o *T. cruzi*, como promissores no desenvolvimento de novos fármacos, são a inibição da biossíntese

de esteróis, as proteases, a biossíntese de lipídeos, as DNA topoisomerasas, a via glicolítica e o metabolismo de pentose fosfato (mecanismo de defesa contra estresse oxidativo), dentre outros.^{6,16}

Dentre os principais alvos estão as enzimas DNA topoisomerasas I e II por desempenharem papel essencial na replicação de DNA do *T. cruzi* e, neste caso, no processo de replicação da cadeia de mini-círculos e maxi-círculos do DNA do parasita kinetoplasto (kDNA). As enzimas proteases também são um importante alvo por desenvolverem múltiplas funções, que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita pelo sistema imune do hospedeiro. Um dos exemplos de proteases mais exploradas é a cruzaina ou cruzipaina da classe das cisteíno-proteases do *T. cruzi* que desempenham função ligada diretamente à sobrevivência e replicação do parasita.⁶

A cruzaina é a principal cisteína protease de *T. cruzi*. Esta protease está presente em todas as fases do ciclo de vida do parasita e desempenha papel essencial na replicação da forma intracelular. A inibição da cruzaina têm sido uma propriedade amplamente estudada para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da Doença de Chagas.²¹ Recentemente foram reportados alguns derivados de tiossemicarbazonas que apresentaram potente atividade de inibição frente a cruzaina, assim como atividade tripanocida frente a parasitas em meio de cultura.²¹ Estes estudos relacionam a inibição da cruzaina a um possível mecanismo de ação do potencial fármaco estudado.

Outra estratégia, muito utilizada na literatura, visa como alvos moleculares vias importantes do parasita como, por exemplo, a via glicolítica, que é responsável pela produção de energia do parasita e esta via torna-se ainda mais importante devido às formas tripomastigotas serem desprovidas do ciclo do ácido tricarboxílico completo, sendo então altamente dependentes da via glicolítica para produção de ATP. A enzima mais explorada como alvo na via glicolítica é a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo esta responsável por catalisar a conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, na presença do cofator NAD⁺ e fosfato inorgânico.⁶ Como resultado destes estudos tem sido descobertos diversos inibidores de origem natural e sintética, com boa diversidade química, destacando-se entre eles as cumarinas, flavanóides e ácidos anacárdicos de origem natural, compostos sintéticos derivados de planejamento racional como os nucleosídeos, reativos intermediários de nitrogênio (óxido nítrico, nitroxil e peroxinitrito) e também alguns complexos doadores de NO, como por exemplo complexos de rutênio.^{6,22}

Apesar dos extensos esforços, ainda não são bem conhecidos e estabelecidos os prováveis mecanismos de ação destes compostos.

1.3 Cobre e zinco como elementos essenciais

O cobre e o zinco são elementos essenciais a vida, seus íons estão presentes no sítio ativo de várias metaloenzimas e metaloproteínas, estando assim associados a uma grande variedade de funções biológicas vitais.^{23,24}

O zinco difere dos demais metais de transição por conter a camada eletrônica d completa (d^{10}) e assim não participa de reações redox, mas atua como ácido de Lewis aceitando um par de elétrons, tornando-se assim um íon estável.²⁵ O conteúdo total de zinco no organismo varia de 1,5 a 2,5 g e este atua como um co-fator em milhares de proteínas e um dos metais de transição mais abundantes no meio biológico exercendo função estrutural, de sinalização ou funções regulatórias.²⁶ O zinco está presente principalmente em mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos, ovos, nozes e leguminosas.

As enzimas e proteínas que contêm zinco participam do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Alguns exemplos de proteínas das quais o zinco faz parte são a anidrase carbônica, a fosfatase alcalina, a carboxipeptidase e a superóxido dismutase (Cu,Zn SOD), onde o zinco pode ter função catalítica ou estrutural. O zinco está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica. O papel fisiológico do zinco como antioxidante é evidenciado por 2 mecanismos: proteção de grupos sulfidrilas contra oxidação, como ocorre com a enzima δ -ácido aminolevulínico desidratase, e na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por metais de transição como ferro e cobre, através da dismutação ou desproporcionamento de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, como na SOD.²⁴ Nestes dois casos, o zinco atua em mecanismos de defesa antioxidante do organismo.

O zinco também está diretamente ligado a atividade de enzimas como, por exemplo, a RNA polimerase que atua diretamente com a síntese de DNA e RNA. Este metal exerce ainda diversas outras funções como: transporte através de membrana, envolvimento com apoptose, mecanismos de defesa antioxidantes e desenvolvimento cognitivo.²⁴

O cobre é um metal de transição com três estados de oxidação acessíveis: Cu^0 , Cu^+ , Cu^{2+} , sendo os dois últimos encontrados nos sistemas biológicos. O cobre é o terceiro metal-traço mais abundante em humanos,^{28,29} após o ferro e o zinco, sendo um elemento biológico essencial, encontrado em uma grande variedade de fontes alimentares como carnes, frutos do mar, vegetais e cereais.²³ O cobre, na sua “forma livre”, encontra-se em baixíssimas concentrações nos seres vivos, devido à sua facilidade em se coordenar aos ligantes biológicos, que contêm nitrogênio, como aminoácidos e diferentes proteínas.

Sendo os íons cobre(II) íons de fronteira, segundo a teoria de Lewis, têm a preferência por ligantes contendo nitrogênio, que são mais duros, enquanto íons de cobre(I) preferem ligantes moles, como os contendo enxofre. Sendo assim, o cobre apresenta-se sempre ligado a ligantes biológicos e dificilmente apresenta-se na forma dita “livre”. A concentração “livre” de cobre no interior de uma célula foi estimada em 10^{-10} M, o que corresponde a menos de um íon de cobre por célula, baseado na constante de inserção do cobre na Cu,Zn SOD, com $\log K = 18$.²⁹

O cobre está presente no sítio ativo de inúmeras proteínas e enzimas, os quais estão associados a uma vasta gama de funções biológicas vitais, tanto funcional como estrutural, como ativação e transporte de oxigênio, nas hemocianinas; transferência de elétrons, como na plastocianina e azurina;²⁸ metabolismo de ferro, como na ceruloplasmina; e dismutação do íon superóxido, como na SOD.³⁰

Na enzima Cu,Zn-SOD o cobre tem papel antioxidante, catalisando a dismutação de radicais superóxidos, enquanto nas oxidases, como tirosinase, catecol oxidase, amina oxidase ou galactose oxidase, catalisa a oxidação de vários substratos pelo oxigênio molecular, levando à formação de produtos carbonílicos e peróxido de hidrogênio.³¹ Devido à grande variedade de funções desempenhadas pelo cobre, podemos verificar que além de seu papel essencial, íons de cobre podem também ter ações danosas ao organismo. Devido à sua atividade redox, o cobre pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROS), convertendo o H_2O_2 em radicais hidroxil e, conseqüentemente, oxidando substratos presentes nas células, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, em reações denominadas tipo-Fenton, similarmente ao verificado com íons de ferro.³²

As reações descritas acima, representam o que chamamos de estresse oxidativo, devido a capacidade do cobre em gerar espécies altamente reativas durante o processo de oxidação de substratos endógenos e que, subsequentemente, podem participar de reações em cadeia e causar danos a outras biomoléculas.^{33,34} Esse processo, que envolve a reatividade do cobre, é modulado pela vizinhança do metal, ou seja, depende dos ligantes que estão coordenados ao íon metálico.^{33,34} O potencial de redução do metal pode mudar acentuadamente dependendo da natureza das ligações e da geometria ao redor do íon metálico. Desta forma, os ligantes que podem ser utilizados para uma ação específica, como por exemplo, no desenvolvimento de metalofármacos, são avaliados de acordo com sua reatividade frente a íons de cobre. Aqueles ligantes que favorecem a formação de EROs, através de processos catalíticos

controlados, tendem a constituir fortes candidatos a serem utilizados em processos eficientes na cura de doenças degenerativas. Deste modo, artigos de revisão recentes descrevem diversos exemplos de complexos de cobre como potenciais agentes farmacológicos, especialmente para atuar como drogas antitumorais ou antiparasitárias³⁵.

1.4 Ligantes do tipo bases de Schiff

As bases de Schiff compõem uma classe de compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura o grupo imina ($RR'C=N-R''$), obtido pela condensação do grupo amina primária de uma molécula com o grupo aldeído ou cetona de outra.^{36,37} A reação da síntese da imina é reversível, envolvendo um intermediário carbinolamina e a eliminação de moléculas de água,^{36,37} conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5. Reação genérica da formação de uma imina.

As iminas são ligantes que formam complexos de coordenação estáveis com a maioria dos metais de transição, reagindo rapidamente e sendo isoladas do meio reacional sem grandes dificuldades. A facilidade em formar complexos metálicos em diferentes estados de oxidação e a grande estabilidade térmica apresentada por esses complexos possibilita a utilização destes compostos em diversos processos catalíticos, especialmente em estudos bioinorgânicos.³⁶⁻³⁹

Particularmente, é de grande interesse sintetizar ligantes imínicos que utilizam como precursor a isatina (1H-indol-2,3-diona), um oxindol endógeno encontrado em fluidos humanos, no cérebro e em tecidos periféricos de mamíferos. A isatina possui muitas ações farmacológicas já identificadas, sendo um reconhecido agente bactericida, fungicida, antiviral, além de exercer atividade pró-apoptótica.⁴⁰⁻⁴⁴

A isatina apresenta um interessante equilíbrio ceto-enólico que pode influenciar seus modos de coordenação, dando origem a complexos catiônicos ou neutros, com diversas formas estruturais e diferentes reatividades.⁴⁵ As estruturas tautoméricas para a isatina são denominadas lactama e lactima,

apresentando duas carbonilas quimicamente diferentes: a carbonila da lactama (α) e a carbonila cetônica (β)⁴⁶, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6. Tautômeros de equilíbrio ceto-enólico da isatina.

Compostos naturais contendo isatina são encontrados em plantas,^{47,48} além de ser um dos produtos do metabolismo da adrenalina em seres humanos.⁴⁹ É um material de partida versátil para síntese orgânica, na construção de compostos heterocíclicos e de precursores de fármacos.

A isatina e seus derivados têm sido muito estudados e existem diversos complexos de cobre(II) e outros metais de transição coordenados a estes ligantes, já descritos na literatura.^{50,51}

Em nosso grupo de pesquisa, já há algum tempo, vimos estudando complexos metálicos com ligantes bases de Schiff visando desenvolver potenciais agentes farmacológicos.⁵²⁻⁵⁵ Os ligantes de nossos estudos baseiam-se em moléculas com atividade biológica já comprovada, particularmente derivados de oxindóis, descritos como inibidores de quinases, enzimas envolvidas no ciclo celular, e que quando coordenadas a cobre ou zinco constituem potenciais agentes antitumorais.⁵⁶ Os mecanismos de ação destes complexos têm como principais alvos o DNA e a mitocôndria, envolvendo reatividade como cátions lipofílicos e formação de espécies reativas de oxigênio.⁵³

1.5 Complexos metálicos como potenciais metalofármacos

A utilização de metais como agentes terapêuticos tem contribuído para o aumento no interesse da compreensão da função de íons metálicos em processos biológicos e assim elucidar a função específica exercida pelos metais em humanos e compreender o que a falta ou excesso destes poderá resultar.⁵⁷

Compostos inorgânicos são empregados em uma grande diversidade de aplicações na medicina, atingindo as principais classes de medicamentos, por apresentarem diferentes mecanismos de ação. Como exemplo, complexos de platina são utilizados no tratamento do câncer, complexos de ouro no tratamento de artrite, complexos de prata utilizados como agentes antimicrobianos, complexos de

mercúrio como diuréticos e o nitroprussiato de sódio, como um vasodilatador utilizado no controle da pressão arterial, principalmente em casos de emergência.⁵⁸⁻⁶²

Estudos recentes têm sido desenvolvidos com metais essenciais, como o cobre, já que é esperado menor nível de toxicidade dos compostos derivados desses metais quando comparado aos metais não essenciais,^{63,64} como platina ou ródio, já utilizados com sucesso em diversos fins terapêuticos, mas que apresentam ainda assim problemas. O cobre além de ser um metal essencial, possui habilidade de gerar espécies de radicais livres, e assim muitos complexos de cobre com diferentes tipos de ligantes têm sido estudados com o objetivo de melhorar a atividade biológica destes ligantes, incluindo atividade antiácida, antiinflamatória, fungicida, antimicrobiana, antiviral e antitumoral.^{63,65-68}

Complexos metálicos são interessantes objetos de estudo por serem miméticos de componentes (funcionais e estruturais) dos seres vivos, com propensão em perder elétrons formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluídos biológicos, e é na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas.⁵⁷ Quando na forma catiônica os íons metálicos apresentam-se deficientes em elétrons e no meio biológico biomoléculas tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons, ocasionando assim em atração entre estas espécies de cargas opostas, conduzindo a uma tendência geral de “íons metálicos interagirem com moléculas biológicas” formando compostos de coordenação extremamente estáveis. A estabilidade termodinâmica do centro metálico em ambientes biológicos não é determinada apenas pelo estado de oxidação particular, pela biomolécula e pela geometria de coordenação, mas também pela estrutura tridimensional do complexo formado, pela estequiometria e disponibilidade das biomoléculas para coordenação. A hidrofobicidade ou hidrofobicidade local, impedimento espacial dos sítios de coordenação e ligações de hidrogênio que podem dar origem a interações entre átomos ligados e não ligados na esfera de coordenação do metal estão entre os fatores que podem aumentar ou diminuir a estabilidade dos complexos metálicos.⁵⁷

Sabe-se que a utilização dos complexos metálicos como agentes terapêuticos está relacionada ao controle de suas propriedades cinéticas e termodinâmicas, por meio da escolha adequada de seu estado de oxidação, tipo e número de biomoléculas ligantes, e geometria de coordenação. Em resumo, é necessário conhecer a estabilidade termodinâmica e a seletividade dos compostos focalizados. Esta estratégia faz com que seja possível encontrar atividade e especificidade biológica para estes compostos e, muito mais importante, minimizar seus efeitos colaterais.⁵⁷

A utilização de compostos de cobre está relacionada à facilidade dos íons de cobre em formar ligações com ceruloplasmina, albumina e outras proteínas, inserindo-se em sítios de ligação para metais, e também de poder estar associado a ligantes formando complexos que também interagem com

biomoléculas, proteínas e ácidos nucleicos, através de ligações de hidrogênio, ligações de van der Waals ou London.⁶⁸ Por exemplo, complexos de cobre com ligantes do tipo tiossemicarbazonas e nitroacetofenonas apresentaram atividade *in vitro* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*, mostrando assim que complexos de cobre podem ser promissores em diversas terapias farmacêuticas.⁶⁸

Há relatos na literatura do uso de metais de transição na quimioterapia da doença de Chagas, principalmente de uma variedade de complexos que também apresentaram atividade antitumoral, devido às semelhanças bioquímicas em termos de metabolismo e recursos de sistemas de proteção entre os tripanossomatídeos e algumas células tumorais.⁶ Complexos metálicos tem sido uma rica fonte de quimioterápicos eficazes contra doenças parasitárias. O interesse em utilizar medicamentos à base de metal para fins terapêuticos tem aumentado, pois é reconhecido que os complexos metálicos apresentam uma grande variedade de estruturas químicas e a reatividade dos centros metálicos nas biomoléculas alvo pode ser ajustada através da escolha adequada de metais e ligantes.⁶⁹

Em nosso laboratório foram sintetizados compostos de cobre com diversos ligantes, que têm sido estudados com a finalidade de desenvolver potenciais agentes terapêuticos. Estes compostos já tiveram sua atividade apoptótica demonstrada frente a diversas células tumorais,⁶³ baseada em sua capacidade de gerar quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio (EROs).^{70,71} Também demonstraram ser capazes de inibir proteínas específicas, como as topoisomerases,⁷² envolvidas em processos cruciais para ácidos nucleicos. Desta maneira, levando em conta esses resultados anteriores, pretendemos com os estudos aqui relatados verificar sua possível reatividade frente ao parasita *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho as principais metas foram:

- a) Preparar e caracterizar, através de diferentes técnicas (UV/Vis, IV, EPR, RMN) complexos de cobre(II) e zinco(II) com diferentes ligantes oxindolímínicos;
- b) Estudar suas interações com biomoléculas fundamentais, como DNA e HSA, através de fluorescência e/ou dicroísmo circular (CD);
- c) Verificar a possível atividade antiparasitária destes complexos, frente a *T. cruzi*, procurando identificar e analisar suas principais propriedades que pudessem explicar essa atividade;
- d) Tentar elucidar prováveis mecanismos de ação destes complexos no meio biológico.

3. PARTE EXPERIMENTAL I – Síntese e caracterização

3.1 . Reagentes e Soluções

Para o preparo dos ligantes e dos complexos propostos neste trabalho foram utilizados reagentes com grau de pureza entre 95-99%. Nas tabelas a seguir, citam-se os reagentes, solventes e biomoléculas utilizados no desenvolvimento dos procedimentos experimentais.

Tabela 1. Reagentes utilizados durante as sínteses e caracterização dos complexos com suas respectivas porcentagem (%) de pureza e procedência.

Reagentes, (% de pureza)	Procedência
Perclorato de cobre (II), (98%)	Aldrich Chemical Co
Cloreto de zinco, (98%)	Aldrich Chemical Co
Isatina, (98%)	Aldrich Chemical Co
1,3-diaminopropano, (95%)	Aldrich Chemical Co
2(2-aminoetil)piridina, (95%)	Aldrich Chemical Co
Hidróxido de sódio	QM
Ácido clorídrico	Meck Chemical Co
Albumina humana (HSA)	Sigma-Aldrich

Na Tabela 2 estão listados os solventes utilizados durante as sínteses e caracterização dos compostos, bem como suas respectivas procedências.

Tabela 2. Solventes utilizados com suas respectivas porcentagem (%) de pureza e procedência.

Solventes, (% de pureza)	Procedência
Etanol, (96%)	Merck Chemical Co
Etanol absoluto, (99%)	Meck Chemical Co
Diclorometano, (99%)	Meck Chemical Co
Metanol absoluto, (99%)	Merck Chemical Co
Dimetilsulfóxido	Merck Chemical Co

A água para o preparo das soluções aquosas foi deionizada em sistema purificador normalmente encontrado em laboratórios.

3.2.Sínteses

As sínteses dos ligantes e respectivos complexos metálicos, foram realizadas segundo metodologia já desenvolvida em nosso laboratório há vários anos, baseada em estudos descritos na literatura^{36,73}, tendo sido realizadas modificações ou adaptações adequadas em cada caso.

3.2.1. Composto $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ – Composto 1

Este composto foi sintetizado conforme método já desenvolvido em nosso laboratório e descrito na literatura⁷⁴.

Utilizando-se um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 10mmol (1,4713g) de isatina em 40mL de etanol, mantendo-se por 10 minutos sob refluxo e agitação. Após o resfriamento da solução, adicionou-se lentamente 5mmol (417μL) de 1,3-diaminopropano à solução de isatina, em seguida o pH da solução foi ajustado para 5,5 com 2 gotas de ácido clorídrico concentrado. Ao término desta etapa, a solução apresentou coloração alaranjada e ocorreu a formação de precipitado amarelo, a mesma foi mantida sob refluxo, por 6 horas. Após este período notou-se que a quantidade de precipitado havia aumentado.

Figura 7. Síntese do ligante (isapn), formado a partir de isatina e 1,3-diaminopropano.

Tendo formado o ligante em solução, adicionou-se 5mmol de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (1,8527g) dissolvidos em 5mL de água deionizada, quando se observou a formação de um precipitado marrom esverdeado. O pH aparente foi ajustado para 6 com aproximadamente 8 gotas de hidróxido de sódio $1mol.L^{-1}$.

Figura8. Preparação do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ na forma de perclorato.

Após manter a solução na geladeira por 24 horas, o precipitado formado foi filtrado e lavado com água deionizada e etanol gelados. Secou-se o composto em dessecador sob vácuo, por 24 horas.

3.2.2. Composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ – Composto 2

O $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ também foi sintetizado conforme método já desenvolvido em nosso laboratório e descrito na literatura⁷⁴.

Adicionou-se 5mmol de isatina (0,7357g) em 25mL de etanol, em um balão de fundo redondo, mantendo-se por 10 minutos sob refluxo e agitação. Seguido o resfriamento da solução de isatina, gotejou-se 5mmol (688 μL) de 2(2-aminoetil)piridina, e ajustou-se o pH para 5,5 com 6 gotas de ácido clorídrico concentrado. Após esta etapa, a solução foi mantida sob agitação constante por 24 horas. Ao término deste período, a solução apresentava coloração vermelho intenso, porém não era possível notar a presença de precipitado.

Figura9. Síntese do ligante (isaepy), a partir de isatina e 2-aminoetilpiridina.

Adicionou-se lentamente 2,5mmol (0,9263g) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dissolvidos em 5mL de água deionizada. Instantaneamente observou-se a formação de um precipitado marrom-café, sendo então o pH ajustado para 8 com 60 gotas de NaOH 1mol.L⁻¹ e a solução permaneceu sob agitação constante por 12 horas. Notou-se que o pH aparente ao término do período decorrido era aproximadamente 6.

Figura10. Preparação do composto [Cu(isaepy)₂]²⁺ na forma de perclorato.

Após o período de 12 horas, a solução foi armazenada em geladeira, em seguida realizou-se a filtração, lavando o complexo com água deionizada e etanol gelados. Secou-se o composto em dessecador a vácuo, por 24 horas.

3.2.3. Composto [Zn(isapn)](ClO₄) - Composto 3

O composto 3 foi sintetizado conforme método já desenvolvido em nosso laboratório e descrito na literatura⁷⁵. O [Zn(isapn)]⁺ foi preparado e cedido pelo Ms. Ricardo Alexandre Alves Couto, aluno de doutorado do nosso grupo de pesquisa.

Figura 11. Preparação do composto [Zn(isapn)]⁺ na forma de perclorato.

3.2.4. Composto [Zn(isaepy)Cl₂] – Composto 4

Sintetizado conforme método já desenvolvido em nosso laboratório e descrito na literatura⁷⁵. Este composto também foi cedido pelo Ms. Ricardo Alexandre Alves Couto, aluno de doutorado do nosso grupo de pesquisa.

Figura12. Preparação do composto $[Zn(isaepy)Cl_2]$ na forma de cloreto.

3.3.Métodos de Caracterização e Instrumentação

3.3.1.Análise Elementar

As análises elementares (C, H e N) dos complexos sintetizados foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando um equipamento CNH Perkin Elmer 2400, o qual permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. Os resultados foram considerados aceitáveis quando apresentaram reprodutibilidade dentro de 0,5 a 1%.

3.3.2.Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho, para a análise dos modos vibracionais dos compostos propostos foram obtidos com Espectrômetro FTIR da ABB BOMEM, modelo MB-102 com transformada de Fourier, por refletância difusa, na faixa de $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram maceradas em KBr (~20mg complexo/ 200mg KBr), previamente seco a 120°C em estufa.

3.3.3.Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio(^1H -RMN)

Os estudos para determinação estrutural do $[Zn(isapn)]^+$, foi realizado pelo aluno de doutorado Ricardo A. Alves Couto. O espectro ^1H RMN foi obtido em um instrumento Bruker DRX-500, operando em 500 MHz, na Central Analítica do IQ-USP. O espectro do ligante isapn foi registrado em temperatura ambiente, as soluções foram preparadas em DMSO- d_6 e o complexo $[Zn(isapn)]ClO_4$ em MeOH- d_4 , em pH aparente 5 e 7.⁷²

3.3.4. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os complexos de cobre **1** e **2** já haviam sido preparados e caracterizados anteriormente, principalmente por espectroscopia EPR.⁶³ Esta técnica permite uma estimativa da distorção tetraédrica ao redor dos íons de cobre(II),⁷⁶ dependendo do ligante, e que devido ao efeito Jahn Teller preferem uma geometria tetragonal, ao contrário de cobre(I), com simetria tetraédrica preferencial. Essa distorção pode muitas vezes explicar diferenças de reatividade apresentada pelos complexos. Os dados apresentados referem-se a medidas já publicadas pelo nosso grupo.

3.3.5. Dicroísmo circular

Experimentos utilizando-se esta técnica são propostos para ilustrar como um centro quiral (centro opticamente ativo, por exemplo, macromoléculas biológicas) pode discriminar entre a luz circularmente polarizada à direita ou à esquerda⁷⁷. Os estudos de dicroísmo circular foram efetuados em espectropolarímetro JASCO J-720 da Central Analítica, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para realizar as leituras, foram utilizadas células esféricas de quartzo de 1,00 cm e 0,10 cm de caminho óptico. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, utilizando-se velocidade de varredura de 100 nm/min, tempo de resposta de 1s, modo contínuo, largura da banda de 2,0 nm e 3 acumulações.

3.3.6. Fluorescência

Os estudos de fluorescência foram efetuados em fluorímetro SPEX – Fluorolog 2 da Prof. Dra. Antonia Tavares do Amaral, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para realizar as leituras, foram utilizadas células esféricas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e todas as faces transparentes. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, utilizando-se comprimento de onda de excitação λ_{ex} = 492 nm e a fluorescência emitida foi medida em aproximadamente 600 nm.

4. PARTE EXPERIMENTAL II- Interação com biomoléculas

4.1. Medidas de Dicroísmo Circular (CD): Estabilidade Termodinâmica

A técnica de dicroísmo circular⁷⁷ foi utilizada para verificar a estabilidade termodinâmica relativa dos complexos de cobre(II) e zinco(II) estudados, utilizando a proteína HSA (albumina humana) como ligante competitivo. Para este estudo, titulou-se a proteína HSA com cada um dos complexos metálicos e registraram-se os espectros de CD da solução, em espectropolarímetro JASCO J-720, no intervalo de 300 a 650 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo esférica de caminho óptico de 1,00 cm. Foram adicionadas alíquotas sucessivas dos complexos de cobre(II) e zinco(II) (concentrações de 0 a 1,0mM) a uma solução de albumina (0,70 a 0,50 mM) em tampão fosfato 50mM, pH=7,4, sempre respeitando as razões estequiométricas pré-determinadas. O espectro de CD foi registrado após cada adição dos compostos. Para quantificação dos dados foi necessário obter as curvas-padrão, utilizando como controle uma solução do aqua-complexo de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, e uma solução do aqua-complexo de zinco(II), $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, onde supõe-se que todo cobre ou zinco adicionado está inserido na proteína HSA.

^{78,79}

4.2. Medidas de Dicroísmo Circular: Modificações na Estrutura Secundária da HSA

Para a verificação da modificação na estrutura secundária da HSA, utilizou-se novamente a espectroscopia de dicroísmo circular. Neste estudo, utilizou-se uma cubeta de quartzo esférica de 0,10 cm e os espectros foram registrados no intervalo de 190 a 300 nm, sendo todas as análises realizadas à temperatura ambiente. As reações foram realizadas em eppendorff, utilizando concentrações de $3,3 \times 10^{-7}$ a 15×10^{-6} mol.L⁻¹ dos complexos de cobre e zinco, sendo adicionados a uma solução de albumina com concentração 5×10^{-6} mol.L⁻¹, em tampão fosfato 50 mM, contendo NaCl 0,1M, em pH 7,4. Os resultados foram expressos como elipsicidade residual em deg.cm².dmol⁻¹, e foi também obtida a % de α -hélice por meio do algoritmo chamado K2D3 desenvolvido por Caroline Louis-Jeune e colaboradores.⁸⁰

4.3. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de Fluorescência

A interação dos complexos com o DNA foi estudada utilizando-se espectros de fluorescência. Estes estudos foram realizados em tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio, em pH=7,4. O

NaCl é adicionado ao tampão para evitar uma segunda fixação do brometo de etídeo (EB) aos sítios do DNA⁸¹.

A concentração de DNA neste experimento foi de 30 μM . Para verificar o ponto de saturação de moléculas de brometo de etídeo nos sítios do DNA, os espectros de emissão do EB foram registrados variando-se a concentração na faixa de 10 a 120 μM . A concentração de saturação utilizada foi de 40 μM . Após as concentrações de DNA e EB terem sido estabelecidas, o estudo de fluorescência foi realizado com o aumento das concentrações dos compostos de zinco variando de 0 a 200 μM , onde cada espectro foi registrado após 10 minutos da adição dos compostos.

4.4. Dicroísmo circular no monitoramento de interações dos complexos com DNA

A interação dos complexos com o DNA foi também estudada utilizando-se medidas de dicroísmo circular, por esta ser muito sensível ao modo de interação do DNA com pequenas moléculas, tornando-se eficaz na detecção de mudanças na conformação da cadeia de DNA em decorrência de interações entre o DNA e os complexos⁸². Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos à temperatura ambiente com uma cubeta de 0,1 cm. A concentração de DNA Calf-Thymus utilizada foi de 800 μM e os espectros foram registrados na ausência e na presença dos compostos, variando-se a concentração de 10 a 150 μM na região entre 200 e 300 nm.

4.5. Medidas do ponto de fusão (*melting point*) do DNA

As medidas do *melting point* do DNA foram efetuadas pela Dra. Queite de Paula no laboratório do Prof. Dr. Nicholas Farrell do Departamento de Química, da Virginia Commonwealth University.

Foi efetuada a incubação do DNA com os compostos de cobre(II) e zinco(II) em diferentes razões de ligação, ($r_i = \{\text{número inicial de moléculas dos compostos em solução}\} / \{\text{número de bases de DNA em solução}\}$), variando nas proporções 0.0, 0.01, 0.05 e 0.1, por 24 horas. A temperatura variou entre 40 e 95°C, aumentando na taxa de 0,5°C/min. Em cada experimento, a absorbância da solução foi medida a 260 nm, em espectrofotômetro UV-vis. O *melting point* foi obtido quando a absorbância medida correspondesse à metade do valor inicial.

5. PARTE EXPERIMENTAL III- Atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi*

5.1. Manutenção dos parasitos e das células LLCMK₂

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram obtidas por infecção de células LLC-MK₂, conforme metodologia descrita na literatura⁸³, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C e 5% de CO₂.

As células LLCMK₂ foram obtidas por repiques sucessivos utilizando tripsina, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C e 5% de CO₂⁸³.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de culturas de células LLC-MK₂ (células epiteliais de rim de macaco Rhesus) infectadas pelo parasito. As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido de 75cm² em meio DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), 3,7mg/L de bicarbonato de sódio e 2,0mg/L de Hepes. Após adesão e formação de uma monocamada celular, as células foram infectadas com 5x10⁶ tripomastigotas e mantidas a 37°C em estufa de CO₂. Após 48 horas, as células foram lavadas para a remoção dos parasitos extracelulares e o meio de cultura, trocado a cada dois dias. Após sete dias de infecção, formas tripomastigotas, liberadas das células infectadas, foram coletadas no sobrenadante, purificadas, quantificadas e utilizadas nos ensaios de infecção.

5.2. Compostos empregados e preparo das amostras

Quatro compostos metálicos foram utilizados neste estudo: [Cu(isapn)](ClO₄)₂, [Cu(isaepy)]₂(ClO₄)₂, [Zn(isapn)](ClO₄) e [Zn(isaepy)Cl₂]. As soluções estoque foram preparadas, utilizando-se 5mg de compostos, que foram dissolvidos em 1mL de DMSO, individualmente, em tubos de polipropileno de fundo cônico com capacidade de 1,5mL. Posteriormente, adicionou-se “Meio de Eagle modificado por Dulbecco” (DMEM) para obter as concentrações previamente selecionadas dos compostos. O meio DMEM possui uma grande variedade de componentes fundamentais para atender as necessidades básicas da célula.

5.3. Teste de viabilidade em macrófagos peritoneais

Camundongos C57BL/6 foram estimulados com tioglicolato 3%, três dias antes da obtenção dos macrófagos peritoneais. Para verificar o efeito dos compostos sobre a viabilidade dos macrófagos, foi realizado um ensaio com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]⁸⁴.

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma®) pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan.⁸⁴ Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição do solvente DMSO.

A quantificação da redução de MTT estabelece um método colorimétrico capaz de avaliar a viabilidade celular, pois indica a atividade da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias celulares.⁸⁵ Os cristais de formazan dissolvidos com DMSO absorvem na região do visível, sendo assim quantificados por espectrofotometria.^{84, 86}

Foram plaqueados 2×10^5 células em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. Após aderência das células, 200µL de meio DMEM contendo diferentes concentrações dos compostos, foram adicionados incubando-se a placa de cultura por um período de 24 e 48 horas em estufa a 37°C, com 5% CO₂. Posteriormente 22µL de MTT (5mg/mL) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por 4 horas. Após este período de incubação, foi retirado o sobrenadante de cada poço e foram adicionados 80µL de DMSO e 5 minutos depois a absorbância da placa foi medida em espectrofotômetro, a 492nm.

5.4. Efeito dos compostos sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas na presença de alíquotas de diferentes concentrações dos compostos de cobre e zinco. Foram plaqueados 2×10^5 parasitos em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100µL de meio de cultura contendo parasitos na forma tripomastigota e 100µL das soluções dos complexos em diversas concentrações. Passado este período de 24 e 48h, a viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi* foi avaliada verificando-se a mobilidade dos parasitos por microscopia ótica, através da contagem em câmara de Neubauer.

5.5. Avaliação do efeito dos compostos sobre formas amastigotas de *T. cruzi*

Para a realização deste teste, 5×10^5 macrófagos peritoneais foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços e incubados a 37°C em estufa de CO₂ 5% por 2 horas. Posteriormente, tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na proporção 5:1 (parasito/macrófago) e as culturas foram incubadas por mais 2 horas. Após incubação, os poços foram lavados três vezes com meio RPMI a 37°C para remover os parasitos livres. Em seguida, 1 ml de diferentes concentrações dos compostos de cobre (10-25 µmol/L) e zinco (60-155 µmol/L) foram adicionados e a placa incubada por 24 horas e 48 horas. Utilizamos também o benzonidazol como referência em nossos testes, por se tratar do fármaco atualmente utilizado no tratamento da doença de Chagas. Este teste foi realizado em duplicata.

Decorridos os períodos de 24 horas e 48 horas, as lamínulas foram fixadas, utilizando o kit de coloração panótico rápido, para posterior verificação da atividade inibitória dos compostos frente ao parasito. Para determinação da atividade inibitória foram contados amastigotas, macrófagos infectados e macrófagos não infectados, totalizando 300 macrófagos por contagem.

5.6. Análises gráficas e estatísticas

Os tratamentos gráficos e análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Síntese e Caracterização dos Complexos

Os complexos de cobre sintetizados já haviam sido preparados em nosso laboratório e descritos na literatura. Eles foram então re-preparados segundo os procedimentos reportados e, para caracterizá-los, foi realizada a análise elementar e registrados os respectivos espectros de infravermelho. Os complexos de zinco foram sintetizados pelo aluno de doutorado Ricardo A. Alves Couto, conforme metodologia já previamente descrita na literatura com algumas modificações. Para caracterização dos compostos de zinco foram realizados estudos de RMN e para os de cobre estudos de EPR.

A) Análise elementar

Os resultados de análise elementar, apresentados na Tabela 3, para os compostos sintetizados possibilitam determinar que os complexos preparados foram coerentes com a estrutura esperada em cada caso (Ver Esquema 1).

Esquema 1. Estrutura dos complexos sintetizados

Tabela 3. Resultados de análise elemental para os compostos sintetizados.

Composto	%C	%H	%N
[Cu(isapn)](ClO₄)₂	40,02	3,06	9,32
MM= 594,81 g/mol	(38,37)	(2,71)	(9,42)
[Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂	47,96	3,77	10,67
MM= 765,01 g/mol	(47,10)	(3,42)	(10,98)
[Zn(isapn)]ClO₄[#]	45,71	3,48	11,31
MM=496,19 g/mol	(45,99)	(3,05)	(11,29)
[Zn(isaepy)Cl₂][§]	46,45	3,41	11,01
MM= 387,58 g/mol	(46,49)	(3,38)	(10,84)

Os valores calculados estão entre parênteses.

[#]ref. *Metallomics*, **2014**, **6**, **117** – **125**; [§]ref. manuscrito em preparação.

B) Espectroscopia na região do infravermelho

A radiação infravermelha (IV) corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas, isto é, entre 12800 e 10 cm⁻¹. A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10000 a 100cm⁻¹ quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular, em um processo que é quantizado⁸⁷. A faixa de energia de maior utilidade está situada entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹.

As frequências das vibrações obtidas através de espectros no infravermelho permitem caracterizar as ligações presentes nos compostos e alguns grupos funcionais específicos⁸⁷. Os espectros obtidos podem ser observados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13. Espectro vibracional no Infravermelho (FTIR) do composto **[Cu(isapn)](ClO₄)₂** em KBr, por reflectância difusa.

Figura 14. Espectro vibracional no Infravermelho (FTIR) do composto $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$ em KBr, por reflectância difusa.

Para o composto $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$, é observada uma banda em 1599 cm^{-1} referente à presença da imina (estiramento $C=N$). A presença de ânion perclorato acarreta nas bandas em 1106 e 621 cm^{-1} , comprovando assim que este ânion atua como contra-íon. A banda em 1667 cm^{-1} refere-se à presença de $C=N$ do anel da isatina. Uma banda em torno de 1733 cm^{-1} ocorre devido ao estiramento $C=O$. A presença do grupo NH , confere uma banda característica em torno de $3465\text{--}3325\text{ cm}^{-1}$. A banda larga em 3325 cm^{-1} está atribuída à presença de grupo OH . Estas atribuições foram feitas com base em resultados para complexos semelhantes.

Para o composto $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$, pode ser observada uma banda em 1586 cm^{-1} referente à presença da imina (estiramento $C=N$). O ânion perclorato é responsável pela banda em 1099 e 740 cm^{-1} , comprovando assim que este ânion atua como contra-íon, também neste caso. A banda em 1639 cm^{-1} refere-se à presença de $C=N$ do anel da isatina. A presença do grupo NH , confere uma banda característica em torno de $3060\text{--}1734\text{ cm}^{-1}$. A banda larga em 3503 cm^{-1} está atribuída à presença de grupos OH .

Para melhor análise dos resultados, na Tabela 4 estão listadas as principais bandas presentes nos espectros de IV dos compostos de cobre estudados.

Tabela 4. Principais bandas, em cm^{-1} , dos compostos de cobre(II) e suas atribuições.

Atribuições	(1) $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	(2) $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{+2}$
νOH	3325	3503
$\nu (\text{NH}) / \delta (\text{NH})$	3465-3325	3060-1734
$\nu (\text{Csp}^3\text{-H})$	2974	
$\nu (\text{Csp}^2\text{-H}) / \delta (\text{Csp}^2\text{-H})$	2669	
$\nu (\text{C=O})$	1733	
$\nu (\text{C=N})_{\text{Base de Schiff}}$	1599	1586
$\nu (\text{C=N})_{\text{Anel isatina}}$	1667	1639
$\nu (\text{ClO}_4) / \delta (\text{ClO}_4)$	1106 - 621	1099 - 740

ν = deformação axial (estiramento) simétrico ou assimétrico, δ = deformação angular

A caracterização dos compostos de zinco(II) pela técnica de Infravermelho, foi realizada pelo aluno de doutorado Ricardo A. A. Couto. Para o composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$, é observada uma banda em 1608 cm^{-1} referente a presença da imina (estiramento C=N), este mesmo estudo comprova a ausência do ânion perclorato atuando como contra-íon. A banda em 1664 cm^{-1} refere-se a presença de C=N do anel da isatina. Uma banda em torno de 1735 cm^{-1} ocorre devido ao estiramento C=O . A presença dos grupos NH e OH são confirmadas pela presença das respectivas bandas características em 3205 cm^{-1} e 3454 cm^{-1} .

Para o composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, é observada uma banda em 1595 cm^{-1} referente à presença da imina (estiramento C=N). O ânion perclorato atuando como contra-íon é justificado pela presença das bandas em 1105 e 624 cm^{-1} . A banda em 1637 cm^{-1} refere-se a presença de C=N do anel da isatina. A presença dos grupos OH são caracterizadas pela presença das bandas em 3469 cm^{-1} . Estas informações são descritas resumidamente na Tabela 5.

Tabela 5. Principais bandas (em cm^{-1}) e suas atribuições verificadas para os complexos de zinco(II).

Atribuições	$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$	$[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$
$\nu (\text{O-H})$	3454	3469
$\nu (\text{N-H})$	3205	-
$\nu (\text{C=O})$	1735	1728
$\nu (\text{C=N})_{\text{isatina}}$	1664	1637
$\nu (\text{C=N})_{\text{schiff}}$	1608	1595
$\nu (\text{Cl-O})$	-	1105
$\delta (\text{C-H}_{\text{ar}})$	761	757
$\delta (\text{O-Cl-O})$	-	624

ν (estiramento), δ (deformação)

C) Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H RMN

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica de espectroscopia de absorção, onde sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências (rf) em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades⁸⁷.

O ligante isapn foi caracterizado pela técnica ^1H RMN, Figura 15, (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm), onde foram efetuadas as seguintes atribuições: 2.32 (q, 2H, CH_2), 4.15 (t, 4H, CH_2), 6.90 (d, 2H, CH_{ar}), 7.04 (t, 2H, CH_{ar}), 7.41 (t, 2H, CH_{ar}), 7.88 (d, 2H, CH_{ar}), 10.80 (s, 2H, NH).

Figura 15. Espectro ^1H RMN do ligante *isapn*, em DMSO- d_6 , a temperatura ambiente.

A espectrometria de massas baseia-se no conceito que em um composto ionizado, os íons são separados na base da razão massa/carga e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro⁸⁷. Para o ligante isapn foi registrado o espectro de massas em metanol, Figura 16, onde apresentou a razão massa carga para o fragmento íon molecular $[\text{M}+1]$ ($m/z=333,1$) e foi possível determinar o peso molecular para a molécula $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ como sendo 332,36.

Figura 16. Espectro de massa do ligante isapn, em metanol.

O espectro ^1H -RMN da forma protonada em pH 5, monitorado em 500 MHz, MeOH-d_4 , d ppm, apresentou as seguintes atribuições: 6.96 (d, 2H, CH_{ar}), 7.11 (t, 2H, CH_{ar}), 7.55 (d, 2H, CH_{ar}), 7.59 (t, 2H, CH_{ar}), vide Figura 17. Para o espectro de RMN obtido em pH aparente 7, é possível observar o equilíbrio entre as espécies ceto-enol e enol-enol, indicados pela presença de múltiplos sinais, conforme Figura 18.

O espectro ^1H RMN dos complexos de zinco, $[\text{Zn}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)$, registrados em solução de metanol- d_4 , a forma predominante é ceto-ceto, de acordo com os picos mais intensos atribuídos em comparação ao ligante livre, vide Figuras 17 e 18. Em pH 5 esta forma ainda é predominante, mas picos adicionais indicam a presença da forma correspondente ceto-enol e enol-enol, as quais são mais expressivas em pH 7, Figura 19, ou pH 10 (dados não apresentados, indicando a decomposição). Sendo assim, em pH fisiológico a espécie ceto-enol é a predominante.

Figura 17. ^1H RMN do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, em MeOH-d_4 , em pH aparente pH 5, a temperatura ambiente.

Figura 18. ^1H RMN do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, em MeOH-d_4 , em pH aparente pH 7, a temperatura ambiente.

A análise de uma amostra em ESI-MS utiliza um solvente polar ou de polaridade intermediária para formar uma solução diluída da substância, o espectro de massa por electrospray apresentado na Figura 19, apresenta o íon positivo do complexo de zinco isatina-base de Schiff, utilizando uma mistura de metanol/água (9:1), um solvente que apresenta ponto de ebulição moderado e não precisam de altas temperaturas para serem removidos das microgotas carregadas produzidas no processo de ionização por eletrospray. O espectro de massa obtido revela também uma relação 1:1 metal ligante. A ampliação dos picos apresenta os isótopos de zinco, sendo que os dois mais abundantes foram observados numa proporção 1:0,56 para ^{64}Zn (48,6%) e ^{66}Zn (27,4%).

O espectro de massas do complexo de zinco apresentou a razão massa carga referente ao fragmento do íon molecular do complexo ($m/z=396,9$), em $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$, sendo o peso molecular para o fragmento referente ao monócation $[\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2^{64}\text{Zn}]$ igual a 396,05 e também foi determinado a $m/z=398,9$ [$M_w=398,05$ para o padrão isotópico do monócation de (^{66}Zn)].

Figura 19. Espectros de massa do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$, dissolvido em metanol/água (9:1).

Para os complexos de zinco, a espécie ceto-ceto é predominante em ambos os espectros obtidos. Embora, com o aumento do pH os sinais característicos destas espécies decrescem suas intensidades de sinal, e outros sinais são atribuídos às espécies ceto-enol ou enol-enol. Apesar do complexo ter sido isolado na síntese realizada na forma ceto-enol, quando em solução é esperado que estejam presentes todas as espécies em diferentes proporções, de acordo com o equilíbrio.

Figura 20. Equilíbrios ceto-enólicos referentes ao complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$, com as espécies ceto-ceto, ceto-enol e enol-enol.

D) Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

A caracterização dos complexos de cobre(II) foi realizada utilizando-se a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), sendo esta uma ferramenta muito útil no estudo de complexos com elétrons desemparelhados. A técnica de EPR mais comumente utilizada é a espectroscopia EPR de onda

contínua, onde a radiação de microondas (GHz) é aplicada à amostra continuamente⁸⁸. O EPR baseia-se no fato de que um spin eletrônico pode adotar duas orientações ao longo da direção definida por um campo magnético aplicado, β . A diferença de energia entre os estados $m_s = +1/2$ e $-1/2$ é:

$$\Delta E = g \mu \beta$$

Onde o valor de g , chamada constante giromagnética, depende da identidade da partícula e μ é o momento magnético.⁸⁹ Para o elétron livre, g_e é 2,0023. O fator g em um complexo difere de g_e por uma quantidade que depende da habilidade do campo aplicado de induzir campos magnéticos locais no complexo. O sinal e a magnitude dos campos locais induzidos dependem da separação dos níveis de energia do complexo. Quanto mais próximos eles estão, mais fácil é para o campo aplicado induzir a circulação dos elétrons, e consequentemente produzir um campo magnético local. O valor de g indica a simetria do ambiente ligante e dá uma indicação da disponibilidade quanto aos níveis de energia do complexo. As linhas observadas em um espectro de EPR podem ser desdobradas pela interação do spin eletrônico com o spin nuclear de átomos vizinhos, que apresentem momento magnético. Em espectros de íons metálicos paramagnéticos, o desdobramento dominante vem do próprio íon metálico chamado estrutura hiperfina (A). O espectro apresenta-se usualmente com muitas linhas, porque os valores de g e das constantes hiperfinas (A) são anisotrópicas, isto é, possuem valores diferentes dependendo do eixo de simetria. Por exemplo, para o íon cobre com momento spin nuclear $I = 3/2$ o sinal hiperfino será desdobrado em $n = 2I + 1 = 4$ linhas.

As posições e os desdobramentos das linhas especificados pelos valores de g e das constantes hiperfinas (A) dependem da direção do campo magnético com relação aos eixos moleculares, isto é, da simetria molecular. A anisotropia espectral é muito importante na interpretação dos espectros de íons dos metais de transição e usualmente é especificada por três valores de g e de A : A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} , g_{zz} , g_{xx} e g_{yy} . Em alguns casos o sistema molecular apresenta simetria axial e os valores são designados: $A_{//} = A_{zz}$ (A paralelo) e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$ (A perpendicular), e analogamente, $g_{//} = g_{zz}$ e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$.

Deste modo, a interpretação dos parâmetros obtidos nos espectros de EPR permite obter informações sobre a configuração eletrônica de íons metálicos paramagnéticos, seu estado de oxidação e suas características estruturais, como por exemplo, distorções ao redor do íon.⁹⁰

Para caracterização dos complexos de cobre(II) utilizou-se dados de EPR previamente publicados^{70,71} e valores mais recentes, com variação do pH.⁹¹ Os parâmetros correspondentes a cada um

dos complexos de cobre(II) estudados, registrados em solução congelada (etanol:água, 4:1) são mostrados na Tabela 6.

O spin nuclear do cobre é 3/2, e então se observa um espectro EPR característico de íons cobre, com 4 linhas na região de $g_{//}$, além da linha mais larga correspondente a $g_{\perp}$. Todos os compostos de cobre apresentaram simetria axial em solução, ou seja, o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente nos eixos x e y, que são iguais, e o parâmetro $g_{//}$ tem maior valor do que o $g_{\perp}$.

A relação empírica $g_{//} / A_{//}$ (cm) tem sido usada para caracterizar complexos miméticos de diversas proteínas de cobre, e fornece um indicativo da extensão da distorção tetraédrica num ambiente tetragonal ao redor do metal. Se esta razão estiver próxima de 100 cm, a geometria observada ao redor do íon será mais corretamente descrita como quadrado planar ou tetragonal, e se esta relação estiver entre 170 a 250 a geometria indicada será melhor representada por um tetraedro distorcido⁹². Portanto, quanto maior o valor desta relação, maior a extensão da distorção tetraédrica na esfera de coordenação do metal. Para orientações intermediárias, os valores de g e de A dependem do ângulo que o campo magnético faz com os principais eixos da molécula.

Tabela 6. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos de cobre(II) estudados.

Complexos, a diferentes pHs	$g_{\perp}$	$g_{//}$	$A_{//}$, G	$A_{//}$,* 10^{-4}cm^{-1}	$g_{//}/A_{//}$ cm
[Cu(isaepy)]⁺					
pH = 3	2.086	2.426	112.0	126.8	191
pH = 5	2.065	2.259	176.6	186.2	121
pH = 7	2.058	2.246	172.6	181.0	124
pH = 10	2.059	2.252	176.7	185.8	121
[Cu(isapn)]⁺					
pH = 4	2.101	2.445	114.5	130.7	187
pH = 5	2.102	2.444	114.5	130.6	187
pH = 6	2.102	2.255	184.5	194.2	116
pH = 7	2.112	2.256	186.5	195.9	115
pH = 9	2.103	2.258	184.5	194.5	116
pH = 10	2.092	2.262	184.0	194.3	116
pH = 11	2.088	2.266	184.6	195.3	116

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

Estudos presentes na literatura^{70, 71} apresentaram resultados onde há alteração na razão $g_{//}/A_{//}$ quando varia-se o pH, sugerindo uma modificação substancial no ambiente do centro de cobre(II), como consequência do equilíbrio ceto-enólico apresentado na estrutura do ligante. Os parâmetros

obtidos indicam que é esperada uma mudança de geometria a partir de um tetraedro distorcido para um quadrado planar ou tetragonal ao redor do íon cobre(II), este estudo permite concluir que dependendo do pH uma das espécies predomina na solução, isto é, a pH mais ácido apresenta-se na forma ceto e em meios alcalinos na forma enol⁷⁰, semelhante ao equilíbrio ceto-enólico apresentado na Figura 20, para o composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]\text{ClO}_4$.

Baseado nos parâmetros determinados, verifica-se que a pH 7,4, o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ está na forma enol, isto é com o grupo indólico atuando como ligante tridentado. No caso do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^+$ a espécie predominante parece ser a ceto-enol, consistente com os dados de RMN, para o correspondente complexo de zinco(II). Estas formas têm menor distorção tetraédrica, com uma geometria ao redor do íon cobre bastante próxima de um quadrado planar.

6.2. Interações com Biomoléculas

6.2.1. Estabilidade Termodinâmica: Medidas de Dicroísmo Circular (CD) com HSA

Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica espectroscópica que pode ser utilizada para avaliar mais detalhadamente a interação entre a HSA e os compostos sintetizados, sendo definida como a interação entre a diferença de absorção da luz polarizada a esquerda com a luz polarizada a direita por uma molécula opticamente ativa, sendo assim obtido um espectro característico devido às diferentes intensidades das bandas de absorção⁹³. Esta técnica é utilizada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas e também para verificar mudanças na estrutura secundária da proteína^{93, 78}. Em nosso caso, foi utilizada para determinar a estabilidade termodinâmica dos complexos de cobre(II) e zinco(II).

Para a determinação da constante de estabilidade relativa dos complexos, utilizou-se a albumina humana (HSA) como ligante competitivo, que é conhecida por ser uma proteína abundante no plasma sanguíneo e um quelante fisiológico eficiente para cobre. Para os compostos de cobre(II) as amplitudes dicróicas geradas são registradas em $\lambda = 564\text{nm}$ (banda Cotton característica), uma vez que a ligação do cobre(II) à albumina causa uma mudança nas transições eletrônicas próximas deste comprimento de onda. A amplitude dessa banda característica negativa de Cotton corresponde à formação de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HSA})]$ e é diretamente proporcional à sua concentração^{52,79,92,94}. A presença de um conjunto de bandas positiva e negativa na região do visível está associado à transição d-d do íon cobre(II) coordenado ao sítio N-terminal da albumina⁹². Para os compostos de zinco(II) as amplitudes dicróicas geradas são registradas

em 354 nm, uma vez que a ligação do zinco(II) à albumina causa uma mudança nas transições eletrônicas deste comprimento de onda. A amplitude desta banda corresponde à formação de [Zn(HSA)] e é diretamente proporcional à sua concentração. Como citado anteriormente a HSA possui um sítio N-terminal seletivo para a ligação de íons cobre(II), com alta constante de estabilidade ($\log K=12,0$)^{94,95}, enquanto que os íons zinco(II), provavelmente interagem em vários sítios, sendo um deles o sítio Cys34 e uma outra região interdomínios, formada por dois resíduos de aminoácidos do domínio I (Asn99 e His67) e um segundo proveniente do domínio II (His247 e Asp249), mostrando uma constante de estabilidade mais baixa ($\log K=7,1$).⁹⁶⁻⁹⁸

Uma solução de HSA foi titulada com quantidades crescentes dos compostos, e através desta titulação pode ser deduzida a estabilidade termodinâmica dos complexos, isto é, as respectivas constantes relativas de estabilidade, a partir da regressão linear da amplitude dicróica observada em cada adição de complexo à HSA em função da concentração de [M^{II}(HSA)] formado.

Os equilíbrios competitivos entre os complexos e a albumina humana na coordenação de íons cobre(II) e zinco(II) foram comparados, usando a constante de estabilidade, M(II)-HSA, já conhecida e descrita na literatura. Para determinar a correspondente constante de estabilidade para as espécies [ML] consideramos os seguintes equilíbrios químicos.^{79,96}

A partir deste equilíbrio global é possível descrever a constante de estabilidade (β) para o complexo de cobre(II) e zinco(II):

$$\beta_{rel} = \frac{K[M(HSA)]}{K[ML]} = \frac{[M(HSA)] \cdot [L]}{[HSA] \cdot [ML]}$$

Onde as concentrações das várias espécies em solução são dadas por:

$$[L] = [M(HSA)]$$

$$[ML] = [M]_0 - [M(HSA)]$$

$$[HSA] = [HSA]_0 - [M(HSA)]$$

Sendo

$$[L] = \text{concentração de ligante livre}$$

$[ML]$ = concentração de cobre coordenado pelo ligante L

$[HSA]$ = concentração de HSA não-metalada

$[M(HSA)]$ = concentração de cobre inserido na proteína HSA

$[HSA]_0$ = concentração total de HSA

$[M]_0$ = concentração total de cobre

A interação dos compostos com HSA foi estudada por dicroísmo circular, utilizando os aqua-complexos que adicionados na forma de sal $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ou $ZnCl_2$ como referência, para obtenção de curvas-padrão. Admite-se que os aqua-complexos que irão interagir com a HSA, formam $[Cu^{II}HSA]$ e $[Zn^{II}HSA]$ estequiometricamente. Podemos considerar que neste caso a concentração do complexo adicionado é igual à concentração das espécies $[Cu^{II}HSA]$ e $[Zn^{II}HSA]$ formadas, supondo que todo o metal tenha se ligado à proteína. Utilizando-se a regressão linear entre a concentração de $[Cu^{II}HSA]$ e $[Zn^{II}HSA]$ formada versus a amplitude dicróica medida em $\lambda = 564nm$ e $354nm$ respectivamente, é possível assumir através da equação da reta ($y = ax+b$) que y é a amplitude dicróica e x é a concentração de $[Cu^{II}HSA]$ ou $[Zn^{II}HSA] \cong [L]$. Sendo assim, é possível calcular o valor da concentração de $[Cu^{II}HSA]$ ou $[Zn^{II}HSA]$ após cada adição do complexo de cobre ou zinco utilizado, $[ML]$.

Para cada ponto obtido, teremos um valor de amplitude dicróica que fornecerá um valor de β_{rel} e assumindo que para a espécie $[Cu^{II}HSA]$ $\log K_{[Cu(HSA)]} = 12,0^{94,95}$, é possível obter o valor médio de $\log K_{[ML]}$ para cada composto de cobre(II) e compará-lo com o descrito na literatura.⁵² Para os compostos de zinco ao assumir que para a espécie $[Zn^{II}HSA]$ $\log K_{[Zn(HSA)]} = 7,1$ é possível obter o valor médio de $\log K_{[ML]}$ para cada composto de zinco(II).⁹⁶ Verifica-se assim a influência do metal e do ligante imínico na interação dessas espécies de cobre e zinco com a proteína.

A curva analítica para $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$ encontra-se na Figura 21, já a curva analítica para $[Zn(H_2O)_4]^{2+}$ encontra-se na Figura 22 e os espectros de CD dos compostos de cobre e zinco estudados, estão sendo mostrados nas Figuras 23 à 26.

Figura 21. Curva analítica padrão da amplitude dicróica, em 564nm, versus concentração da espécie $[\text{Cu(HSA)}]$ formada, usando $[\text{Cu(H}_2\text{O)}_4]^{2+}$ como titulante.

Figura 22. Curva analítica padrão da amplitude dicróica, em 354nm, versus concentração da espécie $[\text{Zn(HSA)}]$ formada usando o composto $[\text{Zn(H}_2\text{O)}_4]^{2+}$ como titulante.

Figura 23. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, em tampão fosfato 50mM, pH=7,4.

Figura 24. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 25. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn(isapn)}]^+$.

Figura 26. Espectros CD registrados durante a titulação de HSA (0,70mM) com concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn(isaepy)Cl}_2]$.

Por meio dos espectros de CD obtidos, foram anotadas as amplitudes dicróicas (valores de γ) após cada adição de alíquotas de diferentes concentrações dos complexos, em seguida calculou-se as respectivas concentrações da espécie $[M(HSA)]$ formada, possibilitando a determinação do valor médio do $\log K$ para cada um dos complexos de cobre(II) e zinco(II), como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7. Valores das constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos em experimentos competitivos com HSA.

Complexo	$\log k$
$[Zn(isaepy)Cl_2]$	7,5
$[Zn(isapn)](ClO_4)$	7,2
$[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$	11,3
$[Cu(isapn)](ClO_4)_2$	13,0

Os valores do $\log K_{[CuL]}$ médio obtidos para os compostos $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$ e $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$, já estudados em nosso laboratório, foram comparados com os resultados anteriormente obtidos⁵², e notamos que eles apresentaram a mesma ordem de grandeza. E como já havia sido concluído em trabalhos anteriores^{52,99}, os valores das constantes de estabilidade relativa dos nossos compostos possuem mesma ordem de grandeza da constante de formação da espécie $[Cu^{II}HSA]$, isto é, o íon cobre inserido no sítio N-terminal da proteína. Os compostos de zinco(II) também apresentaram constantes da mesma ordem de grandeza que as espécies referentes ao metal inserido na proteína⁹⁶, indicando que todos os complexos estudados apresentam alta estabilidade, muito semelhante à da espécie $[M^{II}(HSA)]$, tanto para cobre como para zinco.

Logo, os ligantes competem eficientemente pelos íons de cobre e zinco em meio biológico, já que os compostos apresentaram estabilidade semelhante à encontrada para a espécie cobre-albumina e zinco-albumina. Portanto, ambas as espécies $[Cu^{II}L]/[Cu^{II}HSA]$ e $[Zn^{II}L]/[Zn^{II}HSA]$ encontram-se em equilíbrio no meio. Sendo assim, em meio biológico, os compostos são transportados no plasma, pois estão parcialmente coordenados a seu ligante inicial.

6.2.2. Modificação na estrutura secundária da HSA monitorada por CD

A variação conformacional da estrutura secundária de proteínas, que pode incluir arranjos de α -hélice, β -folha e conformação randômica, é observada na região de 190 a 250nm. Em proteínas que

apresentam alta porcentagem da forma α -hélice, a forma β -folha e a randômica possuem baixa elipsicidade em 208 nm.¹⁰⁰ O cálculo do conteúdo de α -hélice foi realizado utilizando-se um algoritmo chamado K2D3 desenvolvido por Louis-Jeune e colaboradores.⁸⁰ Para análise das modificações na estrutura secundária da HSA, foram utilizadas baixas concentrações de albumina e cubetas de 0,10 cm.¹⁰¹ De acordo com a literatura, para que a proteína mantenha sua estrutura secundária usual, ou seja, que ela permaneça enrolada, é necessário que o tampão possua NaCl para manter a força iônica. Desta forma, para este experimento utilizamos tampão fosfato 50 mM contendo NaCl 0,1M para preparar a solução de albumina.

A conformação da proteína apresentou algumas mudanças quando na presença de todos os compostos em estudo. Os compostos (2), (3) e (4) foram os que mais danificaram ou modificaram a conformação da albumina. Ao aumentar a concentração do complexo é possível observar uma diminuição acentuada no conteúdo de α -hélice (banda em 208 nm) e uma diminuição mais branda do conteúdo de β -folha (banda em 220 nm). Através dos espectros, pode-se também verificar que não houve mudanças na estrutura terciária da HSA, já que não houve variações na região de 260 a 280 nm. Estas constatações podem ser observadas nas Figuras 27 à 30.

Figura 27. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA, na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

Figura 28. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 29. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 30. Espectros CD para monitoramento de modificações na estrutura secundária da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

A Tabela 8 mostra os percentuais de α -hélice calculados para os compostos, a partir do algoritmo K2D3. A porcentagem de estrutura α -hélice calculada para a HSA, antes da adição dos complexos foi de 68%.

Tabela 8. Porcentagens estimadas de α -hélice para HSA usando o programa K2D3⁸⁰, através das curvas de dicroísmo circular.

Proporção [ML]: [HSA]	% α -hélice			
	$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$	$[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$	$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$
1:15	68	68	68	68
1:10	68	68	68	68
1:5	68	68	68	68
1:3	68	68	68	68
1:2	68	68	67	68
1:1	68	64	58	54
2:1	63	51	44	49
3:1	51	39	30	34

Através da técnica de dicroísmo circular na região do ultravioleta, foi possível então verificar as modificações causadas na estrutura secundária da proteína, moduladas pelo ligante imínico. As observações no espectro foram confirmadas pelos resultados obtidos pelo algoritmo K2D3, que quantificou os percentuais de α -hélice presentes na proteína. Ambos os compostos de zinco(II) e o $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ foram os compostos que causaram maior perturbação na estrutura secundária da proteína, e estas perturbações tornam-se mais intensas a partir da proporção 1:1 (M:HSA).

6.3. Monitoramento de interações dos complexos com DNA, através de Fluorescência

A interação dos complexos de cobre(II) e zinco(II) foi estudada através de espectros de fluorescência. Para este estudo foi utilizada uma das mais sensíveis sondas de fluorescência que pode se ligar ao DNA, o brometo de etídeo (EB),¹⁰² pois o DNA sozinho não emite fluorescência e quando o EB está intercalado ao DNA a emissão aumenta, quando comparado ao EB sozinho¹⁰³. Caso o complexo metálico intercale entre as fitas de DNA, ocorrerá uma diminuição dos sítios de ligação do DNA disponíveis para o EB, sendo assim a intensidade de fluorescência do sistema EB-DNA diminuirá¹⁰⁴. A finalidade deste estudo é verificar, ao adicionar os compostos, se estes são capazes de remover o EB do DNA, ou seja, se eles interagem com a biomolécula ou se intercalam entre as fitas de DNA.

A concentração de saturação da intensidade de fluorescência da solução de DNA com EB foi determinada utilizando-se concentrações na faixa de 10 a 120 μM de EB e DNA a 30 μM . Na Figura 31 é apresentada a curva de saturação de fluorescência obtida.

Figura 31. Curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida com a adição de concentrações variáveis de brometo de etídeo (EB) ao DNA (30 μM).

A utilização de concentrações variáveis de EB foi efetuada para verificar o ponto de saturação de moléculas de EB nos sítios do DNA. Em seguida a concentração de 40 μM de EB foi utilizada com diferentes concentrações dos complexos de zinco(II) variando de 0 a 200 μM , em tampão fosfato 50mM (pH 7,4).

Os espectros de emissão do EB ligado ao DNA na ausência e na presença dos complexos de cobre foram medidos à temperatura ambiente, 10 minutos após a adição do complexo, os resultados estão exibidos nas Figuras 32 e 33.

Figura 32. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA, na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 33. Espectros de emissão do EB ligado ao DNA na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Os espectros de emissão de fluorescência mostraram que os complexos de zinco não foram capazes de reduzir a intensidade de fluorescência, indicando que não houve competição com EB pelos mesmos sítios de ligação frente ao DNA.¹⁰⁴ Para os complexos estudados é esperado que a interação ao DNA ocorra através das fendas, mantendo interações por ligações de hidrogênio com a base.

É possível ver nos espectros que a diminuição na intensidade da fluorescência do brometo de etídio não é tão alta. A intensidade de fluorescência tem um maior decaimento nas maiores concentrações, onde também pode ser observado um desvio batocrômico. Este baixo decaimento indica que os compostos de zinco não possuem alta afinidade pela fenda ou cavidade maior do DNA. No entanto, foi traçado um gráfico da intensidade de fluorescência x concentração dos compostos, onde é possível observar a intensidade de fluorescência após a adição de cada um dos complexos de zinco na solução de DNA.

Figura 34. Variações verificadas na Intensidade de Fluorescência em função de concentrações crescentes dos complexos de zinco estudados.

A partir destas informações, é possível observar um decréscimo irregular na intensidade de fluorescência nos pontos iniciais, já os pontos obtidos com as concentrações elevadas de complexo, demonstram um maior decaimento na intensidade de fluorescência, porém não é possível prever quais

os processos de ligação que estão a acontecer, pois há uma mudança nesta região do espectro, tornando assim inconclusiva a sua avaliação.

Estudos anteriores na literatura¹⁰⁵ demonstraram para o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ que este é eficiente na competição com EB ligado ao DNA plasmidial, apresentando número de sítios de ligação (n) igual a 0,68 e constante de ligação (K_a^n) 750 M^{-1} , indicando assim que há interação de uma molécula para cada mol de DNA.

Este estudo suporta a hipótese que os complexos de zinco em questão não se ligam fortemente às fendas ou cavidades maiores do DNA. Na verdade ocorre a ligação entre o complexo e o DNA, pois há alteração na intensidade de fluorescência, em comparação com esta na ausência do composto, mas o decaimento é tão baixo e irregular que é possível afirmar que a constante de ligação é baixa.

6.4. Estudo da Interação dos Complexos de Cobre ao DNA através de Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular foi também utilizada na detecção de mudanças de conformação na cadeia de DNA em decorrência das interações DNA-droga, devido a alta sensibilidade dos sinais de CD ao modo de interação do DNA com pequenas moléculas.⁸²

As modificações que ocorrem na estrutura do DNA estão relacionadas aos sinais observados no espectro de CD. Uma intercalação de pequenas moléculas na estruturado DNA acarreta em um aumento nas intensidades das bandas de interações π e na elipsicidade, enquanto que interações eletrostáticas ou interação nas fendas do DNA apresentam pouca ou nenhuma perturbação nas bandas. A intercalação com o DNA estabiliza a conformação da forma B do DNA, como observado para os intercaladores clássicos¹⁰⁶.

O espectro de dicroísmo circular do CT-DNA consiste em uma banda positiva em 275 nm, que está relacionada à interação do tipo π existente entre os intercalantes e as bases, e uma banda negativa em 245 nm, devido à elipsicidade da forma B do DNA.^{107,108} Com a finalidade de observar as interações dos complexos em estudo com o DNA, adicionaram-se alíquotas de diferentes concentrações dos compostos ao DNA. Os resultados obtidos possibilitaram observar que nossos compostos causaram apenas pequenas perturbações nas bandas positiva e negativa do espectro de CD, conforme pode ser observado nas Figuras 35 a 38.

Figura 35. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$.

Figura 36. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$.

Figura 37. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$.

Figura 38. Espectros CD do DNA-CT na presença de concentrações crescentes do composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$.

Os resultados mostraram apenas pequenas perturbações nas bandas positivas e negativas dos espectros de CD, indicando que a interação entre os complexos e o DNA é desprezível, de forma

semelhante ao anteriormente observado com os complexos de cobre e outros ligantes oxindolímnicos.¹⁰⁵

Baseando-se em estudos anteriores, quando há um aumento significativo nas bandas positivas e negativas do espectro de CD, provavelmente ocorreu uma intercalação típica envolvendo interações π - π^* e uma estabilização da elipsicidade do DNA na forma B.¹⁰⁹ Como os complexos em estudo aparentemente não apresentaram alterações significativas nas intensidades das bandas do espectro de CD, a interação nas fendas do DNA é possivelmente o principal modo de interação DNA-complexo.

6.5. Medidas da temperatura de fusão (*melting point*) do DNA

O DNA *melting point* corresponde à separação de suas duas fitas e é medido através da absorbância da luz UV (260nm) pela solução de DNA, onde o valor da absorbância da luz UV é proporcional à fração de pares de bases não ligados. Esta absorbância ocorre devido a transição eletrônica π - π^* nas bases de purina e pirimidina, a qual reflete uma alteração na configuração eletrônica das bases, devido a diminuição do empilhamento da dupla hélice e emparelhamento das bases durante a fusão.¹¹⁰ Com o aumento da temperatura, ao iniciar a fusão da cadeia dupla de DNA, inicia-se a absorção da radiação da luz UV através de uma série de saltos acentuados, quando o valor atingir metade do valor inicial é obtido o *melting point* do DNA, a temperatura onde há separação das fitas de DNA.¹¹¹ A temperatura de *melting* (T_m), ou temperatura de pareamento, é a temperatura na qual as fitas de ácidos nucleicos que se pareiam entre si estão desnaturadas em 50%, sendo muito útil para a avaliação da estabilidade da dupla fita de DNA, pois é nesta temperatura onde metade dos fragmentos de DNA estão pareados e a outra metade não.

Os estudos da estabilização do CT-DNA através de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com os complexos de cobre(II) e zinco(II) foram avaliados medindo a temperatura de fusão do DNA a várias razões de ligação (rb). Os *melting points* de CT-DNA aumentaram com o aumento da razão de ligação ao se desenhar um gráfico de ΔT_m versus rb , como mostrado na Figura 39.

Figura 39. Variação no *melting point* após incubação do DNA com os compostos de cobre(II) e zinco(II) estudados, em função de *rb*.

Os resultados obtidos apresentaram pequena variação no *melting point* do DNA, o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^+$ obteve um aumento de 8°C, e para esta variação foi necessário utilizar uma razão de ligação de 0,1. Comparando-se se a variação obtida com estudos na literatura¹¹¹, verificou-se que os compostos variaram pouco o *melting point* do DNA.

O estudo da temperatura de fusão (ou *melting point*) do DNA permite relacionar o aumento da carga dos cátions com a estabilização, pois com o aumento da carga há o aumento do *melting point*, e portanto maior estabilidade das interações do CT-DNA com os compostos, esta relação está presente na literatura e foi observada em compostos de platina.¹¹¹ Os estudos da temperatura de *melting* do DNA reforçam a idéia de que para os complexos estudados é esperado que a interação ao DNA ocorra através das fendas, mantendo interações por ligações de hidrogênio com as bases, ao invés de se ligarem covalentemente ao DNA.

6.6. Atividade antiparasitária frente ao *Trypanosoma Cruzi*

6.6.1. Testes de viabilidade em macrófagos peritoneais

Foram realizados estudos de citotoxicidade a fim de verificar se os complexos são tóxicos para os macrófagos. É interessante, para o tratamento da doença de Chagas, que os compostos não possuam toxicidade para as células do hospedeiro, representadas neste estudo pelos macrófagos, e que apresentem atividade exclusivamente tripanocida.

Os resultados obtidos mostram que os compostos de cobre(II) foram mais tóxicos frente aos macrófagos que os compostos de zinco(II). Tal constatação pode ser verificada ao analisar os valores de (LC_{50}) em 24 e 48 h, apresentados nas Figuras 40 e 41. Os valores de LC_{50} também estão apresentados na Tabela 9.

Figura 40. Comparação entre os valores de LC_{50} frente a macrófagos, para os compostos estudados, analisados após 24 h de incubação, a 37°C.

Figura 41. Comparação entre os valores LC₅₀, frente a macrófagos, para os compostos estudados, analisados após 48 h de incubação, a 37°C.

Tabela 9. Valores da Concentração Letal a 50% de macrófagos (LC₅₀±EP*) incubados com os compostos estudados, a 37°C, durante os períodos indicados.

LC ₅₀ μmol/L	[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂	[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂	[Zn(isapn)]ClO ₄	[Zn(isaepy)Cl ₂]
LC ₅₀ 24 h	73,3 ±10,4	39,1±3,5	183,8 ±39,9	162,8 ±18,8
LC ₅₀ 48 h	31,3 ±14,0	16,2 ±5,2	138,9 ±23,8	177,8 ±25,0

* EP = erro padrão nas medidas

A concentração que reduz a viabilidade dos macrófagos em 50% diminui ao aumentar o tempo de incubação, mostrando assim que a toxicidade está relacionada com o tempo de incubação, uma vez que em 48 h os valores de LC₅₀ são menores que os encontrados após 24 h de incubação. Este estudo demonstrou que complexos com os mesmos ligantes, mas diferentes centros metálicos, demonstraram diferentes valores de toxicidade e os compostos de cobre(II) são significativamente mais tóxicos que os

análogos de zinco(II). Na literatura é possível encontrar estudos que mostram que as propriedades biológicas de diversos ligantes estão vinculadas ao íon metálico coordenado.^{112,113}

6.6.2. Efeito dos compostos sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Ensaio frente a forma tripomastigota de *T. cruzi* foram realizados para determinar a concentração que inibe 50% dos tripomastigotas de *T. cruzi* (IC_{50}). Os estudos da atividade tripanocida *in vitro* utilizando-se a cepa Y evidenciaram que os complexos de cobre foram mais tóxicos que os de zinco, seguindo a mesma tendência que a toxicidade frente aos macrófagos. Os valores de IC_{50} encontram-se nas Figuras 42 e 43 e na Tabela 10.

Figura 42. Valores de IC_{50} , para os compostos testados frente às formas tripomastigotas, após o período de incubação de 24 h, a 37°C.

Figura 43. Valores de IC₅₀, para os compostos testados frente às formas tripomastigotas, após o período de incubação de 48 h, a 37°C.

Tabela 10. Valores da Concentração Inibitória a 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀±EP*) dos compostos estudados, após incubação, a 37°C, durante os tempos indicados.

IC ₅₀ μmol/L	[Cu(isapn)](ClO ₄) ₂	[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂	[Zn(isapn)]ClO ₄	[Zn(isaepy)Cl ₂]
IC ₅₀ 24 h	15,5 ±5,5	10,7 ±3,8	32,9 ±14,1	80,2 ±52,6
IC ₅₀ 48 h	2,7±1,0	3,0 ±1,0	11,3 ±3,6	56,2 ±23

* EP = erro padrão nas medidas

Os resultados obtidos mostram que a toxicidade frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* aumenta ao aumentar o tempo de incubação, conforme pode ser observado na Tabela 10. Os valores de IC₅₀ obtidos mostram que as concentrações necessárias para inibir a forma tripomastigota de *T. cruzi* em 50% é menor que a concentração tóxica a 50% dos macrófagos. Na literatura é possível encontrar estudos com complexos de zinco(II) apresentando valores de IC₅₀ entre 12 e 197 μmol/L,¹¹⁴ sendo assim, nossos complexos apresentam uma eficácia equiparável ou até mesmo superior ao encontrado na literatura, mesmo tendo utilizado como parâmetro os complexos que apresentaram ação tripanocida inferior aos

complexos de cobre(II). Estudos com complexos de Rutênio realizados frente à forma tripomastigota de *T.cruzi* apresentaram também valores equiparáveis aos complexos de zinco(II), pois estes apresentam valores de IC₅₀ em torno de 11,69 a 193,4 µmol/L.¹¹⁵ Analisando-se apenas os resultados obtidos frente à forma tripomastigota de *T.cruzi*, verificamos que os complexos de cobre(II) apresentam ação tripanocida superior a diversos complexos já estudados¹¹²⁻¹¹⁵, e também que todos os compostos sintetizados podem ser comparados ao benzonidazol, que apresentou na literatura IC₅₀ igual a 13±2µmol/L frente à forma tripomastigota de *T.cruzi*.¹¹⁵ Um fator interessante que pode ser notado é que as diferentes atividades tripanocidas devem estar vinculadas ao íon metálico e também aos ligantes utilizados para formação dos complexos, pois nestes estudos é notável que as diferentes combinações de ligantes e metais levam a alterações nos valores de IC₅₀.

6.6.3. Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) mede o quanto um composto é ativo contra o parasito, sem causar danos às células do hospedeiro. Para calcular o IS, é necessário calcular o LC₅₀, a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% e o IC₅₀, concentração necessária para inibir 50% das formas tripomastigotas de *T.cruzi*. O índice de seletividade é calculado, dividindo-se o IC₅₀ pelo LC₅₀. Quanto maior o valor do IS, mais seletivo será o composto sobre o parasita, portanto, o composto será mais tóxico ao parasita que às células do hospedeiro. Os IS encontrados para nossos compostos mostram que a seletividade aumenta com o tempo de incubação. Os resultados obtidos em 24h mostram que existe alguma toxicidade para as células do hospedeiro, que, no entanto não aumenta tanto com o tempo de incubação, já em relação aos parasitos, a toxicidade obtida em 24h fica ainda maior após 48h de incubação. Os índices de seletividade para os compostos testados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Valores dos índices de seletividade (IS) para os compostos testados, após 24 e 48h de incubação, a 37°C, com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

	Índice de seletividade	
	24 h	48 h
[Cu(isapn)] ²⁺	4,8	11,6
[Cu(isaepy) ₂] ²⁺	3,7	5,4
[Zn(isapn)] ⁺	5,6	12,4
[Zn(isaepy)Cl ₂]	2,0	3,2
Benzonidazol	2,7*	

* Ciccarelli, et.al.-*Antimicrob.Agents Chemother*, **2012**, 56(10), 5315-5320.

Os resultados obtidos mostram que os compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})]^{2+}$ apresentaram os maiores índices de seletividade em 24 e 48 h, sendo assim os compostos mais promissores. O índice de seletividade nos revelou, por exemplo, que o composto $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, que apresenta um índice de seletividade 4,8 em 24 h, é aproximadamente 5 vezes mais tóxico ao tripomastigota de *T. cruzi* que ao macrófago.

Ao compararmos os índices de seletividade de complexos de cobre(II) e zinco(II) complexados a molécula bioativa 5,7-dimetil-1,2,4-triazol[1,5-a]pirimidina (dntp) reportados na literatura¹¹⁶, onde utilizaram a forma epimastigota de *T. cruzi* e *Vero Cells* para determinação dos respectivos IC_{50} e LC_{50} , foram obtidos IS iguais a 16,5 e 3,8 respectivamente, tendo em vista os IS obtidos no presente estudo, os complexos sintetizados apresentaram eficácia equiparável ou superior aos estudos presentes na literatura, quando utilizado como parâmetro o índice de seletividade.

Estudo para obter o índice de seletividade de complexos de cobre(II) com ligantes tiossemicarbazonas, foi realizado utilizando-se a toxicidade frente a forma epimastigota de *T. cruzi* e frente aos macrófagos. O complexo de cobre(II) com o ligante N(4)-Metil-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona apresentou índice de seletividade igual a 893, mas quando coordenado ao ligante N(4)-dimetil-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona apresentou IS igual a 2, mostrando que o ligante influenciou significativamente na ação tripanocida do complexo.¹¹⁷

O estudo da atividade anti-parasitária frente ao *T. cruzi* utiliza uma gama considerável de complexos metálicos. Um dos destaques são os complexos de rutênio, estes apresentam diversos valores de índice de seletividade, variando de acordo com o ligante utilizado. Estudo reportado na literatura¹¹⁸ apresentou IS na faixa de 2 a 38, utilizando-se os valores de IC_{50} frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* e LC_{50} frente a células de mamíferos V79.

Na literatura é possível encontrar estudos¹¹³⁻¹²⁰ com complexos de Cu(II), V(IV), Ru(II), Pd(II), Pt(II), Zn(II) com os mais diversos ligantes. Os índices de seletividade são obtidos utilizando-se a razão já citada anteriormente entre o IC_{50} e o LC_{50} , na literatura o IC_{50} é obtido tanto para a forma tripomastigota do *T. cruzi* quanto para a forma epimastigota e o LC_{50} também pode estar relacionado a diferentes tipos de células, como macrófagos, *Vero Cells*, dentre outros. Apesar dos diferentes parâmetros utilizados para determinação do índice de seletividade, e também das diferenças encontradas, o mais importante é que os compostos devem apresentar toxicidade maior frente ao parasito quando comparado a célula do hospedeiro.

Observamos também que todos os compostos são mais tóxicos ao tripomastigota de *T. cruzi* que ao macrófago, e ao comparar com o índice de seletividade do benzonidazol encontrado na literatura,¹²¹

que é igual a 2,7, após 24 h de incubação, podemos concluir até o presente momento que nossos compostos são promissores para o tratamento da doença de Chagas, uma vez que nossos índices de seletividade são de mesma ordem ou superiores que o IS do benzonidazol.

Uma vez que os IS obtidos, foram equiparáveis ou até mesmo superiores aos obtidos na literatura, os dois compostos de cobre(II) e seus análogos de zinco(II) foram utilizados nos estudos frente a forma amastigota. O índice de seletividade também é utilizado para determinação das concentrações a serem utilizadas nos estudos posteriores, pois este determina o número de vezes que a toxicidade do composto frente ao parasita é maior que a das células do hospedeiro. Sabendo-se que os complexos apresentaram índices de seletividade satisfatórios, utilizaram-se os complexos em concentrações acima do valor de IC_{50} e abaixo do valor de LC_{50} , pois assim, é esperado que nas concentrações testadas, estas serão mais tóxicas ao parasita que aos macrófagos.

Os índices de seletividade obtidos indicam que os complexos estudados podem ser candidatos a fármacos anti- *T. cruzi*. Estes compostos apresentaram-se como potenciais metalofármacos, provavelmente devido à sua lipofilicidade que podem facilitar a interação com o alvo biológico. A maior atividade tripanocida, observada para os complexos com ligantes isapn, deve-se provavelmente a sua estrutura mais tetragonal, com menor distorção tetraédrica. Os complexos com ligantes isapn foram mais ativos que os de isaepy também na inibição da proteína topoisomerase IB,⁷² sendo esta, outra indicação sobre o modo de ação destes complexos no meio biológico, pois mostra que estes compostos podem também inibir proteínas específicas. Os compostos de cobre utilizaram concentrações mais baixas que os respectivos de zinco para obter índices de seletividade de mesma ordem. Esta atividade maior pode ser devida à propriedade redox dos íons de cobre, não apresentada pelos íons de zinco, que levam à geração de EROs e conseqüente degradação ou oxidação de biomoléculas vitais para o parasita.

6.6.4. Efeito dos compostos sobre as formas amastigotas de *T.cruzi*

A avaliação do efeito dos compostos sobre as formas amastigotas de *T.cruzi* foi realizada pela contagem do número de macrófagos infectados e do número de amastigotas no interior destas células. Foram utilizadas diferentes concentrações dos compostos de cobre (10-25 μ mol/L) e zinco (60-155 μ mol/L) e a placa incubada por 24 h e 48 h. Os resultados foram obtidos em duplicata.

A) Avaliação da quantidade de amastigotas pelo número total de macrófagos

Avaliando-se o número de amastigotas pela quantidade total de macrófagos em 24 h, notamos que os compostos de cobre precisam de uma concentração mais baixa que os compostos de zinco para promover a inibição da proliferação de amastigotas na mesma ordem, em outras palavras, nas concentrações testadas os compostos apresentaram atividades tripanocida semelhantes, conforme pode ser observado na Figura 44.

Figura 44. Análise da quantidade de amastigotas pela quantidade total de macrófagos (expressa pelos macrófagos infectados e macrófagos não infectados) em função da concentração de diferentes complexos, após 24h de incubação, a 37°C.

Após o período de incubação de 48 h, observamos que a quantidade de amastigotas aumenta, e ao incubar com as drogas há maior inibição do crescimento da população de amastigotas. Na Figura 45 é possível observar que os compostos inibiram a proliferação de amastigotas em relação ao controle. O número de amastigotas é maior que em 24 h, porém a porcentagem de inibição aumenta. O benzonidazol foi utilizado como referência e utilizamos uma concentração de (50µg/mL ou 192.1µmol/L), e apesar de ser uma concentração alta, ao analisar a lamínulas observamos que o mesmo

apresenta baixa toxicidade frente aos macrófagos, sendo mais tóxico frente ao *T.cruzi*. Os experimentos realizados permitem uma análise qualitativa da toxicidade frente aos macrófagos.

Figura 45. Análise da quantidade de amastigotas pela quantidade total de macrófagos (expressa pelos macrófagos infectados e macrófagos não infectados) em função da concentração de diferentes complexos, após 48h de incubação, a 37°C.

Analisando os compostos de cobre, podemos dizer que o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ foi mais ativo na concentração 25,2µM, tanto em 24 h quanto em 48 h. O $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ apresentou atividades tripanocidas semelhantes nas concentrações 9,8µM e 19,6µM em 24 h e em 48 h os melhores resultados foram na concentração 19,6µM. Estes resultados podem ser observados na Figura 46. Tendo em vista as análises efetuadas, os compostos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ mostraram-se promissores no tratamento da doença de Chagas, por utilizarem baixas concentrações e significativas porcentagens de inibição da proliferação das formas amastigotas de *T.cruzi*.

Figura 46. Análise da inibição da proliferação de amastigotas pela quantidade total de macrófagos, utilizando compostos de Cu^{2+} , após 24h e 48h de incubação, a 37°C .

A análise da inibição de amastigotas pelos compostos de Zn^{2+} mostraram que ao aumentar a concentração de $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ a porcentagem de inibição do crescimento de amastigotas aumenta, entretanto, nas concentrações $80,6\mu\text{M}$ e $120,9\mu\text{M}$ não foi observada uma variação significativa. O $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ mostrou-se mais ativo na concentração $154,8\mu\text{M}$, tanto em 24 h como em 48 h. O $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ em 24 e 48 h apresentou atividades de mesma ordem nas concentrações $60,5\mu\text{M}$ e $80,6\mu\text{M}$, porém os testes realizados com a concentração de composto $120,9\mu\text{M}$ obtiveram resultados inconclusivos, uma vez que nesta concentração as lamina apresentavam poucos macrófagos e isto impossibilitou na análise da mesma. O $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e o $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ inibem as amastigotas praticamente na mesma proporção, e o melhor resultado foi o obtido na concentração $154,8\mu\text{M}$ de $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$, conforme pode ser observado na Figura 47.

Figura 47. Análise da inibição da proliferação de amastigotas pela quantidade total de macrófagos, utilizando compostos de Zn^{2+} , após 24h e 48h de incubação, a 37°C.

B) Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados

Esta análise nos mostra que os compostos foram capazes de diminuir a quantidade de macrófagos infectados e podemos dizer que os compostos de Cu^{2+} e Zn^{2+} , apresentaram as mesmas porcentagens de macrófagos infectados vs macrófagos totais em 24 h, de acordo com a Figura 48. Em 48 h as concentrações mais baixas apresentaram valores próximos ao do controle, mas ao aumentar a concentração eles diminuíram significativamente o número de macrófagos infectados, vide Figura 49.

Figura 48. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, em função das concentrações dos compostos testados, após o período de incubação de 24 h, a 37°C.

Figura 49. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, em função das concentrações dos compostos testados, após o período de incubação de 48 h, a 37°C.

É possível observar que a quantidade de macrófagos infectados é praticamente a mesma após períodos de incubação de 24 e 48 h.

A avaliação da inibição da quantidade de macrófagos infectados, pelos compostos de Cu^{2+} mostra que os compostos de cobre precisam de concentrações semelhantes para causar uma diminuição na quantidade de macrófagos infectados de mesma ordem de grandeza, em 24 h, tal qual pode ser observado na Figura 50. Transcorrido o período de 48 h, notamos que nas concentrações mais baixas, os resultados obtidos foram próximos ao do controle, porém nas concentrações mais altas eles diminuíram significativamente a quantidade de macrófagos infectados, vide Figura 50.

Figura 50. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, utilizando compostos de Cu^{2+} . Incubação por 24 ou 48h, a 37°C.

Utilizando os compostos de Zn^{2+} para verificar a diminuição na quantidade de macrófagos infectados, observamos que em 24h os compostos $[\text{Zn}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ nestas concentrações, apresentaram atividades tripanocidas semelhantes. Em contrapartida, em 48 h, o composto $[\text{Zn}(\text{isapn})]^{2+}$ apresentou valores semelhantes ao controle, mostrando que sua atividade diminui ao passar do tempo e o composto $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ na concentração 154,8µM apresentou uma porcentagem de macrófagos infectados semelhante ao resultado obtido em 24 h, vide Figura 51.

Figura 51. Análise da quantidade de macrófagos infectados pelo total de macrófagos, utilizando compostos de Zn²⁺. Incubação por 24 ou 48h, a 37°C.

Estes estudos mostraram que os compostos de cobre(II) e zinco(II) apresentaram eficácia equiparável, quando relacionados a porcentagem de macrófagos infectados, pois ambos apresentaram efeitos inibitórios semelhantes.

Os compostos de cobre e zinco mostraram reatividades equiparáveis nos estudos frente a forma amastigota de *T. cruzi*. No entanto, os compostos de cobre utilizam concentrações menores que os de zinco para causar os mesmos efeitos. O mesmo havia sido observado nos estudos frente à forma tripomastigota, que serviram como base no cálculo do índice de seletividade e conseqüente determinação das concentrações a serem utilizadas nos ensaios frente a forma amastigota.

C) Determinação dos índices de infecção

Os resultados dos estudos com as formas amastigotas de *T. cruzi*, foram também expressos como índice de infecção. O índice de infecção é o produto da porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de amastigotas por macrófago,¹²² e foi calculado conforme o descrito abaixo.

$$\text{Índice de Infecção} = \frac{\% \text{ macrófagos infectados}}{\text{índice de infecção}} \times \text{número médio de amastigotas por macrófago}$$

Os índices de infecção obtidos mostram que o crescimento das formas amastigotas do parasita dentro dos macrófagos infectados foi menor que o obtido no controle.

Os índices de infecção nas maiores concentrações testadas de cada complexo mantiveram-se praticamente os mesmos em 24 e 48h, no entanto quando comparadas a droga atualmente utilizada no tratamento da doença de Chagas nossos compostos não foram tão eficazes, mas isto não significa que os complexos estudados não sejam promissores no tratamento da doença de Chagas, pois é possível observar uma diminuição significativa nos índices de infecção obtidos para os complexos estudados quando comparados ao controle.

Figura 52. Índices de Infecção calculados após o período de 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos, a 37°C.

Após o período de 48h, foi possível observar que houve aumento nos índices de infecção, ou seja, aumentaram o número de parasitas nos macrófagos infectados, no entanto, nas maiores concentrações testadas para os complexos ocorreu a diminuição na infecção. Esta análise nos permite concluir que ao aumentar o período de incubação, há também o aumento na eficácia dos compostos testados, tendo em

vista que na ausência dos compostos há aumento na infecção o que não ocorre na presença destes. Nas maiores concentrações testadas, com exceção para o $[\text{Zn(isapn)}]^+$ a 120,9 μM , onde esta concentração foi tóxica tanto aos macrófagos quanto aos parasitas, os compostos foram mais eficientes, pois o índice de infecção é consideravelmente menor nestas concentrações quando comparados ao controle.

Figura 53. Índices de Infecção calculados após o período de 48h de incubação com diferentes concentrações dos compostos, a 37°C.

Conforme observado em outras análises realizadas, o benzonidazol é o composto mais eficaz no tratamento da Doença de Chagas, mas isto não exclui os compostos sintetizados como promissores. Os compostos testados diminuíram os índices de infecção em relação ao controle, sendo assim, na presença dos compostos sempre houve diminuição no número de amastigotas de *T. cruzi* nos macrófagos infectados, ou seja, diminui o número de parasitas.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram sintetizados complexos de cobre(II) e seus análogos de zinco(II), com ligantes base de Schiff derivados do oxindol isatina, sendo estes: $[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$, $[Cu(isapn)](ClO_4)_2$, $[Zn(isapn)]ClO_4$ e $[Zn(isaepy)Cl_2]$. Estes complexos foram caracterizados por análise elementar e técnicas espectroscópicas, como Infravermelho, EPR, RMN e CD. Através da utilização das técnicas de caracterização, foi possível verificar a existência de equilíbrio ceto-enólico em soluções dos complexos metálicos estudados.

Foram realizados ensaios de estabilidade termodinâmica dos complexos através de dicroísmo circular, utilizando-se albumina como ligante competitivo. Nestes ensaios observou-se que a estabilidade relativa dos complexos apresenta-se na mesma ordem de grandeza que o íon cobre(II) ou zinco(II) inseridos em sítios específicos da albumina, formando as correspondentes espécies $[M(HSA)]$. A constante de estabilidade obtida, em cada caso, permite-nos concluir que os ligantes sintetizados competem com a HSA pelos íons metálicos, e também que os complexos são relativamente estáveis no meio biológico.

Tabela 12. Comparação dos valores das constantes de estabilidade relativas, determinadas para os compostos, com valores de literatura para a inserção do íon metálico na HSA.

Complexo	$\log K_{[ML]}$ $\pm 1,0$
$[Zn(isaepy)Cl_2]$	7,5
$[Zn(isapn)](ClO_4)$	7,2
$[Zn(HSA)]$	7,1*
$[Cu(isaepy)_2](ClO_4)_2$	11,3
$[Cu(isapn)](ClO_4)_2$	13,0
$[Cu(HSA)]$	12,0**

* Ref. Emiko Ohyoshi, et al.-*J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 75, 213–218.

** Ref. M. Ro'zga, et al.-*J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, 12, 913–918.

Além disso, através do dicroísmo circular foi possível verificar se os compostos são capazes de modificar a estrutura secundária da proteína, mudando sua porcentagem de estruturas de α -hélice. Nos ensaios realizados foi possível verificar que os compostos de zinco(II) e o $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ foram os

compostos que causaram maior perturbação na estrutura secundária da proteína, e estas modificações são mais evidentes a partir da proporção 1:1 [CuL]:[HSA].

Estudos de determinação da temperatura de fusão (*melting point*) do DNA, de dicroísmo circular e fluorescência foram realizados para determinação das possíveis interações dos complexos ao DNA. Os estudos de fluorescência foram realizados monitorando-se a substituição do brometo de etídeo (EB) ligado no DNA. Nestes estudos foram detectadas apenas pequenas alterações na intensidade de fluorescência, indicando uma interação não muito substancial entre os complexos e a dupla hélice. Da mesma forma, a técnica de dicroísmo circular detectou apenas pequenas mudanças de conformação na cadeia de DNA em decorrência das interações DNA-droga. As medidas da temperatura de fusão (*melting point*) do DNA apresentaram pequenas variações ao variar as razões de ligação entre os complexos e o DNA. Estes estudos permitem-nos concluir que os compostos devem estar interagindo com o DNA provavelmente através das fendas ou alças, mantendo interações por ligações de hidrogênio com as bases, uma vez que são complexos com ligantes grandes, volumosos e que apresentam estrutura tetragonal com alguma distorção tetraédrica.

Como objetivo principal deste trabalho, foram realizados ensaios para investigar se os complexos sintetizados teriam algum efeito sobre infecções parasitárias, mais especificamente frente ao *Trypanosoma cruzi*. Assim, foram realizados testes de viabilidade celular, frente aos macrófagos, utilizando-se várias concentrações dos complexos estudados. Verificou-se então as concentrações que causam a morte de 50% dos macrófagos (LC₅₀). Os resultados aqui obtidos mostraram que os compostos de cobre(II) apresentaram maior toxicidade frente aos macrófagos que os compostos análogos de zinco(II). Foram realizados também ensaios para verificar a toxicidade dos compostos frente a forma tripomastigota do *T. cruzi*, onde foram obtidas as concentrações que inibem 50% dos tripomastigotas. Aqui também os resultados seguiram a mesma tendência que o obtido para os macrófagos, onde os compostos de cobre(II), mais uma vez se mostraram mais tóxicos que os de zinco(II).

A determinação da toxicidade frente aos macrófagos e a forma tripomastigota de *T. cruzi*, são de suma importância para a determinação do índice de seletividade (IS), que mede o quanto um composto é ativo contra o parasito sem causar danos aos macrófagos, responsáveis no hospedeiro pelo combate ao parasita. Para nós este parâmetro também foi muito útil para a determinação das concentrações a serem utilizadas nos ensaios frente à forma amastigota de *T. cruzi*. Este parâmetro serviu ainda para compararmos nossos compostos com outros exemplos na literatura de complexos metálicos com atividade tripanocida.

Tabela13. Valores dos índices de seletividade (IS) para os compostos testados, em comparação com benzonidazol, após diferentes tempos de incubação a 37°C.

Índice de seletividade			
	24 h	48 h	Outros períodos
$[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$	4,8	11,6	
$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$	3,7	5,4	
$[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$	5,6	12,4	
$[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$	2,0	3,2	
Benzonidazol	2,7 ^α		0,8 ^β (72h)
$[\text{Cu}(\text{dmt})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ^β			16,5 (72 h)
$[\text{Zn}(\text{dmt})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ^β			3,8 (72h)
$[\text{Cu}(\text{4NO}_2\text{Ac4M})_2]$ ^γ			2 (5 dias)
$[\text{Cu}(\text{4NO}_2\text{AcDM})_2]$ ^γ			893 (5 dias)
$[\text{VO}(\text{mpo-H})_2]$ ^δ			61,14
$[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{isn})](\text{BF}_4)_3$ ^ε			10
$[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{imN})](\text{BF}_4)_3$ ^ε			12

^α Ref. Ciccarelli, et.al. - *Antimicrob. Agents Chemother*, **2012**, 56(10), 5315-5320.

^β Ref. A.B. Caballero, et.al.- *Eur.J. Med. Chem.*, **2014**, 85, 526-534.

^γ Ref. A. Pérez-Rebolledo, et. al.-*Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 939-948.

^δ Ref. D. Gambino- *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, 255, 2193-2203.

^εRef. D. Gambino, L. Otero-Inorg. Chim. Acta, **2012**, 393, 103-114.

Os índices de seletividade presentes na literatura utilizam principalmente a forma epimastigota ao invés da tripomastigota, mas independente disso, em ambos os casos o IS mostra o quão eficaz a droga é frente ao parasita sem causar danos às células do hospedeiro. Uma análise direta dos índices de seletividade obtidos, em relação aos encontrados na literatura, mostram que nossos compostos possuem IS equiparáveis aos de muitos complexos metálicos, e também é possível notar que os tipos dos ligantes e os metais utilizados podem ocasionar diferentes atividades, sendo assim uma característica intrínseca de cada composto.

Os resultados deste estudo com *T. cruzi* mostraram que os compostos metálicos mostraram-se bastante promissores no tratamento da doença de Chagas, frente às formas tripomastigotas e amastigotas do parasita. Todos os complexos apresentaram índices de seletividade próximos ou maiores que o do benzonidazol, indicando que têm potencial para serem explorados como drogas alternativas.

Analisando apenas os índices de seletividade (IS), os compostos com ligantes *isapn* seriam mais promissores, por apresentarem maiores IS, porém isto não excluiria os compostos com ligantes *isaepy*, fato que foi confirmado após os testes frente às formas amastigotas. Através desta observação, podemos concluir que apenas o índice de seletividade (IS) não demonstra a real eficácia do composto no tratamento da doença de Chagas. Para verificar qual o composto mais ativo, devemos testar os compostos também frente à forma amastigota, conforme foi feito em nossos estudos.

Os compostos mais promissores são os compostos de cobre, pois estes precisaram de concentrações mais baixas para causar inibição da proliferação da forma amastigota de *T. cruzi*. Isto pode ser devido à atividade redox dos íons de cobre, não apresentada pelos íons de zinco, que levam à geração de EROs e consequente degradação ou oxidação de biomoléculas vitais para o parasita. Entretanto, $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$ apresentou IS da mesma ordem que o correspondente complexo de cobre, indicando que este não é o único fator determinante da atividade tripanocida.

Analisando os valores de IS, observamos que os complexos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isaepy})]^+$ apresentaram valores de IS menores que os análogos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ e $[\text{Zn}(\text{isapn})]^+$. Esta diferença pode ser devida à estrutura mais tetragonal, com menor distorção tetraédrica no caso dos compostos contendo ligante *isapn*.

Em estudos paralelos, verificamos que esses mesmos complexos estudados foram eficientes na inibição da proteína topoisomerase IB.⁷² Também neste caso os compostos contendo o ligante *isapn* foram mais ativos que os de *isaepy*. Através de simulações de reconhecimento molecular (docking), verificou-se que esses complexos podem se inserir no sítio ativo da proteína, com coordenação direta do íon metálico central com os aminoácidos (Glu492, Asp563). Esta é uma outra indicação sobre modos de ação destes complexos no meio biológico e poderia também explicar a ordem de reatividade destes complexos frente ao *T. cruzi*. Assim, além de serem capazes de se ligar ao DNA, causando danos oxidativos através de EROs, esses compostos podem também inibir proteínas específicas, como as topoisomerasas.

Baseado nos estudos aqui relatados, um pedido de patente foi depositado, através da Agência USP Inovação (depósito no INPI, **BR 10 2013 026558-6**, em 15/outubro/2013).

De acordo com os resultados aqui obtidos, uma avaliação mais detalhada da atividade terapêutica, usando camundongos, principal modelo para os estudos *in vivo*, com alguns compostos, sobretudo os complexos de cobre, deveria ser explorada futuramente.

Referências bibliográficas

1. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev. Saúde Pública*, 2010, **44**(1), 200-202.
2. C. M. Morel, *Cad. Saúde Pública*, 2006, **22**(8), 1522-1523.
3. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de inovação em Doenças Negligenciadas, <www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/doencasNegligenciadas.php> acesso em: 15/02/2014.
4. J. L. S. Sobrinho, D. A. F. Fontes, M. A. M. de Lyra, M. F. L. R. Soares, P. J. R. Neto, *Rev. Bras. Farm.*, 2009, **90**(4), 283-289.
5. DnDi América Latina- Drugs for neglected Diseases Initiative, <<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>> acesso em: 16/03/2014.
6. L. C. Dias, M. A. Dessoay, *Química Nova*, 2009, **32**(9), 2444-2456.
7. F. Pontes, *Rev Inovação em pauta*, 2009, **6**, 69-73.
8. J. Clayton, *Nature*, 2010, **465**, S4-S5.
9. A. V. N. Cardoso, S. A. Z. Lescano, V. A. Neto, E. Gakiya, S. V. Santos, *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 2006, **48**(5), 287-289.
10. K. M. Tyler, D. M. Engman, *Int. J. for Parasitology*, 2001, **31**, 472-481.
11. S. S. da R. Pita, P. G. Pascutti, *Rev. Virtual Quim.*, 2011, **3**(4), 307-324.
12. A. H. Kollien, G. A. Schaub, *Parasitology Today*, 2000, **16**(9), 381-387.
13. L. O. Andrade, N. W. Andrews, *Nature Reviews Microbiology*, 2005, **3**, 819-823.
14. E. R. Parker, A. Sethi, *Dermatol. Clin.*, 2011, **29**, 53-62.
15. World Health Organization, <www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en> acesso em: 10/02/2014.
16. P. M. M. Guedes, J. L. R. Fietto, M. Lana, M. T. Bahia, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2006, **5**, 175-186.
17. A. Rassi Jr., A. Rassi, J. A. Marin-Neto, *The Lancet.*, 2010, **375**, 1388-1402.
18. M. A. Ilies, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 296-297.
19. Associação Médica de Brasília <www.ambr.org.br> acesso em: 10/07/2014.
20. J. C. P. Dias, J. R. Coura, M. A. S. Yasuda, *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 2014, **47**(1), 123-125.
21. G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faundez, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 4885-4893.

- 22.J. J. N. Silva, P. M. M. Guedes, A. Zottis, T. L. Balliano, F. O. N. da Silva, L. G. F. Lopes, J. Ellena, G. Oliva, J. S. Silva, A. D. Andricopulo, D. W. Franco, *Br. J. Pharmacol.* 2010, **160**, 260-269;
- 23.W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons Ltd, Cap. 10, 187-214.
- 24.D. Mafrá, S. M. F. Cozzolino, *Rev. Nutr.*, 2004, **17**(1), 79-87.
- 25.K. A. McCall, C. Huang, C. A. Fierke., *J. Nutr.*, 2000, **130**, 1437S-1446S.
26. M. L. Zastrow, V. L. Pecoraro, *Biochemistry*, 2014, **53**, 957-978.
27. E.T. Adman, *Advances in Protein Chemistry*, 1991, **42**, 145-197.
28. R. Lontie, *ed., Copper Proteins and Copper Enzymes*, 1984, **1-3**.
- 29.a) R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*, 2008, **14**; b) T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta and T. V. O'Halloran, *Science*, 1999, **284**, 805–808.
- 30.R. Uauy, M. Olivares, M. Gonzalez, *Am. J. Clin. Nut.*, 1998, **67**, 952S-959S.
- 31.W. Kaim, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2003, 761-768. The Chemistry and Biochemistry of the Copper Radical Interaction.
- 32.R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2239-2314.
- 33.G. Rotilio, M. T. Carri, L. Rossi, M. R. Ciriolo, *IUBMB Life*, 2000, **50**, 309-314.
- 34.M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky, *Chem. Biol. Interact.*, 2005, **151**, 71-82.
- 35.a) C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anti-Cancer Ag. Med. Chem.*, 2009, **9**, 185-211; b) S. Tardito, L. Marchiò, *Curr. Med. Chem.*, 2009, **16**, 1325-1348 c) C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* 2014, **114**, 815-862.
- 36.P. A. Vigato, S. Tamburim, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 1717.
- 37.D. A. Atwood, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **165**, 267.
- 38.M. L. P. Santos, I. A. Bagatin, E. M. Pereira, A. M. D. C. Ferreira, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2001, **6**, 838-844.
- 39.A. M. D. C. Ferreira, M. A. A. Azzellini, and M. L. P. Santos, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **86**, 218.
- 40.A. Cane, M. C. Tournaire, D. Barriatault, M. Crumeyrolle-Arias, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2000, **276**, 379-84.
- 41.M. Verma, S. N. Pandeya, K. N. Singh, J. P. Stables, *Acta Pharm.*, 2004, **54**, 49.
- 42.S. K. Sridhar, S. N. Pandeya, J. P. Stables, A. Ramesh, *Eur. J. Pharmacol. Sci.*, 2002, **16**, 129-132.
43. A. E. Medvedev, A. Clow, M. Sandler, V. Glover, *Biochem. Pharmacol.*, 1996, **52**, 385.
- 44.V. Glover, A. Mendvedec, M. Sandler, *Life Sci.*, 1995, **57**, 2073-9.

45. A. M. A. Hassaan, *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 1997, **27**, 835-42.
46. A. Baeyer, *Ber.*, 1883, **16**, 2188 e 1882, **15**, 2093.
47. J. Bergman, J. Lindström, U. Tilstam, *Tetrahedr.*, 1985, **41**, 2879-81.
48. G. J. Kapadia, Y. N. Shukla, S. P. Basak, E. A. Sokoloski, H. M. Fales, *Tetrahedr.*, 1980, **36**, 2441-47.
49. M. d'Ischia, A. Palumbo, G. Prota, *Tetrahedr.*, 1988, **44**, 6441.
50. G. A. Bain, D. X. West, J. Krejci, J. Valdés-s-Martinez, S. Hernández-Ortega, R. A. Toscano, *Polyhedron*, 1997, **16**, 855.
51. N. T. Akinchan, R. Akinchan, D. X. West, Y. H. Yang, *Transition Met. Chem.*, 2004, **19**, 135.
52. V. C. da Silveira, G. F. Caramori, M. P. Abbott, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 1331-1341.
53. G. Filomeni, S. Piccirillo, I. Graziani, S. Cardaci, A. M. D. C. Ferreira, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, *Carcinogenesis*, 2009, **30**, 1115-1124.
54. V. C. da Silveira, J. S. Luz, C. C. Oliveira, I. Graziani, M. R. Ciriolo, A. M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1090-1103.
55. G. Filomeni, G. Cerchiaro, A. M. D. C. Ferreira, A. de Martino, J. Z. Pedersen, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 12010-12021.
56. G. Cerchiaro e A. M. da Costa Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* 2006, **17**, 1473-1485.
57. A. M. C. Benite, S. P. Machado, E. J. Barreiro, *Química Nova*, 2007, **30**(8), 2062-2067.
58. S. J. Berners-Price, P. Sadler, *J. Coord. Chem. Ver.*, 1996, **151**, 1-40.
59. R. Bakhtiar, E. I. Ochial, *Gen. Pharmacol.*, 1999, **32**, 525-540.
60. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Platinum Metals Rev.*, 2001, **45**, 62-69.
61. S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, 1991, **43**, 109.
62. G. Stochel, A. Wanat, E. Kulis, Z. Stasicka, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **171**, 203-220.
63. G. Cerchiaro, K. Aquilano G. Filomeni, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, A. M. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1433-1440.
64. G. Mendoza-Diaz, R. Perez-Alonso, R. Moreno-Esparza, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **64**, 207-14.
65. K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, Q. P. Dou, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**, 1139-1151.
66. L. J. Ming, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 697-762.
67. J. F. M. Silva, S. J. Garden, A. C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2001, **12**, 273-324.
68. I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis, *Molecular Biology International*, 2011, **2011**, 1-13.
69. M. Navarro, C. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, *Drug Discovery Today*, 2010, **15**, 1070-1078.

- 70.G. Cerchiaro, G.A. Micke, M.F.M. Tavares, A.M.D.C. Ferreira, *J. Mol. Cat. A Chem*, 2004, **221**, 29-39.
- 71.G. Cerchiaro, P. L. Saboya, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, A. M. D. C. Ferreira, *Transition Met. Chem.*, 2004, **29**, 495-504.
- 72.P. Katkar, A. Coletta, S. Castelli, G. L. Sabino, R. A. Alves Couto, A. M. da Costa Ferreira, A. Desideri, *Metallomics*, 2014,**6**, **117 – 125**.
- 73.P.G. Cozzi, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 410-421.
- 74.G. Cerchiaro, *Reatividade e Implicações em Processos Biológicos de Complexos Imínicos de Cobre(II)*. Tese de Doutorado, abril/2005, Instituto de Química, USP, SP, Brasil.
- 75.M. P. Abbott, *Modificações oxidativas em proteínas em presença de complexos de cobre(II)*. Tese de Doutorado, setembro/2007, Instituto de Química, USP, SP, Brasil.
- 76.U. Sakaguchi, A. W. Addison, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 1979, 600-608.
- 77.R. W. Woody, *Methods Enzymol.*, 1995, 246, 34-71.
- 78.W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1830**, 5444-5455.
- 79.W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70**, 33-39.
- 80.<<http://www.ogic.ca/projects/k2d3/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2012.
- 81.J. L. Butour, J. P. Macquet, *Eur. J. Biochem.*, 1977, **78**, 455-463.
- 82.V. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev. *Biopolymers*, 1973, **12**, 89.
- 83.N.W. Andrews, W. Colli, *J. Protozool*, 1982, **29**(2), 264-269.
- 84.M. Erich, L. Sharova, *Current Protocols in Toxicology*, 2000, 2.6.
- 85.T. Mosmann, *J. Immun. Methods*, 1983, **65**, 55-63.
- 86.C.B. Ponte, *Avaliação do efeito da miltefosina sobre a viabilidade e as funções de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6*. Dissertação de Mestrado, abril/2011, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB, DF, Brasil.
- 87.R.M. Silverstein, G.C. Basseler, T.C. Morril, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7ª Edição, Ed. LTC, Rio de Janeiro, 2007.
- 88.F. E. Mabbs, *Chem. Soc Rev.*, 1993, **22**, 313-324.
- 89.D. F. Shriver, P.W. Atkins, *Química Inorgânica*, (2003), Bookman, 816p.
- 90.P. F. Knowles, D. Marsh, H. W. E. Rattle, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley & Sons (1976) 343.
- 91.S. Castelli, P. Katkar, G. L. Sabino, R. A. Alves Couto, S. Vieira, A. Desideri, M.B. Gonçalves, R.R. Nascimento, H.M. Petrilli, A. M. da Costa Ferreira. Oxindolimine-metal complexes as inhibitors of human topoisomerase IB, **Manuscrito em elaboração**.

92. J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strachle, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11-19.
93. A. Rodger, B. Nórden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, Oxford, 1997.
94. M. Valko, H. Morris, M. Mazúr, J. Telser, E. J. L. McInnes, F. E. Mabbs, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 5591–5597.
95. M. Rozga, M. Sokolowska, A. M. Protas, W. Bal, *J Biol InorgChem*, 2007, **12**, 913–918.
96. E. Ohyoshi, Y. Hamada, K. Nakata, S. Kohata, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **75**, 213–218.
97. Jin Lu, A. J. Stewart, D. Sleep, P. J. Sadler, T. J. T. Pinheiro, C. A. Blindauer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 1454–1457.
98. C. A. Blindauer, I. Harvey, K. E. Bunyan, A. J. Stewart, D. Sleep, D. J. Harrison, S. Berezenko, P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 23116-24.
99. M. A. A. Azzelini, M. P. Abbott, A. Machado, M. T. M. Miranda, L. C. Garcia, G. F. Caramori, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, A. M. C. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2010, **21**(7), 1303-1317.
100. N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry*, 1969, **8**, 4108.
101. Y. Kumar, S. Tayyab, S. Muzammil, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, **426**, 3-10.
102. C. V. Kumar, H. Emma, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 470.
103. M. J. Waring, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 269.
104. E. Nyarko, N. Hanada, A. Habib, M. Tabata, *Inorg. Chim. Acta.*, 2004, **357**, 739-745.
105. V. C. Silveira, H. Benezra, J. S. Luz, R. C. Georg, C. C. Oliveira, A. M. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 1692-1703.
106. J. G. Collins, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**(22), 9840-46.
107. L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, M. J. Burkitt, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, **304**, 102-9.
108. B. Macías, M. V. Villa, B. Gómez, J. Borrás, G. Alzuet, M. González-Alvarez, A. Castiñeiras, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 444-51.
109. L- M. Chen, J. Liu, J-C. Chen, S. Shi, C- P. Tan, K-C. Zheng, L-N. Ji, *J. Mol. Struct.*, 2008, **881**, 156-166.
110. G. Khandelwal, J. Bhyravabhotla, *PloSOne* 2010, **5** (8), 1-9.
111. Y. Qun, A. Harris, A. Hegmans, A. Petz, P. Kabolizadeh, H. Penazova, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1591-1598.
112. H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, **4**, 31-39.
113. M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A. I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J. S. Gancheff, J. D. Maya, C. O. Azar, D. Gambino, L. Otero, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, **2014**, 4677–4689.

114. L. R. Gouvea, D. A. Martins, D. G. J. Batista, M. N. C. Soeiro, S. R. W. Louro, P. J. S. Barbeira, L. R. Teixeira, *Biomaterials*, 2013, **26**, 813–825.
115. B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. D. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, *Biol Trace Elem Res*, 2013, **153**, 371–381.
116. A. B. Caballero, A. Rodríguez-Diéguez, M. Quirós, J. M. Salas, O. Huertas, I. Ramírez-Macías, F. Olmo, C. Marín, G. Chaves-Lemaur, R. Gutierrez-Sánchez, M. Sánchez-Moreno, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **85**, 526-534.
117. A. Pérez-Rebolledo, L. R. Teixeira, A. A. Batista, A. S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, P. Hernández, A. M. Ferreira, N. L. Speziali, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 939 - 948.
118. J. J. N. Silva, W. R. Pavanelli, J. C. M. Pereira, J. S. Silva, D. W. Franco, *Antimicrob. Agents Chemother*, 2009, **53**, 4414–4421.
119. D. Gambino. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, **255**, 2193– 2203.
120. C. L. Donnici, M. H. Araújo, H. S. Oliveira, D. R. M. Moreira, V. R. A. Pereira, M. A. Souza, M. C. A. B. de Castro, A. C. L. Leite, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 5038–5043.
121. A. B. Ciccarelli, F. M. Frank, V. Puente, E. L. Malchiodi, A. Batle, M. E. Lombardo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, **56**(10), 5315-5320.
122. P. H. N. Aguiar, C. Furtado, B. M. Repolês, G. A. Ribeiro, I. C. Mendes, E. F. Peloso, F. R. Gadelha, A. M. Macedo, G. R. Franco, S. D. J. Pena, S. M. R. Teixeira, L. Q. Vieira, A. A. Guarneri, L. O. Andrade, C. R. Machado, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2013, **7**, 1 – 13.

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Gustavo Levendoski Sabino

Nascido em 13 de junho de 1988, em Guarulhos, São Paulo, Brasil.

E-mail: gustavolevendoski@usp.br

FORMAÇÃO

- Pós-Graduação no Instituto de Química da USP, Programa de Química – Bolsista CNPq, 2011-2013.
- Pós-Graduação Lato Sensu em Química – Faculdades Oswaldo Cruz – Concluído em Abril de 2012.
- Bacharelado e Licenciatura em Química – UnG (Universidade Guarulhos) – Concluído em dezembro de 2009.

HISTÓRICO PROFISSIONAL

- INTERTOX (atual) - Cargo: Analista de segurança química e risco toxicológico.
- ALS-Corplab (Jun/13 à Set/13) - Cargo: Analista de Laboratório de Química Orgânica.
- Bolsista de Mestrado CNPq, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Mar/11 à Abr/13), Projeto de Mestrado sob orientação da Prof. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira. Tema: “Investigação da Reatividade de Complexos Metálicos com Ligantes Bases de Schiff Frente a Infecções Parasitárias”.
- Colégio Mater Amabilis (Jan/2010 até presente data) - Cargo: Professor Voluntário de Química no Cursinho Pré-Vestibular do Serviço de Ordem Social (SOS) Mater Amabilis
- Colégio Mater Amabilis (Ago/2009 à Mar/2011) - Cargo: Técnico de Laboratório de Química e Professor Substituto.
- Bolsista de Iniciação Científica PIBIC-UnG (Jul/2007 à Dez/2007), Projeto de Iniciação Científica sob orientação da Prof. Dra. Isabel Danidtzá Suárez Castillo. Tema: “Implementação de Rotinas Analíticas para Monitoramento de Ensaios de Fermentação Alcoólica”.

RESULTADOS DE PESQUISA MAIS RELEVANTES

- KATKAR, P. ; COLETTA, A. ; CASTELLI, S. ; SABINO, G. L. ; COUTO, R. A. A. ; DA COSTA FERREIRA, ANA M. ; DESIDERI, A. . Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity. Metallomics, v. 6, p. 117-125, 2014.
- DA COSTA FERREIRA, ANA M. ; SOUZA, M. A. ; SABINO, G. L. ; COUTO, R. A. A. ; PAULA, Q. A. ; VIEIRA, L. Q. ; RIBEIRO, G. A. . COMPLEXOS METÁLICOS COM LIGANTES INDÓLICOS OU OXINDÓLICOS E SEUS DERIVADOS IMÍNICOS E SEU USO COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS. 2013, Brasil.
Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR018130040120, data de depósito: 15/10/2013, título: "COMPLEXOS METÁLICOS COM LIGANTES INDÓLICOS OU OXINDÓLICOS E SEUS DERIVADOS

IMÍNICOS E SEU USO COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): FAPESP, CNPq.

OUTRAS INFORMAÇÕES

- 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 25 a 28 de maio de 2013. (Congresso). Sabino , G. L. (USP); Couto , R. A. (USP); Ribeiro , G. A. (UFMG); Vieira , L. Q. (UFMG); Ferreira, A. M. C. (USP), Investigação da reatividade de complexos metálicos com ligantes bases de Schiff frente a infecções parasitárias.

- 12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, Punta del Este, Uruguay, 11-13 de Março de 2013. (Simpósio). Ferreira, A. M. C. ; de Paula, Q. A. ; Sabino, G. L. ; Dario, B. S. ; Ribeiro, G. A. ; Vieira, L. Q., Metal complexes based on oxindolimine ligands: antitumor and antiparasite activities.

- XVI Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry/ III Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, Florianópolis, SC, Agosto de 2012. (Congresso). Sabino, G. L. ; de Paula, Q. A. ; Couto, R. A. ; Pietro, M. B. ; Oliveira, C. C. ; Colepicolo ; Indig, G. ; Ferreira, A. M. C., Thermodynamic stability, DNA interactions and cytotoxicity of new copper(II) and zinc(II) oxindolimine complexes.

- II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 2011. (Simpósio).

- USP Conferences on Nanotechnology. 2011. (Encontro).

- 28ª Semana da Química, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) - "Ano Internacional da Química: celebrando as conquistas da Química para a Humanidade". 2011. (Outra).