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

ANDERSON ARNDT

Novos derivados da iminodibenzila
para ação anti-leishmânia

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/09/2016

ANDERSON ARNDT

Novos derivados da iminodibenzila
para ação anti-leishmânia

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Programa: Química.

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo
2016

Agradecimentos

À todos os colegas que de uma forma ou de outra estiveram presentes e contribuíram no período deste trabalho.

Ao professor do IQ-USP Alcindo Aparecido dos Santos e seu aluno de pós-graduação George Sakae pelo auxílio nas primeiras etapas de síntese orgânica.

À professora do IQ-USP Maria Teresa Machini e ao técnico Dr. Cleber Wanderlei Liria pelo auxílio nas etapas de separação e caracterização cromatográfica.

À professora do ICB-USP Sílvia Reni Bortolin Uliana e à técnica MSc. Jenicer Kazumi Umada Yokoyama Yasunaka pelo auxílio na etapa de teste da atividade biológica.

Ao professor, orientador e amigo Breno Pannia Espósito, por toda sua imensa paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio na aquisição de bens e reagentes ao laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/USP.

.

.

.

.

.

“[O profissional de química] Deve aprofundar seus conhecimentos científicos na especialidade, admitindo, estudando e buscando desenvolver novas técnicas, sempre preparado para reformular conceitos estabelecidos, já que química é transformação.”

Resolução Ordinária n.º 927, de 11/11/1970 – Código de Ética dos Profissionais da Química.

Resumo

Arndt, A. **Novos derivados da iminodibenzila para ação anti-leishmânia**. 2016. 99p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A leishmaniose é uma infecção causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de insetos. Os tratamentos atuais são caros e demorados, envolvendo compostos baseados em Sb(V), anfotericina B lipídica e miltefosina. Estudos recentes sugerem que a enzima tripanotiona redutase (TR) poderia ser um alvo específico no desenvolvimento de novos fármacos, pois ela é essencial e exclusiva dos tripanossomatídeos. Desta forma, este trabalho apresenta a síntese de novos compostos derivados da iminodibenzila com estrutura similar à clomipramina, um conhecido inibidor da TR. Tais compostos são conjugados de iminodibenzila com etilenodiamina, etanolamina e dietilenotriamina através de epiclorigrina (**dado-en**, **dado-ea** e **dado-dien**, respectivamente). Foram obtidos com rendimentos superiores a 94% e caracterizados através de LC-MS e espectroscopia no infravermelho. Também se fez a avaliação da afinidade relativa dos novos ligantes por cobre através do teste de recuperação da fluorescência da calceína, concluindo-se que o ligante **dado-dien** possui uma afinidade maior com Cu(II) quando comparado com os outros ligantes sintetizados. Foram formados complexos metálicos através da adição de sulfato de cobre(II), acompanhando-se através de espectroscopia ultravioleta-visível para se obter uma estimativa da relação metal:ligante, concluindo-se que os complexos formados eram $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$. A lipofilicidade foi estimada através de simulação computacional, constatando-se que os complexos formados são todos muito lipofílicos, sendo que o logP decresce na seguinte sequência: $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$. Ensaios de atividade pró-oxidante através da oxidação da sonda fluorimétrica DHR revelaram que o complexo $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$ apresentou a maior taxa de atividade pró-oxidante, sendo independente da concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional e alcançando seu limiar quando

presente em concentração aproximada de 10 μM . Por fim, os compostos sintetizados foram testados quanto à suas citotoxicidades frente a promastigotas *L. amazonensis* e com macrófagos RAW 264,7. Quando o protozoário foi exposto a concentrações variadas dos compostos deste estudo, observou-se que os ligantes ea, en e dien tiveram os menores valores de IC50 (todos < 3 μM), porém eles são muito tóxicos para serem utilizados como fármacos. Dentre os ligantes sintetizados, somente o **dado-en** apresentou um resultado numa faixa viável (IC50 $19,9 \pm 2,2 \mu\text{M}$). Contra macrófagos RAW 264,7, **dado-en** apresentou IC50 > 50 μM , ou seja, ele é mais tóxico para o protozoário do que para os macrófagos. A complexação com cobre não representou um aumento interessante na citotoxicidade dos compostos. O conjunto de resultados apresentados neste estudo indica um potencial uso do composto **dado-en** no combate à leishmaniose.

Palavras-chave: iminodibenzila, tripanotiona redutase, leishmaniose, cobre

Abstract

Arndt, A. *New iminodibenzyl derivatives with anti-leishmanial activity*. 2016. 99p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Leishmaniasis is an infection caused by protozoa of the genus *Leishmania*. and transmitted by insects. Current treatments are expensive and time-consuming, involving Sb(V)-based compounds, liposomal amphotericin B and miltefosine. Recent studies suggest that inhibition of trypanothione reductase (TR) could be a specific target in the development of new drugs, because it is essential and exclusive to trypanosomes. Thus, this work presents the synthesis of new compounds derived from iminodibenzyl with structures related to clomipramine, a known inhibitor of TR. These compounds were conjugates of iminodibenzyl with ethylenediamine, ethanolamine and diethylenetriamine, linked by epichlorohydrin. They were obtained with yields higher than 94% and their structures were confirmed by LC-MS and infrared spectroscopy. The relative affinity for copper of the new chelators was assessed by the recovery of calcein fluorescence, which showed that **dado-dien** has the highest affinity for Cu(II) among the new ligands. Metal complexes were synthesized by addition of copper(II) sulphate and studied by ultraviolet-visible spectroscopy, showing that the stoichiometries were $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ and $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$. Lipophilicity was assessed by computational methods, indicating that the complexes were all very lipophilic, with logP decreasing in the following order: $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$. Pro-oxidant activity assays by oxidation of DHR fluorimetric probe showed that $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$ has the highest rate of oxidation, independent of hydrogen peroxide concentration, reaching its highest value when at $\sim 10 \mu\text{M}$. Finally, the compounds were tested for cytotoxicity to *L. amazonensis* promastigotes and RAW 264,7 macrophages. When the protozoa was exposed to varying concentrations of the compounds, it was observed that chelators ea, en and dien had the lowest values of IC₅₀ ($< 3 \mu\text{M}$). but they are too cytotoxic to be used as drugs. Among the

synthesized chelators, only **dado-en** presented a result in a pharmaceutically interesting range ($IC_{50} 19.9 \pm 2.2 \mu M$). Against RAW 264,7 macrophages **dado-en** $IC_{50} > 50 \mu M$. Complexation to copper did not enhance the cytotoxicity of the compounds. Overall, the results in this study indicate a potential use of **dado-en** in combating leishmaniasis.

Keywords: iminodibenzyl, trypanothione reductase, leishmaniasis, copper

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> , adaptado de [CDC, 2015].....	17
Figura 2: Provável mecanismo de atuação dos medicamentos antimoniais pentavalentes (adaptado de [Yan, 2005]).....	18
Figura 3: Estruturas dos fármacos Pentostam, Glucantime, Anfotericina B e Miltefosina.....	20
Figura 4: Reação catalisada pela tripanotona redutase (TR).....	26
Figura 5: Estrutura da clomipramina.....	27
Figura 6: Rota proposta para a produção dos quelantes: (a) iminodibenzila, (b) intermediário dado , (c) estrutura geral dos quelantes.....	29
Figura 7: Representação da energia dos orbitais d em um campo cristalino octaédrico [Atkins, 2010].....	32
Figura 8: Estrutura da calceína.....	34
Figura 9: Princípio de funcionamento do método de detecção fluorimétrica de atividade redox. (a) A adição de um pró-oxidante (peróxido ou ascorbato) inicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) catalisada por Cu presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente. (b) Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de pró-oxidantes; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (<i>m</i>), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de pró-oxidante. (c) Em alguns casos específicos, a taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração do pró-oxidante, podendo ser usada, se assim se desejar, para quantificar a concentração do metal na amostra estudada [Espósito, 2011].....	36
Figura 10: Mecanismo da reação SN2 entre iminodibenzila e epicloridrina para a formação do intermediário (dado), utilizando butil-lítio como base forte.....	39
Figura 11: CCD da reação entre epicloridrina e iminodibenzila com n-BuLi. Placa de sílica, eluente hexano/acetato de etila (10:1).....	39
Figura 12: Espectro de RMN de ¹³ C do dado	41
Figura 13: Espectro de RMN de ¹ H do dado	42
Figura 14: Espectro infravermelho de iminodibenzila e dado	43
Figura 15: Espectro infravermelho de iminodibenzila e dado	43
Figura 16: CCD da reação entre intermediário (dado) e etanolamina (ea), revelado por luz ultravioleta. Eluentes (a) Hexano:Acetato de etila (8:1) e (b) Diclorometano:Metanol:Hidróxido de amônio (9:1:0,1).....	44
Figura 17: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de etanolamina; (c) 0,25 mg/mL de dado ; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de dado com etanolamina.....	46
Figura 18: (a) cromatograma do LC-MS para dado ; (b) espectro de massas de *.....	47
Figura 19: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre dado e etanolamina; (b) espectro de massas de *.....	48
Figura 20: Estrutura de dado-ea	49
Figura 21: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.....	50
Figura 22: Espectro infravermelho do intermediário dado e do ligante dado-ea	51
Figura 23: Espectro infravermelho do intermediário dado e do ligante dado-ea	51
Figura 24: CCD da reação entre dado e etilenodiamina, revelada por luz ultravioleta. Eluentes (a) hexano:acetato de etila (8:1) e (b) diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,1).....	52

Figura 25: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de etilenodiamina; (c) 0,25 mg/mL de dado ; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de dado com etilenodiamina.....	54
Figura 26: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre dado e etilenodiamina; (b) espectro de massas de *.	55
Figura 27: Estrutura de dado-en	56
Figura 28: Cópia do registro digitalizado do HPLC preparativo.....	57
Figura 29: Análise por HPLC de fase reversa das amostras recolhidas durante HPLC preparativo de dado-en : (a) erlenmeyer 1; (b) erlenmeyer 2; (c) erlenmeyer 3.....	58
Figura 30: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.	59
Figura 31: Espectro infravermelho do dado e do ligante dado-en	60
Figura 32: CCD da reação entre dado e dietilenotriamina. Eluentes (a) Hexano:Acetato de etila (8:1) e (b) Diclorometano:Metanol:Hidróxido de amônio (9:1:0,1).	61
Figura 33: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de dietilenotriamina; (c) 0,25 mg/mL de dado ; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de dado com dietilenotriamina.	62
Figura 34: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre dado e dietilenotriamina; (b) espectro de massas de *; (c) espectro de massas de †.	64
Figura 35: Estrutura de dado-dien	65
Figura 36: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.	66
Figura 37: Espectro infravermelho do dado e do ligante dado-dien	67
Figura 38: Espectro eletrônico de solução 10 mM dos ligantes dado-ea , dado-en e dado-dien em HBS/DMSO (1:1).	70
Figura 39: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes dado-ea , dado-en e dado-dien na presença de cátion Fe(III) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).	70
Figura 40: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes dado-ea , dado-en e dado-dien na presença de cátion Fe(II) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).	71
Figura 41: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes dado-ea , dado-en e dado-dien na presença de cátion Cu(II) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).	71
Figura 42: (acima) Espectros eletrônicos de Cu(II) 10 mM tratado com concentrações crescentes de ligantes em HBS/DMSO 1:1. (abaixo) Razão molar ligante:metal pela razão da absorbância obtida no comprimento de onda máximo específico de cada ligante (dado-ea 776 nm; dado-en 748 nm; dado-dien 648 nm).	73
Figura 43: Estudo da estabilidade do complexo CAFE 2 µM frente o aumento da concentração do ligante desferrioxamina (dfo).	74
Figura 44: Estudo da estabilidade do complexo CAFE 2 µM frente o aumento da concentração dos ligantes etanolamina, etilenodiamina, dietilenotriamina, dado-ea , dado-en e dado-dien	74
Figura 45: Estudo da estabilidade do complexo CACu 2 µM frente o aumento da concentração do ligante desferrioxamina (dfo).	75
Figura 46: Estudo da estabilidade do complexo CACu 2 µM frente o aumento da concentração dos ligantes etanolamina, etilenodiamina, dietilenotriamina, dado-ea , dado-en e dado-dien	75
Figura 47: Taxa de fluorescência da sonda DHR com soluções 10 µM de nta, dado-ea , dado-en , dado-dien , Cu ²⁺ , [Cu(нта)] ⁻ , [Cu(dado-ea)] ²⁺ , [Cu(dado-en) ₂] ²⁺ ou [Cu(dado-dien) ₂] ²⁺ variando a concentração de H ₂ O ₂ de 0 a 80 µM.	79

Figura 48: Taxa de fluorescência inicial da sonda DHR (50 μM) catalisada por concentração variada de H_2O_2 (0 – 80 μM) e concentração constante dos complexos de Cu(II) (10 μM) (u.a. = unidade arbitrária de fluorescência).	80
Figura 49: Taxa de fluorescência da sonda DHR com solução 50 μM de H_2O_2 e variando a concentração de soluções de nta, dado-ea , dado-en , dado-dien , Cu^{2+} , $[\text{Cu}(\text{nta})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ entre 0 e 40 μM	81
Figura 50: Taxa de fluorescência inicial da sonda DHR (50 μM) catalisada por concentração variada dos complexos de Cu(II) a uma concentração constante de 50 μM de H_2O_2 (u.a. = unidade arbitrária de fluorescência).	81
Figura 51: Curva dose-resposta para dien, dado-dien , e iminodibenzila contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após exposição em concentrações variadas aos compostos.	84
Figura 52: Curva dose-resposta para ea, dado-ea , e iminodibenzila contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após exposição em concentrações variadas aos compostos.	84
Figura 53: Curva dose-resposta para en, dado-en , e iminodibenzila contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após exposição em concentrações variadas aos compostos.	85
Figura 54: Curva dose-resposta avaliando a viabilidade de macrófagos RAW 264,7 quando expostos a concentrações variadas de iminodibenzila e dado-en	86
Figura 55: Comparativo das estruturas dos ligantes deste trabalho e do inibidor da tripanotona redutase, clomipramina.....	88
Figura 56: Curva dose-resposta dos derivados de cobre com dado-ea , dado-en e dado-dien contra (a) promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e (b) macrófagos RAW 264,7.	89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise elementar do intermediário dado	40
Tabela 2: Valores de log P obtidos por simulação computacional.	68
Tabela 3: Valores de log(K) entre cobre e ferro com os ligantes desferrioxamina, calceína, etanolamina, etilenodiamina e trietilenodiamina.	78
Tabela 4: Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos iminodibenzila, ea- dado-ea, en, dado-en , dien e dado-dien contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	85
Tabela 5: Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos iminodibenzila e o ligante dado-en , contra células do tipo RAW 264,7.	86
Tabela 6: Valores de IC ₅₀ (μM) obtidos para os complexos de cobre contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e macrófagos RAW.	89

Lista de Abreviaturas

ACN: acetonitrila.

ATR: do inglês *Attenuated total reflectance*, Refletância total atenuada.

n-BuLi: n-butil-lítio.

Chelex®: nome comercial de uma resina de troca iônica.

DHR: dihidrorodamina.

DL50: dose letal para 50% da população.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DTN: Doenças tropicais negligenciadas.

FDA: do inglês *Food and Drugs Administration*.

HBS: do inglês *Hepes Buffered Saline*.

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxi-*etil*)piperazina-1-il]etanossulfônico.

HPLC: do inglês *High performance liquid chromatography*, Cromatografia líquida de alta performance.

IC50: Concentração para inibir 50% da população.

LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry.

MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio.

NAT: nitrilotriacetato.

NHE: do inglês *Normal Hydrogen Electrode*, Eletrodo normal de hidrogênio.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PBS: do inglês *Phosphate buffer saline*, Tampão fosfato salino.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

TFA: ácido trifluoroacético.

THF: tetrahidrofurano.

Sumário

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract.....	8
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	13
Lista de Abreviaturas.....	14
1. Introdução.....	15
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas e Leishmaniose	15
1.2. Tratamentos atuais para leishmaniose e pesquisas recentes	17
1.3. Uso de metais em medicina	22
1.4. Tripanotiona redutase	25
2. Objetivos.....	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Síntese dos quelantes e formação dos complexos.....	29
3.2. Caracterização dos complexos.....	30
3.2.1. Análise elementar	30
3.2.2. Cromatografia.....	30
3.2.3. Espectroscopia no infravermelho [Nakamoto, 1997]	30
3.2.4. Espectroscopia Eletrônica no ultravioleta/visível.....	31
3.2.5. Ressonância Magnética Nuclear.....	33
3.2.6. Lipofilicidade.....	33
3.2.7. Estabilidade relativa dos complexos.....	33
3.2.8. Atividade pró-oxidante em meio mimético fisiológico	35
3.2.9. Atividade anti-leishmânia e citotoxicidade	36
4. Resultados e Discussão.....	38
4.1. Formação e caracterização dos complexos	38
4.1.1. Síntese do intermediário dato com n-BuLi	38
4.1.2. Síntese dos ligantes.....	44
4.1.3. Lipofilicidade.....	67
4.1.4. Formação e análise dos complexos com ferro e cobre	69
4.1.5. Estudo da atividade pró-oxidante na presença de peróxido	78
4.1.6. Atividade biológica	83
5. Conclusões.....	90
6. Bibliografia.....	92

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas e Leishmaniose

As chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são 17 doenças acompanhadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a qual, por sua vez, atua incentivando governos e indústrias farmacêuticas privadas a investirem na melhora das condições de vida da população mundial através da erradicação de tais doenças, entre outras medidas. Elas possuem esta nomenclatura porque primordialmente ocorrem em regiões tropicais cujas condições de saneamento são precárias e os habitantes de tais regiões geralmente são pessoas carentes que têm pouco ou nenhum acesso aos caríssimos tratamentos indicados. Recentemente tem sido dado maior destaque a essas doenças no meio acadêmico, inclusive com a entrega do Prêmio Nobel de Medicina em 2015 aos pesquisadores William C. Campbell e Satoshi Omura, pela descoberta da avermectina que diminuiu radicalmente a incidência de Cegueira dos Rios e Elefantíase provocada por nemátodos, e para a pesquisadora Youyou Tu, pela descoberta da artemisinina que reduziu significativamente a taxa de mortalidade de pacientes que sofriam de Malária [Nobel Prize, 2016].

A leishmaniose está na lista da OMS como uma das DTN. Trata-se de uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania sp.* e transmitida através da picada do mosquito-palha (principalmente *Phlebotomine spp.* e *Lutzomyia longipalpis*). Ocorre em três formas [WHO, 2014]:

- Cutânea – considerada a forma menos grave e mais comum da infecção, provoca diversas úlceras na pele do rosto, braços e pernas. Normalmente a cura ocorre naturalmente em poucos meses, deixando cicatrizes. É causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*. Cerca de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos são reportados anualmente, sendo que 2/3 destes casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria.

- Muco-cutânea – esta forma destrói parcial ou totalmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Recomenda-se tratamento medicamentoso para completar a cura. É causada, principalmente, pela espécie *L. braziliensis*. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru.
- Visceral – a forma mais grave de leishmaniose, ela é completamente fatal em até dois anos se não for tratada. Atinge órgãos internos, causando muita febre, perda de peso, inchaço no fígado e baço e anemia. Causada pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*. Estima-se que surjam, anualmente, de 200.000 a 400.000 novos casos, sendo 90% destes em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul.

O ciclo da leishmaniose começa quando o mosquito-palha inocula o parasita na fase promastigota no hospedeiro vertebrado, levando a uma invasão e/ou rápida fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos. Nos macrófagos, os parasitas sobreviventes se multiplicam como amastigotas que irão infectar outras células do organismo (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*, adaptado de [CDC, 2015].

Considerando que o raio de sobrevoo do mosquito-palha é de apenas algumas poucas centenas de metros e que ele habita principalmente lugares com bastante matéria orgânica, calor e umidade (como lixões, entulhos, cascas de árvores), a incidência da leishmaniose ocorre predominantemente em regiões tropicais cujas condições de saneamento sejam precárias.

1.2. Tratamentos atuais para leishmaniose e pesquisas recentes

Por muitos anos o único tratamento disponível para leishmaniose era baseado em compostos de antimônio. Até hoje o rol de medicamentos utilizados é bastante limitado. Um dos primeiros compostos a ser utilizado foi o tartarato de antimônio(III). Este composto foi utilizado desde o início do século XX até meados da década de 30 daquele século, porém a alta toxicidade desse metal neste estado de oxidação resultou em graves efeitos colaterais (in-

tolerância gastrointestinal, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, depressão, pancreatite) que levaram ao seu desuso. Desde então o antimônio(III) passou a ser substituído pelo derivado pentavalente [Mishra, 2007]. Até hoje o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimonito de meglumina (Glucantime®) são a linha de frente no combate à leishmaniose (Figura 3). O tratamento consiste em doses diárias intramusculares ou intravenosas de 20 mg Sb(V)/kg (máx. 850 mg/dia) entre 21 a 28 dias [Yan, 2005]. O mecanismo de ação ainda não está bem determinado, mas supõe-se que o antimônio(V) é reduzido *in vivo* pelos tióis do parasita para a forma trivalente, mais tóxica [Yan, 2005]. O antimônio trivalente internalizado no macrófago pode inibir o reparo de DNA do amastigota, levando a apoptose, desbalanceamento no sistema redox e/ou inibição de enzimas vitais ao parasita (Figura 2).

Figura 2: Provável mecanismo de atuação dos medicamentos antimoniais pentavalentes (adaptado de [Yan, 2005]).

Embora a formulação de antimoniais pentavalentes seja menos tóxica que a trivalente, ainda assim ela é bastante nociva, causando pancreatite, aumento de aminotransferases no soro sanguíneo e anormalidades eletrocardiográficas. Porém, o principal efeito colateral do uso tão difundido do Pentostam e Glucantime é a resistência adquirida pelo parasita ao longo

dos anos, fazendo com que ele perca sua eficácia [Ouellette, 2004; Ashutosh, 2007; Polonio, 2008].

Nos casos em que o tratamento apenas com antimônio já não é tão eficiente, utiliza-se uma combinação com outros compostos como, por exemplo, anfotericina B lipídica e miltefosina [Mishra, 2007].

A anfotericina B (Figura 3), um antifúngico muito conhecido produzido pela *Streptomyces nodosus*, mostrou-se muito eficiente contra o protozoário da leishmaniose. Supõe-se que esta molécula liga-se a estruturas na membrana celular do parasita levando a um mau funcionamento e até a lise da célula. Porém este composto também apresentou alguns pontos negativos. Quando realizada a produção pela bactéria *S. nodosus*, deve-se purificar muito bem o composto para eliminar toda anfotericina A produzida junto, pois esta é altamente tóxica. Outros problemas começaram a surgir, como protozoários adquirindo rapidamente resistência, bem como indução à toxicidade, causando problemas principalmente em células renais [Mishra, 2007]. Para reduzir estes problemas, pesquisadores sugeriram a formulação da anfotericina B lipídica (ou lipossomal). A administração intravenosa de uma infusão deste novo composto foi aprovada para uso contra a leishmaniose visceral em 1997 pelo FDA (do inglês, *Food and Drugs Administration*, órgão governamental dos Estados Unidos que regulamenta alimentos, cosméticos, medicamentos, etc) [CDC, 2015].

Outro medicamento utilizado atualmente contra a leishmaniose é a miltefosina (Figura 3), um alquilfosfolipídio que foi desenvolvido originalmente para atuar como antitumoral. Na busca de novos medicamentos, observou-se que este composto apresentou atividade tanto para o promastigota quanto para o amastigota da *L. donovani*. O maior diferencial da miltefosina é ser o primeiro fármaco antileishmânica administrada oralmente, tendo sido aprovada pelo FDA em março de 2014. Os principais pontos negativos da miltefosina são seu longo

período de meia vida no organismo (de 150 a 200 horas), suposto efeito de inibição da Na^+ , K^+ -ATPase e a alta taxa de teratogenicidade [CDC, 2015; Mishra, 2007].

Figura 3: Estruturas dos fármacos Pentostam, Glucantime, Anfotericina B e Miltefosina.

Como citado anteriormente, além dos efeitos colaterais fisiológicos causados pelos tratamentos, há um fator social de grande impacto que faz com que a leishmaniose predomine geralmente em países mais pobres: o alto custo dos medicamentos associado com o baixo poder aquisitivo dos infectados. Isso tem levado o meio científico a buscar diversas alternativas entre produtos naturais, compostos orgânicos sintéticos e complexos metálicos que sejam mais eficientes do que os tratamentos em voga, com menos (ou idealmente nenhum) efeitos colaterais e mais baratos [Tiuman, 2011].

Dentre os produtos naturais encontram-se muitos trabalhos de grupos brasileiros. O grupo da professora Silvia Uliana do ICB-USP tem estudado a atividade anti-leishmânia dos moduladores seletivos de receptor de estrógeno, fármacos utilizados como quimioterápicos contra câncer de mama. Em experimentos *in vivo*, o raloxifeno apresentou redução na extensão de lesões em camundongos BALB/c tratados com 100 mg/kg/dia, sem observação de efei-

tos tóxicos [Reimão, 2014]. Também foram alcançados resultados promissores quando utilizado o tamoxifeno, sozinho ou combinado com miltefosina ou anfotericina B, com *L. amazonensis* [Miguel, 2008; Trinconi, 2014; Trinconi, 2016]. O tamoxifeno também apresentou bons resultados quando utilizado no tratamento de hamsters dourados infectados com *L. chagasi*, causador da leishmaniose visceral, obtendo-se uma IC_{50} de $2,4 \pm 0,3 \mu M$ [Miguel, 2009]. Esperandim *et al.* testaram a atividade *in vitro* de óleo essencial extraído do fruto de *Piper cubeba* contra o promastigota da *L. amazonensis*, pois esta mistura de compostos já havia demonstrado eficácia antibacteriana e contra esquistossomose, porém o experimento mostrou que a IC_{50} ficou cerca de quatro vezes maior quando comparada com a anfotericina B [Esperandim, 2013]. Da mesma forma, Nogueira *et al.* avaliaram a atividade do extrato de *Physalis angulata* contra o promastigota e amastigota da *L. amazonensis* e promastigota da *L. braziliensis*, sem obter resultados significativos em relação ao uso de anfotericina B [Nogueira, 2013]. O grupo de Pinto *et al.* estudou a atividade de quatro peptídeos microbianos isolados de secreções do anfíbio *Phyllomedusa nordestina* contra promastigotas da *L. infantum*. Apesar do IC_{50} ser muito maior quando comparado com a anfotericina B, um dos compostos isolados apresentou boa permeabilidade na membrana plasmática do parasita, o que poderia ser utilizado como ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos [Pinto, 2013].

Diversos trabalhos mostram o estudo de compostos orgânicos sintetizados e seus derivados [Tiuman, 2011]. Como exemplo, pode-se citar um trabalho francês que sintetizou 24 derivados de 4-arilcumarinas contra o promastigota e amastigota da *L. donovani*. Destes, o composto 4-(3,4-dimetoxifenil)-6,7-dimetoxicumarina apresentou quase o dobro de índice de seletividade contra o amastigota em relação a monócitos humano THP1 ($> 265 \mu M$) quando comparado com a anfotericina B ($140 \mu M$). Isso significa que este composto é relativamente mais tóxico às células do parasita do que a células humanas [Pierson, 2010]. Atualmente exis-

tem somente dois estudos clínicos em andamento para obtenção de vacinas contra a leishmaniose, no Brasil e no Uzbequistão [Srivastava, 2016].

Assim como existem vários trabalhos para compostos orgânicos sintéticos, muitos grupos estudam a ação de complexos metálicos contra a leishmaniose.

1.3. Uso de metais em medicina

Grande parte da tabela periódica é composta de metais e a maioria deles é encontrada em diversas formas na natureza. Estão presentes nas rochas, minerais, solo, água, ar e por consequência, nos seres vivos, sendo alguns deles, inclusive, essenciais para o ser humano. Porém, devido aos metais estarem, desde a Antiguidade, presentes nas atividades humanas em quantidades crescentes nas confecções de utensílios, ferramentas, armas, maquinários, alquimia e produtos químicos, aumentou-se também a exposição a eles. Mesmo os essenciais para a vida, quando em altas concentrações e longos períodos de exposição, podem se tornar tóxicos e letais. Mais recentemente os principais usos de metais são na indústria, agricultura e medicina.

Como praticamente todos os seres vivos, os protozoários da *Leishmania* também necessitam de íons metálicos como Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} para constituir suas enzimas, garantindo sua sobrevivência. Atualmente, sugere-se que existe uma proteína de transporte na membrana de macrófagos, NRAMPI, que retira metais divalentes dos fagossomos, combatendo a proliferação de microrganismos ao retirar estes micronutrientes essenciais a eles [Forbes, 2001]. Em contrapartida, foi demonstrado que a *L. amazonensis* também possui uma proteína de transporte em sua membrana, LIT1, que atua justamente no transporte de metais divalentes, com preferência por Fe^{2+} [Huynh, 2006; Marquis, 2007].

O uso de compostos metálicos e semi-metálicos na medicina remete aos tempos antigos, quando elementos como ouro, ferro e arsênio eram utilizados para tratar diversos tipos de

enfermidades. Nos tempos modernos, talvez o primeiro fármaco de sucesso dessa categoria tenha sido o Salvarsan, desenvolvido por Paul Ehrlich, que contém arsênio e foi utilizada no tratamento de sífilis. Com o surgimento da penicilina, este fármaco tornou-se obsoleto. Mas o uso do arsênio em fármacos trouxe à tona um ponto importante, que é a sutil dose em que um fármaco passa a atuar como veneno. Como já mencionado anteriormente, muitos metais são essenciais para nosso organismo e desvios das concentrações normais, pra mais ou pra menos, são causas de doenças. Quando este ponto de equilíbrio é bem determinado, torna-se possível prescrever remédios à base de metais pra uma série de doenças. Atualmente doenças que são, ou podem vir a ser em breve, tratadas por derivados metálicos são anemia ferropriva (ferro), asma (ouro e magnésio), transtorno bipolar (lítio), diabetes (vanádio), artrite reumatóide (ouro), AVE - acidente vascular encefálico (magnésio), doenças tropicais (antimônio e ródio) e úlcera (bismuto). Mas um dos exemplos mais importantes de como um composto metálico tem um papel fundamental como agente terapêutico (no caso, antitumoral) é o centro de platina na cisplatina, que se coordena com o DNA e perturba a replicação celular [Gielen, 2005].

Os metalofármacos têm ganhado recente destaque no combate às doenças parasitárias. Em geral são usados metais que já possuem alguma outra atividade biológica reportada na literatura científica. No caso da leishmaniose, são encontrados trabalhos baseados em complexos de vanádio [Benitez, 2011; Gambino, 2011], platina [Nguewa, 2005; Visbal, 2008; Carmo, 2011], ouro [Navarro, 2007; Navarro, 2009; Vieites, 2009], rutênio [Martínez, 2012; Iniguez, 2013], paládio [Navarro, 2008; Franco, 2013], níquel [Ramírez-Macías, 2012], bismuto [Andrews, 2011], entre outros, além de nanopartículas de prata [Baiocco, 2011]. Especificamente para cobre, Maffei e Portas estudaram a atividade de complexos de Cu(II) com ligantes fluorados contra o promastigota da *L. amazonensis*. A utilização destes complexos mais lipofílicos do que seus equivalentes hidrogenados levou a um maior efeito antileishmânico [Maffei, 2009; Portas, 2012]. Navarro *et al.* estudaram a formação de complexos de co-

bre com dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz), que apresentou atividade leishmanicida relacionada à capacidade destes compostos agirem diretamente no DNA do promastigota de *L. braziliensis* e *L. mexicana*. [Navarro, 2003a; Navarro, 2003b]. Paletta-Silva *et al.* avaliaram a inibição da enzima 3'-nucleotidase, específica da membrana celular do parasita e que contribui para a interação parasita-macrófago, por íons Cu^{2+} . Os estudos mostraram que a ação do íon cobre(II) estava muito mais relacionada a mudanças estruturais da proteína por causa da ligação do metal do que com a geração de espécies reativas de oxigênio [Paletta-Silva, 2012].

Mas, por que usar complexos de cobre? A essencialidade de um elemento pode ser definida segundo o critério de que uma deficiência fisiológica ocasionada pela remoção do elemento da dieta é remediada quando o elemento é novamente incluído na dieta, verificando se há uma função biológica específica associada a este elemento [Frieden, 1985]. Os metais apresentam uma vasta gama de funções nos sistemas biológicos. Os elementos Ca, Mg, K e Na, por exemplo, atuam na manutenção do balanço de carga e osmótico. Os íons de metais de transição, como de Zn, Cu, Mn, Fe, possuem grande importância em enzimas como a superóxido dismutase, citocromo C oxidase, nitrogenase ou em proteínas como hemoglobina ou hemocianina [Roat-Malone, 2007]. Entretanto, cátions de metais essenciais, mas redox-ativos, como o Cu^{2+} ou o Fe^{2+} também podem causar sérios efeitos tóxicos, quando fora dos compartimentos bioquímicos adequados.

Um adulto médio possui cerca de 80 mg de cobre no organismo. Destes, a maior parte está ligado na enzima transportadora ceruloplasmina. A essencialidade deste elemento está diretamente relacionada com as reações redox, pois também está presente nas proteínas SOD1, EC-SOD e citocromo oxidase, que são muito importantes no combate ao stress oxidativo. Entretanto, os íons cobre também catalisam reações que causam danos oxidativos, como danos ao DNA e peroxidação de lipídeos de baixa densidade [Halliwell, 2007; Frelon, 2003].

A diferença de um elétron entre os dois estados de oxidação mais comuns do cobre, Cu(I) e Cu(II), permite que esse metal promova reações radicalares, similares às do ferro:

Assim, alterando seu estado de oxidação, o cobre catalisa a conversão de dois radicais superóxido e dois H^+ em peróxido e O_2 . Porém, na presença de Cu(I), o íon superóxido pode formar uma hidroxila [Halliwell, 2007].

Nesse sentido, o projeto de um metalofármaco baseado em um metal essencial redox-ativo é interessante, dado que o alvo biológico normalmente não procura se defender do metal, permitindo que seu potencial pró-oxidante seja usado com fins terapêuticos.

1.4. Tripanotiona redutase

Enquanto nos mamíferos o sistema de defesa antioxidante, que mantém o ambiente intracelular reduzido, é catalisado pela glutathiona redutase (GR), que media o ciclo glutathiona oxidada (GSSH) e reduzida (GSH), nos tripanossomatídeos, como *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*, o sistema é baseado na oxidação e redução da tripanotiona, catalisada pela tripanotiona redutase (TR) (Figura 4). Enquanto o sistema à base de glutathiona dos mamíferos tem como principal função proteger a mitocôndria de danos oxidantes (sendo, portanto, encontrada nessa região da célula), a tripanotiona redutase encontra-se exclusivamente distribuída no

compartimento citossólico [Smith, 1991]. Muitas das funções antioxidantes da tripanotiona geram a sua forma oxidada, fazendo com que a TR tenha um papel central na regeneração da forma reduzida. Outra diferença notável entre a TR e a GR é que a primeira apresenta uma região hidrofóbica formada por Leu-17, Trp-21, Tyr-110, Met-113 e Phe-114, enquanto a região equivalente na GR é polar, formada por Leu-33, Arg-37, Tyr-114, Asn-117 e Leu-118 [Karplus, 1989].

Figura 4: Reação catalisada pela tripanotiona redutase (TR).

Tudo isso sugere que inibir a enzima TR seja uma estratégia interessante no combate a esses parasitas [Krieger, 2000]. De fato, alguns inibidores da TR têm sido estudados, como arilfuranos [Oliveira, 2008], compostos naftoquinônicos [Ferreira, 2008], bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas [Braga, 2012], 3,4-dihidroquinazolininas [Patterson, 2011] e mepacrina [Jacoby, 1996].

Um dos melhores inibidores conhecidos da TR é a clomipramina (Figura 5), um benzodiazepínico utilizado como antidepressivo, sendo a constante de inibição da ordem de 6,5 μM [Rocha, 2010]. Devido à sua estrutura, ela pode se acoplar àquela região hidrofóbica da TR [Benson, 1992]. Zilberstein e Dwyer mostraram que a clomipramina tem atividade tanto contra o promastigota quanto para o amastigota dos parasitas *Leishmania donovani* e *Leishmania major*, sem aparente toxicidade ao hospedeiro. A citotoxicidade para os amastigotas foi

maior do que para os promastigotas, sendo a DL_{50} igual a $0,60 \pm 0,08$ e $2,30 \pm 0,35 \mu M$, respectivamente, para a *L. donovani* [Zilberstein, 1984].

Figura 5: Estrutura da clomipramina.

Considerando o que foi exposto anteriormente, torna-se interessante a ideia de desenvolver um composto bifuncional, com estrutura similar à clomipramina, que possa inibir a enzima tripanotiona redutase e que ao mesmo tempo libere dentro do protozoário um íon metálico redox-ativo, como Cu^{2+} , e/ou possa remover através de quelação outros metais essenciais envolvidos no metabolismo do parasita.

2. Objetivos

- a) Sintetizar e caracterizar novos ligantes derivados da iminodibenzila;
- b) Formar e caracterizar complexos de cobre com estes ligantes;
- c) Determinar estabilidade relativa e atividade pró-oxidante dos complexos formados;
- d) Avaliar a atividade antileishmânica frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis* e a atividade citotóxica contra macrófagos RAW 264,7.

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese dos quelantes e formação dos complexos

Os quelantes foram sintetizados a partir da conjugação da iminodibenzila, que é um modelo de ligante baseado no sítio de reconhecimento da clomipramina na TR, a diferentes ambientes coordenantes. Em uma primeira etapa, a iminodibenzila foi atacada com uma base forte sendo logo em seguida adicionada epicloridrina [Levy, 2001], formando um intermediário, 5H-dibenz[b,f]azepino,10,11-dihidro-5-(2-oxiranilmetil) (a partir daqui chamado de “**da-dado**”), que atuará como um *linker* para introdução da região quelante de amins primárias ou secundárias como etanolamina “ea”, etilenodiamina “en” ou dietilenotriamina “dien”. A abertura do anel epóxi pela amina favorece a formação do quelante (Figura 6).

Figura 6: Rota proposta para a produção dos quelantes: (a) iminodibenzila, (b) intermediário **da-dado**, (c) estrutura geral dos quelantes.

Logo em seguida, os quelantes foram solubilizados em meio HBS/DMSO (1:1) na presença de soluções aquosas de CuSO_4 ou $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ a temperatura ambiente e em quantidade molar suficiente para formação dos complexos, determinada experimentalmente.

3.2. Caracterização dos complexos

3.2.1. Análise elementar

A composição do intermediário **dado** foi determinada através de análise elementar no equipamento Perkin Elmer (C, H, N), disponível na Central Analítica do IQUSP.

3.2.2. Cromatografia

Métodos cromatográficos foram utilizados para avaliar a formação do intermediário **dado**, dos quelantes orgânicos e para a purificação destes últimos. São eles:

- Cromatografia em camada delgada (CCD);
- Cromatografias líquidas no laboratório da Profa. Dra. Maria Teresa Machini (IQUSP): HPLC de fase reversa da Thermo Separation Products (composto de uma coluna C18 Vydac cat#218TP54, uma bomba Constametric 3500, uma bomba Constametric 3200, um injetor automático Spectra System AS3000 e um detector de ultravioleta Waters 484), HPLC preparativo Waters 600 (composto de um injetor Waters Delta 600, uma coluna preparativa C18 Vydac cat#218TP1022, um detector 2487 e um registrador Kipp&Zonen Servogor 124) e LC-MS da Shimadzu (composto de duas bombas LC-20AD, um degaseificador DGU-20A₃, um forno de coluna CTO-20A, uma pré-coluna C18 Shim-pack GVP-ODS, uma coluna C18 Shim-pack VP-ODS e um detector SDP-20AV acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon Xda Bruker Daltonics).

3.2.3. Espectroscopia no infravermelho [Nakamoto, 1997]

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica fundamental para entender a estrutura de moléculas orgânicas, através de vibrações específicas conhecidas para os mais

diversos grupos funcionais de uma molécula. Desta forma, espectros na região do infravermelho dos quelantes e complexos foram obtidos diretamente via ATR com cristal de germânio no equipamento Shimadzu IRPrestige-21, localizado no laboratório da Profª Liane Rossi - IQUSP.

3.2.4. Espectroscopia Eletrônica no ultravioleta/visível

Através da espectroscopia na região do ultravioleta/visível é possível obter algumas informações sobre a estrutura eletrônica dos complexos formados, principalmente em se tratando de complexos de Cu(II), que possuem algumas características peculiares.

O íon Cu(II) possui nove elétrons de valência na camada 3d. Ao formar complexos hexacoordenados, e considerando o princípio de exclusão de Pauli, seis elétrons ocuparão os três orbitais de menor energia t_{2g} enquanto os outros três elétrons podem ocupar os outros dois orbitais de maior energia e_g (Figura 7). Por questões energéticas, dois elétrons normalmente ocupam o orbital d_{z^2} , causando um alongamento do eixo z e uma compressão dos eixos x e y. Tal alongamento enfraquece as ligações do eixo z, fazendo com que o complexo inicialmente hexacoordenado sofra uma distorção tetragonal e passe a ser tetracoordenado. Este é o chamado efeito Jahn-Teller. Nessa condição, ocorrem transições eletrônicas $d-d$ e os complexos apresentam coloração.

Figura 7: Representação da energia dos orbitais d em um campo cristalino octaédrico [Atkins, 2010].

Pela regra de seleção de Laporte uma molécula ou íon centro-simétrico só terá transições permitidas quando houver uma mudança de paridade. Para um complexo octaédrico as transições $d-d$ são proibidas por Laporte, pois são $g \leftrightarrow g$. Isso explica a baixa intensidade relativa de tais transições, com ϵ_{max} entre 20 e 100 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Mas essa regra pode ser relaxada caso o complexo sofra distorções de simetria ou quando houver uma vibração assimétrica. Para complexos tetraédricos, essa regra não se aplica, pois não possuem centro de simetria nem índices g ou u e o ϵ_{max} pode chegar a 500 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Outra transição que pode ocorrer é a chamada de transferência de carga quando um elétron desloca-se entre um orbital do ligante para o metal ou vice-versa. As transferências de carga apresentam alta intensidade e o ϵ_{max} está na faixa de 1000 a 50000 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [Atkins, 2010].

Os espectros eletrônicos foram obtidos utilizando microplacas de plástico ou de quartzo, no leitor de microplacas SpectraMax M4 (Molecular Devices), localizado no Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos, do Prof. Breno Pannia Espósito - IQUSP.

3.2.5. Ressonância Magnética Nuclear

As estruturas dos compostos formados foram avaliadas através do espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , nos equipamentos Bruker DRX500 ou INOVA 300 MHz da Central Analítica-IQUSP.

3.2.6. Lipofilicidade

A lipofilicidade é uma propriedade físico-química dos compostos comumente expressa através do logaritmo do coeficiente de partição (P), que é definido como a razão entre a concentração relativa de um composto em fase orgânica pela concentração relativa em fase aquosa. Portanto, quanto maior o valor de “log P” de um composto, maior sua solubilização em meios apolares.

A lipofilicidade dos ligantes e dos complexos foi estudada através da simulação do logaritmo do coeficiente de partição no software Marvin Sketch, versão 16.6.27.0, para Windows 7.6.1, criado pela empresa Chem Axon Ltd. Alguns dos valores simulados foram comparados com valores descritos na literatura.

3.2.7. Estabilidade relativa dos complexos

A calceína (Figura 8) é um ligante orgânico que possui grande afinidade por cátions metálicos. Uma característica interessante deste ligante é que quando não está complexada, ela emite fluorescência em 520 nm, após ser excitada em 485 nm. Inversamente, diversos íons metálicos suprimem a fluorescência dessa molécula quando formam complexos [Haughland, 2001]. Assim, acompanhando a variação da fluorescência desta sonda, é possível qualificar a estabilidade relativa de outro ligante, através da competição entre eles pelo íon metálico [Espósito, 2002b]. A supressão da fluorescência através da complexação com íons ferro Fe^{3+} (abreviado como CAFe) já é bem conhecida, assim como a recuperação desta fluorescência

quando se adiciona o ligante desferrioxamina (dfo), cuja afinidade pelo ferro é muito maior [Ali, 2003; Breuer, 1996; Kontoghiorghes, 1995]. Da mesma forma, íons Cu^{2+} suprimem a fluorescência da calceína, com uma constante de formação do complexo CACu de 12,3 em pH neutro [Saari, 1984], sendo que a adição de excesso de ligantes de maior afinidade também é capaz de regenerar a fluorescência da calceína suprimida com cobre.

Figura 8: Estrutura da calceína.

Portanto, complexos CAFe ou CACu podem ser usados para estudar a afinidade de quelantes desconhecidos pelos íons metálicos Fe^{3+} e Cu^{2+} , respectivamente.

Os complexos CAFe e CACu foram preparados misturando-se soluções equimolares de calceína e de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ e CuSO_4 , respectivamente, em água deionizada. No caso do CAFe, a adição de calceína à solução de Fe(II) provoca a rápida oxidação deste [Espósito, 2002b]. A intensidade da fluorescência destes complexos foi acompanhada quando adicionadas concentrações variadas dos ligantes **ea**, **en**, **dien**, **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**, utilizando o ligante dfo como parâmetro de comparação. Foi utilizado o equipamento SpectraMax M4 (Molecular Devices), localizado no Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos, e as soluções foram preparadas utilizando meio tamponante HBS (*HEPES Buffered Saline*, solução aquosa HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, com pH ajustado para 7,4) tratado com Chelex[®] (0,01 g.mL⁻¹, como forma de reduzir a contaminação por íons metálicos).

3.2.8. Atividade pró-oxidante em meio mimético fisiológico

A possibilidade de geração de espécies radicalares em tampões fisiológicos foi estudada através da reação de uma mistura pró-oxidante contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a sonda fluorimétrica cloreto de dihidrorodamina (DHR) na presença ou ausência dos complexos **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** com cobre(II) em razões molares 1:1 e 1:2 (metal:ligante, respectivamente) e $[Cu^{II}(nta)]$. Também foram estudados o íon metálico e os ligantes isolados. Na forma reduzida, essa sonda não é fluorescente, entretanto, uma série de substâncias (espécies reativas de oxigênio - ERO, O_2) pode convertê-la à forma oxidada, fluorescente (Figura 9). Adaptamos este método para o nosso estudo, visto que foi originalmente concebido para a detecção de ferro redox-ativo em meio fisiológico [Espósito, 2003; Espósito, 2002a].

O meio fluorogênico consiste em uma solução de DHR 50 μM , preparada a partir de estoques congelados (100 mM em DMSO), em tampão HBS/Chelex[®]. A leitura de fluorescência é executada em leitor de microplacas (BMG Fluostar Optima), operando com incubação a 37 °C, $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 485/515$ nm e ganho de 600. A intensidade de fluorescência de cada poço é medida em intervalos de um minuto durante uma hora. Os dados são apresentados como “intensidade de fluorescência / tempo” e não como pontos finais, para minimizar erros (Figura 9) [Amaral, 2008; Espósito, 2003; Espósito, 2002a].

Figura 9: Princípio de funcionamento do método de detecção fluorimétrica de atividade redox. (a) A adição de um pró-oxidante (peróxido ou ascorbato) inicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) catalisada por Cu presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente. (b) Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de pró-oxidantes; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de pró-oxidante. (c) Em alguns casos específicos, a taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração do pró-oxidante, podendo ser usada, se assim se desejar, para quantificar a concentração do metal na amostra estudada [Espósito, 2011].

3.2.9. Atividade anti-leishmânia e citotoxicidade

Os promastigotas do gênero *L. amazonensis* foram cultivados em Meio 199 com 10% de soro fetal de bezerro (FCS – *fetal calf serum*) a 25°C com repiques semanais [Arruda, 2005; Souza, 2006]. Os ensaios de atividade contra o parasita foram realizados em microplacas de 96 poços. Em cada poço, foram colocados $2,0 \times 10^6$ promastigotas em volume final de 200 μL de meio. Os parasitas foram expostos em duplicata ou triplicata a concentrações cres-

centes dos complexos e ligantes pelo período de 48 horas a 25°C, utilizando-se concentrações crescentes de anfotericina B como controle positivo e a ausência de qualquer tratamento como controle negativo. Em seguida, a microplaca foi incubada por mais 2-3 horas a 25°C após adição de 30 µL de MTT 5 mg/mL (em PBS) em cada poço para avaliar a viabilidade do parasita. Após este período, fez-se a lise das células através da adição de 120 µL de SDS 20%, agitando-se vigorosamente para homogeneização. Por fim, fez-se a leitura de densidade óptica para determinar a porcentagem de parasitas viáveis através da leitura de absorbância em 595 nm e utilizando 690 nm como referência. As medidas foram feitas em espectrofotômetro leitor de placas POLARstar Omega (BMG Labtech) [Tronco, 2015].

Para os testes de citotoxicidade frente a células de mamíferos, foram utilizados macrófagos RAW 264,7, uma linhagem celular obtida de camundongos normalmente utilizada como modelo de resposta celular [ATCC, 2016]. Um número aproximado de $2,0 \times 10^5$ células por poço foi exposto a concentrações variadas de ligantes e complexos em microplacas de 96 poços durante 48 horas. Em seguida, a microplaca foi incubada por mais 2-3 horas a 37°C após adição de 30 µL de MTT 5 mg/mL (em PBS) em cada poço. Após este período, fez-se a lise das células através da adição de 120 µL de SDS 20%, agitando vigorosamente para homogeneização. Por fim, fez-se a leitura de densidade óptica, conforme descrito no parágrafo anterior [Miguel, 2011].

Esses experimentos foram feitos em colaboração com a Profa. Dra. Sílvia Uliana, do ICB-USP.

4. Resultados e Discussão

4.1. Formação e caracterização dos complexos

4.1.1. Síntese do intermediário **dad** com n-BuLi

Em um balão de fundo redondo sem umidade e com atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se ~20 mmol (4 g) de iminodibenzila (10,11-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina) em THF seco (solvente), formando uma solução amarela límpida. A temperatura do sistema foi reduzida para -72°C (mistura etanol/gelo seco), seguida da adição de ~22 mmol (16 mL de solução 1,4 M) de n-BuLi, observando-se mudança de coloração para castanho escuro com bordas esverdeadas. Esperou-se o sistema alcançar temperatura ambiente para garantir a formação do amideto de lítio, resfriou-se o meio novamente a -72°C e foram adicionados ~25 mmol (2 mL) de epicloridrina (mecanismo da reação na Figura 10). Conforme a solução foi alcançando temperatura ambiente, apresentou uma coloração avermelhada.

Figura 10: Mecanismo da reação SN2 entre iminodibenzila e epicloridrina para a formação do intermediário (**dado**), utilizando butil-lítio como base forte.

Fez-se acompanhamento da reação através de CCD utilizando Hexano:Acetato de etila (10:1) como eluente (Figura 11) e se observou a formação de um ponto diferente dos reagentes:

Figura 11: CCD da reação entre epicloridrina e iminodibenzila com n-BuLi. Placa de sílica, eluente hexano/acetato de etila (10:1).

Após 13h sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se cerca de 10 mL de solução saturada de NaCl e cerca de 5 mL de água deionizada. Fez-se extração líquido-líquido utilizando diclorometano e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, retirado logo em seguida por filtração simples. O diclorometano foi evaporado rotativamente, obtendo-se um líquido amarelado muito viscoso, com perfil idêntico à coluna C da Figura 11 quando analisado por CCD nas mesmas condições anteriores. O produto da reação foi separado da iminodibenzila através de cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente uma mistura hexano:acetato de etila (10:1). As frações contendo o produto foram reunidas e o solvente evaporado rotativamente, restando um líquido muito viscoso que, com a diminuição da temperatura, tornou-se um sólido esbranquiçado. A massa final obtida foi de 4,7 g e uma amostra foi encaminhada para análise elementar.

Tabela 1: Análise elementar do intermediário **dado**

%	Experimental	Calculado Intermediário (dado) $C_{17}H_{17}NO$	Calculado Iminodibenzila $C_{14}H_{13}N$
C	80,8	81,2	86,1
H	6,8	6,8	6,7
N	5,6	5,6	7,2

Só pela análise elementar há fortes indícios que o produto formado é o intermediário (**dado**) desejado. Fez-se também análise por RMN de ^{13}C e 1H (Figura 12 e Figura 13, respectivamente) e infravermelho (Figura 14 e Figura 15).

O espectro desacoplado de ^{13}C (Figura 12) mostra os grupos alquílicos à direita e os carbonos aromáticos sem prótons (4 e 5) com intensidades relativamente baixas. O carbono do grupo epóxi, com apenas um próton, também apresenta intensidade baixa. Os carbonos aromáticos estão na região entre 120 e 150 ppm. Ao carbono metilênico ligado ao átomo de O foi atribuído um maior valor de ppm em relação ao átomo 3.

Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C do **dado**.

O espectro de ^1H (Figura 13) apresenta as linhas correspondentes à região dos aromáticos ao redor de 7 ppm e dos prótons alquílicos entre 2,5 e 4 ppm. A atribuição dos prótons aromáticos é complicada pela sobreposição de vários dupletos, embora o cálculo de integração tenha resultado em oito prótons, conforme o esperado. Dois quartetos em 2,5 – 2,8 ppm totalizando dois prótons correspondem aos prótons em 1 (CH_2 com dois prótons vizinho cada). O multipletto centrado em 3,1 ppm corresponde ao próton em 2, com três vizinhos. O simpleto em 3,18 ppm corresponde aos quatro prótons sem vizinhos nas posições 6. Os dois quartetos entre 3,8 – 4,0 ppm correspondem aos dois prótons com um vizinho cada, na posição 3.

Figura 13: Espectro de RMN de ^1H do **dado**.

Pelos espectros na região do infravermelho obtidos diretamente do sólido via ATR (Figura 14 e Figura 15), observa-se o desaparecimento de bandas próprias da amina secundária da iminodibenzila (3379 cm^{-1} : estiramento N-H; 1522 cm^{-1} : *bending* N-H). Em oposição, nota-se o surgimento de bandas em 1230 cm^{-1} do estiramento do anel epóxido, e em 917 e 853 cm^{-1} da deformação do anel epóxido (Figura 15).

Figura 14: Espectro infravermelho de iminodibenzila e **dado**.

Figura 15: Espectro infravermelho de iminodibenzila e **dado**.

Através das evidências reunidas por análise elementar, RMN e infravermelho, pode-se afirmar que houve a formação do intermediário **dato**. O rendimento calculado foi de 94%.

4.1.2. Síntese dos ligantes

a) **dato-ea**

Em um balão de fundo redondo foram adicionados ~ 50 mmol (3 mL) de etanolamina (ea) e em seguida foram adicionados, lentamente e sob agitação, ~ 0,28 mmol (0,067 g) do **dato**. O sólido não se dissolveu imediatamente. A reação permaneceu em balão fechado e sob agitação à temperatura ambiente por, aproximadamente, 22 h. Ao final deste período a solução apresentou-se visualmente homogênea e com uma coloração amarelada. Foram preparadas soluções diluídas com diclorometano da reação, de **dato** e da etanolamina, sendo elas comparadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placa de sílica e hexano:acetato de etila (8:1) (Figura 16a) e diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,1) (Figura 16b) como eluentes e se observou a formação de um ponto diferente dos reagentes, quando a placa foi revelada com luz ultravioleta:

Figura 16: CCD da reação entre intermediário (**dato**) e etanolamina (ea), revelado por luz ultravioleta. Eluentes (a) Hexano:Acetato de etila (8:1) e (b) Diclorometano:Metanol:Hidróxido de amônio (9:1:0,1).

A solução final da reação entre **dado** e etanolamina foi analisada através de HPLC de fase reversa. Como fase móvel, foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O fluxo foi de 1 mL/min. O programa de gradiente foi: iniciou-se em 5% da solução B; esta porcentagem aumentou de forma que em 30 minutos alcançasse 95% de solução B, permanecendo nesta concentração por 10 minutos; por fim, o gradiente de solução B declinou para que alcançasse 5% em 5 minutos, permanecendo assim por 10 minutos (5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%).

Foram injetados 10 μ L de quatro amostras distintas: branco (somente solução B), 1 mg/mL de etanolamina, 0,25 mg/mL de **dado** e uma concentração estimada do produto da reação de 0,5 mg/mL.

Figura 17: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de etanolamina; (c) 0,25 mg/mL de **dado**; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de **dado** com etanolamina.

Pelos cromatogramas, é possível observar que existem dois picos principais na amostra de **dado**, em 19,8 e 26,3 minutos (Figura 17c). Estes dois sinais desaparecem completamente na amostra da reação, dando lugar a um único pico em 16,3 minutos (Figura 17d).

Para caracterizar o produto por espectrometria de massas, soluções foram analisadas por LC-MS. Assim como no HPLC de fase reversa, foram utilizadas duas soluções como fases móveis: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O programa de gradiente foi o mesmo utilizado anteriormente (5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%). Os comprimentos de onda utilizados foram de 210 e 280 nm e o *scan* de massas de 100 a 900 (m/z).

Figura 18: (a) cromatograma do LC-MS para **dado**; (b) espectro de massas de *.

No cromatograma do **dado** nota-se um pico bem proeminente em ~20 minutos (Figura 18a). A relação massa/carga (m/z) deste pico foi de $270,2 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 18b), o que corresponde exatamente à massa molecular do **dado** contendo uma água de hidratação.

Figura 19: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre **dado** e etanolamina; (b) espectro de massas de *.

No cromatograma do produto da reação entre o **dado** e etanolamina nota-se o desaparecimento do pico em 20 minutos e surgimento de um novo pico em 16 minutos (Figura 19a). A relação massa/carga (m/z) deste pico foi de $313,2 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 19b), o que corresponde exatamente à massa do produto esperado (Figura 20).

Figura 20: Estrutura de **dado-ea**.

Para purificar este composto, procedeu-se a um HPLC preparativo. Novamente foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O fluxo foi de 10 mL/min e o programa de gradiente utilizado foi o seguinte: iniciou-se em 5% da solução B, permanecendo assim por 10 minutos; esta porcentagem aumentou de forma que em 60 minutos alcançasse 95% de solução B, permanecendo nesta concentração por 10 minutos (5% (solução B) $\xrightarrow{10'}$ 5% $\xrightarrow{60'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95%).

Foram injetados 1200 μ L (400 μ L do produto da reação, o que equivaleria a 100 mg de **dado-ea**, e 800 μ L da solução A). Acompanhou-se a separação através do registrador, coletando-se amostras a cada pico que surgia.

Após o registro do pico de maior intensidade, amostras foram coletadas. Tais amostras foram reunidas e a mistura final liofilizada, obtendo aproximadamente 47 mg de um sólido levemente amarelado. Conforme dito anteriormente, injetou-se uma amostra que equivaleria a 100 mg de ligante, portanto o rendimento obtido foi de 47 %.

Uma amostra deste sólido foi solubilizada em diclorometano e analisada por LC-MS, conforme procedimento anterior.

Figura 21: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.

Observa-se através da separação cromatográfica que há somente um pico em ~17 minutos (Figura 21). O espectro de massas indicou que a massa do componente que deu este sinal era 313,1 g.mol⁻¹. Portanto, através deste resultado, há fortes indícios que o sólido obtido através do HPLC preparativo era o produto esperado, o ligante **dado-ea**.

Uma pequena amostra foi analisada por espectroscopia no infravermelho. Comparando o resultado obtido com o espectro obtido anteriormente do **dado** (Figura 22 e Figura 23), nota-se o pronunciamento de um pico em 798 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas e a formação de uma banda pequena em 1012 cm⁻¹ e uma banda grande em 1184 cm⁻¹, referentes também ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas e ao estiramento C-O de álcoois. Também se observou o surgimento de uma banda bem larga entre 3500 e 2400 cm⁻¹ característica de estiramento N-H de aminas secundárias e o desaparecimento das bandas relativas ao estiramento assimétrico e simétrico do anel epóxido do **dado**, em 853 e 1230 cm⁻¹, respectivamente [Silverstein, 2005].

Figura 22: Espectro infravermelho do intermediário **dado** e do ligante **dado-ea**.

Figura 23: Espectro infravermelho do intermediário **dado** e do ligante **dado-ea**.

Através das evidências apresentadas, pode-se assumir que a síntese do ligante “**dado-ea**”, formado entre a reação de **dado** e etanolamina, foi bem-sucedida.

b) dado-en

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se ~ 45 mmol (3 mL) de etilenodiamina (en) recém destilada e em seguida adicionou-se, lentamente e sob agitação, ~ 0,2 mmol (0,050 g) do intermediário (**dado**). O sólido se dissolveu imediatamente. A reação permaneceu fechada e sob agitação à temperatura ambiente por cerca de 20 h. A solução apresentou-se do começo ao fim visualmente homogênea, translúcida e com uma coloração amarelada. Foram preparadas soluções diluídas em diclorometano da reação, do **dado** e da etilenodiamina, sendo elas comparadas através de cromatografia por camada delgada (CCD) utilizando placa de sílica e hexano:acetato de etila (8:1) (Figura 24a) e diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,1) (Figura 24b) como eluentes e se observou a formação de um ponto diferente dos reagentes, quando a placa foi revelada com luz ultravioleta:

Figura 24: CCD da reação entre **dado** e etilenodiamina, revelada por luz ultravioleta. Eluentes (a) hexano:acetato de etila (8:1) e (b) diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,1).

A solução final da reação entre **dado** e etilenodiamina foi analisada através de HPLC de fase reversa. Como fase móvel, foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA

(ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura a um fluxo de 1 mL/min. O programa de gradiente foi igual ao utilizado para o **dado-ca** (5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%).

Foram injetados 10 µL de quatro amostras diferentes: branco (somente solução B), 1 mg/mL de etilenodiamina, 0,25 mg/mL de **dado** e uma concentração estimada do produto da reação de 0,5 mg/mL.

Figura 25: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de etilenodiamina; (c) 0,25 mg/mL de **dado**; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de **dado** com etilenodiamina.

Pelos cromatogramas, é possível observar que existem dois picos principais na amostra de **dado**, em 19,8 e 26,3 minutos (Figura 25c). Estes dois sinais desaparecem completamente na amostra da reação, dando lugar a um único pico em 15,1 minutos (Figura 25d).

Para caracterizar o produto formado na reação por espectrometria de massas, soluções foram analisadas por LC-MS. Assim como no HPLC de fase reversa, foram utilizadas duas soluções como fase móvel: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O programa de gradiente novamente foi 5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%. Os comprimentos de onda utilizados foram de 210 e 280 nm e o scan de massas de 100 a 900 g.mol^{-1} .

Figura 26: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre **dado** e etilenodiamina; (b) espectro de massas de *.

No cromatograma do produto da reação entre o **dado** e etilenodiamina nota-se o desaparecimento do pico em 20 minutos e surgimento de um novo pico em 15 minutos

(Figura 26a). A relação massa/carga (m/z) deste pico foi de 312,2 g.mol^{-1} (Figura 26b), o que corresponde exatamente a massa do produto esperado (Figura 27).

Figura 27: Estrutura de **dado-en**.

Para purificar este composto, procedeu-se a um HPLC preparativo. Novamente foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O fluxo foi de 10 mL/min e o programa de gradiente utilizado foi o seguinte: iniciou-se em 5% da solução B, permanecendo assim por 10 minutos; esta porcentagem aumentou de forma que em 60 minutos alcançasse 95% de solução B, permanecendo nesta concentração por 10 minutos (5% (solução B) $\xrightarrow{10'}$ 5% $\xrightarrow{60'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95%).

Foram injetados 1200 μL (400 μL do produto da reação, o que equivaleria a 100 mg de **dado-en**, e 800 μL da solução A). Acompanhou-se a separação através do registrador, coletando-se amostras a cada pico que surgia (Figura 28).

Figura 28: Cópia do registro digitalizado do HPLC preparativo.

Amostras de quando o registrador indicou o pico de maior intensidade foram coletadas em três erlenmeyers (denominados 1, 2 e 3). Amostras destes três erlenmeyers foram analisadas por HPLC de fase reversa, conforme feito anteriormente (Figura 29).

Figura 29: Análise por HPLC de fase reversa das amostras recolhidas durante HPLC preparativo de **dato-en**: (a) erlenmeyer 1; (b) erlenmeyer 2; (c) erlenmeyer 3.

Conforme pode ser observado na Figura 29, o conteúdo dos três erlenmeyers teve um tempo de retenção similar ao produto esperado, o **dato-en**.

O conteúdo dos três erlenmeyers foram reunidos e a mistura final liofilizada, obtendo-se aproximadamente 31 mg de um sólido levemente amarelado. Conforme dito anteriormente, injetou-se uma amostra que equivaleria a 100 mg de ligante, portanto o rendimento obtido foi de 31 %.

Uma amostra deste sólido foi solubilizada em diclorometano e analisada por LC-MS, conforme procedimento anterior.

Figura 30: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.

Observa-se através da separação cromatográfica que há somente um pico em ~15 minutos (Figura 30a). O espectro de massas indicou que a massa do componente que deu este sinal era 312,2 g.mol⁻¹, o que indica que o sólido obtido através do HPLC preparativo era o produto esperado, o ligante **dado-en**.

Uma pequena amostra foi analisada por espectroscopia no infravermelho. Comparando o resultado obtido com o espectro obtido anteriormente do **dado** (Figura 31), nota-se o pronunciamento de um pico em 796 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas, o surgimento de alguns picos próximos a 1651 cm⁻¹ referentes ao *scissoring* das ligações N-H de aminas primárias e a formação de uma banda pequena em 1012 e uma banda grande em 1184 cm⁻¹, referentes também ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas e ao estiramento C-O de álcoois. Também se observou o desapare-

cimento das bandas relativas ao estiramento assimétrico e simétrico do anel epóxido do **dado**, em 853 e 1230 cm^{-1} , respectivamente [Silverstein, 2005].

Figura 31: Espectro infravermelho do **dado** e do ligante **dado-en**.

Através dos resultados apresentado, pode-se supor que a síntese do ligante “**dado-en**”, formado entre a reação de **dado** e etilenodiamina, foi bem-sucedida.

c) dado-dien

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se ~0,28 mmol (3 mL) de dietilenotriamina (dien) e em seguida adicionou-se, lentamente e sob agitação, ~ 0,2 mmol (0,05 g) do intermediário. O sólido se dissolveu completamente em cerca de 10 minutos. A reação permaneceu fechada e sob agitação à temperatura ambiente por cerca de 21 h. A solução final apresentou-se visualmente homogênea e com uma coloração amarelada. Foram preparadas soluções diluídas em diclorometano da reação, do **dado** e da etanolamina, sendo elas compa-

radas através de CCD utilizando placa de sílica e hexano:acetato de etila (8:1) (Figura 32a) e diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,1) (Figura 32b) como eluentes e se observou a formação de um ponto diferente dos reagentes, quando a placa foi revelada com luz ultravioleta:

Figura 32: CCD da reação entre **dado** e dietilenotriamina. Eluentes (a) Hexano:Acetato de etila (8:1) e (b) Diclorometano:Metanol:Hidróxido de amônio (9:1:0,1).

A solução final da reação entre **dado** e dietilenotriamina foi analisada através de HPLC de fase reversa. Como fase móvel, foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O fluxo foi de 1 mL/min. O programa de gradiente foi: iniciou-se em 5% da solução B; esta porcentagem aumentou de forma que em 30 minutos alcançasse 95% de solução B, permanecendo nesta concentração por 10 minutos; por fim, o gradiente de solução B declinou para que alcançasse 5% em 5 minutos, permanecendo assim por 10 minutos (5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%).

Foram injetados 10 μ L de quatro amostras diferentes: branco (somente solução B), 1 mg/mL de dietilenotriamina, 0,25 mg/mL de **dado**, e uma concentração estimada do produto da reação de 0,5 mg/mL.

Figura 33: Cromatogramas de HPLC em fase reversa de (a) branco (solução B); (b) 1 mg/mL de dietilenotriamina; (c) 0,25 mg/mL de **dado**; e (d) 0,5 mg/mL do produto da reação de **dado** com dietilenotriamina.

Pelos cromatogramas, é possível observar que existem dois picos principais na amostra de **dado**, em 19,8 e 26,3 minutos (Figura 33c). Estes dois sinais desaparecem completamente na amostra da reação, dando lugar a dois picos em 15,0 e 15,5 minutos (Figura 33d).

Para caracterizar o produto através de espectrometria de massas, soluções foram analisadas por LC-MS. Assim como no HPLC de fase reversa, foram utilizadas duas soluções como fase móvel: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O programa de gradiente foi o mesmo utilizado anteriormente (5% (solução B) $\xrightarrow{30'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95% $\xrightarrow{5'}$ 5% $\xrightarrow{10'}$ 5%). Os comprimentos de onda utilizados foram de 210 e 280 nm e o scan de massas de 100 a 900 g.mol⁻¹.

O cromatograma do **dato** já foi visto na Figura 18.

Figura 34: (a) cromatograma do LC-MS para o produto da reação entre **dado** e dietilenotriamina; (b) espectro de massas de *; (c) espectro de massas de †.

No cromatograma do produto da reação entre **dado** e dietilenotriamina nota-se o desaparecimento do pico em 20 minutos e surgimento de dois novos picos bem próximos entre 14,5 e 15,5 minutos (Figura 34a). A relação massa/carga (m/z) destes dois picos foi de 355,3 (Figura 34b), o que corresponde exatamente a massa do produto esperado (Figura 35).

Figura 35: Estrutura de **dado-dien**.

Para purificar este composto, procedeu-se a um HPLC preparativo. Novamente foram utilizadas duas soluções: solução A – 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água ultrapura; solução B – 80% ACN (acetonitrila) e 0,09% TFA em água ultrapura. O fluxo foi de 10 mL/min e o programa de gradiente utilizado foi o seguinte: iniciou-se em 5% da solução B, permanecendo assim por 10 minutos; esta porcentagem aumentou de forma que em 60 minutos alcançasse 95% de solução B, permanecendo nesta concentração por 10 minutos (5% (solução B) $\xrightarrow{10'}$ 5% $\xrightarrow{60'}$ 95% $\xrightarrow{10'}$ 95%).

Foram injetados 1200 μL (350 μL do produto da reação, o que equivaleria a 100 mg de **dado-dien**, e 850 μL da solução A). Acompanhou-se a separação através do registrador, coletando-se amostras a cada pico que surgia.

Após o registro do pico de maior intensidade, amostras foram coletadas. Tais amostras foram reunidas e a mistura final liofilizada, obtendo aproximadamente 95 mg de um sólido levemente amarelado. Conforme dito anteriormente, injetou-se uma amostra que equivaleria a 100 mg de ligante, portanto o rendimento obtido foi de 95 %.

Uma amostra deste sólido foi solubilizada em diclorometano e analisada por LC-MS, conforme procedimento anterior.

Figura 36: (a) cromatograma do LC-MS para a amostra obtida pelo HPLC preparativo; (b) espectro de massas de *.

Observa-se através da separação cromatográfica que há somente um pico em ~15,5 minutos (Figura 36). O espectro de massas indicou que a massa do componente que deu este sinal era $355,3 \text{ g.mol}^{-1}$. Portanto, através deste resultado, há fortes indícios que o sólido obtido através do HPLC preparativo era o produto esperado, o ligante **dado-dien**.

Uma pequena amostra foi analisada por espectroscopia no infravermelho. Comparando o resultado obtido com o espectro obtido anteriormente do **dado** (Figura 37), nota-se o pronunciamento de um pico em 796 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas, o surgimento de alguns picos próximos a 1651 cm^{-1} referentes ao *scissoring* das ligações N-H de aminas primárias e a formação de uma banda pequena em 1008 e uma banda grande em 1180 cm^{-1} , referentes também ao estiramento da ligação N-C em aminas secundárias alifáticas e ao estiramento C-O de álcoois. Também se observou o desapare-

cimento das bandas relativas ao estiramento assimétrico e simétrico do anel epóxido do **dado**, em 853 e 1230 cm^{-1} , respectivamente [Silverstein, 2005].

Figura 37: Espectro infravermelho do **dado** e do ligante **dado-dien**.

Através dos resultados apresentado, pode-se assumir que a síntese do ligante “**dado-dien**”, formado entre a reação de **dado** e dietilenotriamina, foi bem-sucedida.

4.1.3. Lipofilicidade

Devido à quantidade limitada de material obtido nas purificações descritas anteriormente impossibilitando a realização de experimentos, optou-se por realizar uma simulação computacional da lipofilicidade dos ligantes sintetizados, baseados em sua estrutura proposta. Também foram acrescentados os valores teóricos para os complexos formados entre estes ligantes e o Cu(II) , cujas formações serão descritas nos tópicos subsequentes.

Para o cálculo do coeficiente de partição (Tabela 2), considerou-se o “método padrão ChemAxon” do software Marvin Sketch e a concentração tanto de cátions (na forma de Na^+ e K^+) quanto de ânions (como Cl^-) igual a 0,1 mol/L. Este método é baseado no modelo publicado por Viswanadhan *et al* [ChemAxon, 2016; Viswanadhan, 1989]. Neste método, considera-se as contribuições de todos os átomos para gerar um coeficiente de partição da molécula. Esta metodologia fornece uma boa estimativa da lipofilicidade de uma molécula, auxiliando no planejamento de desenvolvimentos futuros.

Tabela 2: Valores de log P obtidos por simulação computacional.

Composto	log P (este trabalho)	log P (literatura)	Referência
Iminodibenzila	3,73	3,8	[NCBI, 2016]
Etilenodiamina	-1,40	-2	[NCBI, 2016]
Dietilenotriamina	-1,79	-2,1	[NCBI, 2016]
Etanolamina	-1,36	-1,3	[NCBI, 2016]
dado	3,70	3,90	[RSC, 2016]
dado-en	2,13	-	-
dado-dien	1,75	-	-
dado-ea	2,18	-	-
$[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$	5,44	-	-
$[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$	4,68	-	-
$[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$	2,48	-	-

Quando comparados os valores obtidos pelo software com aqueles encontrados na literatura, nota-se uma equivalência considerável concluindo-se que, efetivamente, os cálculos feitos podem ser utilizados como uma boa aproximação.

Através dos valores obtidos, é possível observar que a ligação das aminas ao **dado** fez com que diminuísse o seu caráter hidrofóbico, porém ele continuou elevado (aproximadamente centenas de vezes mais solúveis em meio orgânico do que em meio aquoso). Essa queda pode ser relacionada ao aumento da polaridade nas moléculas quando inseridos os grupos nitrogenados e do aumento da interação com soluções aquosas, através da formação de ligações de hidrogênio. Entretanto, quando se forma o complexo com Cu(II), a hidrofobicidade aumenta consideravelmente, chegando na faixa de dezenas de milhares de vezes mais solúvel

em meio orgânico, com o log P de $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$, por exemplo, sendo igual a 5,44. Este resultado era esperado, pois na formação dos complexos as aminas se ligarão ao cobre, ficando exposta a região hidrofóbica da molécula, constituída dos anéis tricíclicos.

A absorção de um fármaco via oral, através do trato gastrointestinal, está diretamente relacionada à lipofilidade, até valores de $\log P = 3,5$. Entretanto, quando a lipofilicidade é muito elevada, a permeabilidade transepitelial do intestino pode ser prejudicada [Wils, 1994]. Segundo esses autores, para valores de log P acima de 3,5, as moléculas passam a ter dificuldade em atravessar este tecido. No caso deste trabalho, isso faria dos compostos $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ candidatos ruins para uma possível aplicação oral.

4.1.4. Formação e análise dos complexos com ferro e cobre

Qualitativamente observou-se que, quando adicionadas algumas gotas de solução aquosa de Cu(II) em pequenas amostras dos ligantes obtidos anteriormente, ocorria uma alteração na cor da solução. Porém, ao serem adicionadas soluções aquosas de Fe(II) ou Fe(III), não havia nenhuma alteração visualmente perceptível.

a) Espectrofotometria ultravioleta-visível

Foram preparadas soluções 50 mM de **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** em HBS:DMSO (1:1) e 100 mM de Fe(II), Fe(III) e Cu(II) em água deionizada.

Em uma microplaca de quartzo de 96 poços foram adicionadas quantidades suficientes das soluções anteriores de maneira a preparar 200 μL de soluções 10 mM dos ligantes, dos íons metálicos e de mistura entre ligantes e metais, diluídos com HBS:DMSO (1:1). Fez-se varredura das soluções na microplaca de 300 a 1000 nm no equipamento SpectraMax.

Nota-se na Figura 38, Figura 39 e Figura 40 que as soluções de ligantes, íons metálicos e o possível produto da complexação com Fe(II) e Fe(III) não apresentaram bandas de

absorção. Entretanto, para a solução de cobre e as soluções contendo ligante e cobre, houve bandas de absorção distintas (Figura 41).

Figura 38: Espectro eletrônico de solução 10 mM dos ligantes **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** em HBS/DMSO (1:1).

Figura 39: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** na presença de cátion Fe(III) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).

Figura 40: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** na presença de cátion Fe(II) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).

Figura 41: Espectro eletrônico de soluções 10 mM dos ligantes **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** na presença de cátion Cu(II) e deste sozinho em HBS/DMSO (1:1).

Como é possível observar na Figura 41, ocorre um deslocamento hipsocrômico nos complexos, conforme a alteração dos constituintes dos ligantes. Enquanto para a solução de Cu^{2+} o $\lambda_{\text{máx}}$ é igual a 812 nm, para os complexos formados entre o íon metálico e os ligantes

dado-ea, **dado-en** e **dado-dien** os $\lambda_{\text{máx}}$ são 776, 748 e 648 nm, respectivamente. A diferença entre esses três ligantes é q no **dado-ea** tem-se uma amina e uma hidroxila que podem se ligar ao metal, no **dado-en** há duas aminas e no **dado-dien** três aminas. Este aumento na quantidade de grupos amino dos ligantes pode explicar o deslocamento observado.

Com o objetivo de tentar elucidar em qual razão molar os ligantes e o Cu(II) se ligam, fez-se uma titulação espectrofotométrica. Em uma microplaca de quartzo de 96 poços foi adicionada solução suficiente para que em 200 μL houvesse uma concentração 10 mM de Cu(II) e concentrações variando entre 0, 5, 10, 15, 20 e 30 mM dos ligantes. Em seguida, fez-se a varredura entre 400 e 1000 nm da microplaca. Considerando a absorção nos $\lambda_{\text{máx}}$ de cada complexo, foi elaborada a Figura 42, onde nota-se que o máximo de absorção para o ligante **dado-ea** ocorre quando ele está em uma relação molar 1:1 com íons Cu(II). No caso do **dado-en** e do **dado-dien**, esse máximo ocorre quando a relação molar é 1:2, metal:ligante. Nessa titulação, mantiveram-se os comprimentos de onda em que ocorre o máximo de absorção, conforme constatado anteriormente na Figura 41.

b) Medidas de estabilidade relativa

Em uma microplaca de 96 poços foram acrescentadas soluções 2 μM de complexo calceína-ferro (CAFe) ou calceína-cobre (CACu) na presença de soluções cuja concentração variou de 0 a 4 μM para o ligante desferrioxamina (dfo) ou 0 a 50 μM para os ligantes ea, en, dien, **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**, diluídos com HBS/DMSO (1:1) até completar volume final de 200 μL em cada poço. Esta microplaca foi levada para um leitor de microplacas, onde as soluções foram excitadas a 485 nm e lidas a 525 nm.

Figura 42: (acima) Espectros eletrônicos de Cu(II) 10 mM tratado com concentrações crescentes de ligantes em HBS/DMSO 1:1. (abaixo) Razão molar ligante:metal pela razão da absorbância obtida no comprimento de onda máximo específico de cada ligante (**dado-ea** 776 nm; **dado-en** 748 nm; **dado-dien** 648 nm).

Através das leituras de fluorescência foram obtidos os seguintes gráficos:

Figura 43: Estudo da estabilidade do complexo CAFE 2 µM frente o aumento da concentração do ligante desferrioxamina (**dfo**).

Figura 44: Estudo da estabilidade do complexo CAFE 2 µM frente o aumento da concentração dos ligantes etanolamina, etilenodiamina, dietilenotriamina, **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**.

Figura 45: Estudo da estabilidade do complexo CACu 2 μM frente o aumento da concentração do ligante desferrioxamina (dfo).

Figura 46: Estudo da estabilidade do complexo CACu 2 μM frente o aumento da concentração dos ligantes etanolamina, etilenodiamina, dietilenotriamina, **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**.

Nota-se no gráfico da Figura 43 que quando a relação molar entre CAFE e dfo é 1:1 a fluorescência da calceína atinge o valor máximo, indicando que neste ponto a desferrioxamina já sequestrou todo o ferro que estava ligado ao indicador fluorimétrico. Sabe-se que a desferrioxamina rapidamente oxida o Fe^{2+} para Fe^{3+} [Espósito, 2002b] e a estabilidade do dfo com este estado de oxidação do ferro é bem maior do que a calceína, conforme pode ser constatado pelas constantes de afinidade apresentadas na Tabela 3. Esta maior estabilidade pode ser explicada, entre outras coisas, devido ao ligante dfo ser hexadentado e a calceína ser tetradentada.

Comparando com os ligantes ea, en, dien, **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**, no gráfico da Figura 44, a fluorescência teve pequenas flutuações, porém permaneceu praticamente inalterada mesmo numa relação CAFE e ligante 1:25. Isso indica que os ligantes ea, en, dien e os seus derivados que foram sintetizados **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** não possuem uma afinidade com o ferro suficiente para competir com a calceína pela complexação deste íon metálico. Uma outra explicação é que a reação de substituição do ligante poderia até ser termodinamicamente viável, mas com uma cinética muito lenta, e o tempo entre a preparação das soluções e a leitura da fluorescência no equipamento (intervalo aproximado de 30 min) não foi suficiente para que ocorresse a troca.

Ao contrário do que acontece com o ferro, no intervalo de tempo do experimento a desferrioxamina não competiu com a calceína pelo íon Cu(II) , como pode ser observado no gráfico da Figura 45, em que não há nenhuma variação na fluorescência medida, mesmo quando o dfo está com sua concentração dobrada em relação à calceína. Apesar da constante de afinidade do complexo $[\text{Cu(dfo)}]$ ser um pouco maior do que o do CACu (Tabela 3), no ambiente de coordenação com a calceína o íon de Cu(II) já está complexado em estrutura tetraédrica com os elétrons dos quatro oxigênios que constituem os dois grupos carboxilato da calceína. Como já citado no parágrafo anterior, provavelmente se fosse dado maior tempo

para a reação entrar em equilíbrio, seria observado um ligeiro aumento da fluorescência do meio reacional.

Em relação aos outros ligantes, é possível observar no gráfico da Figura 46 que, como esperado, tanto o **dien** quanto o **dado-dien** apresentaram afinidade significativa pelo cobre(II), embora a presença do ambiente volumoso proporcionado pela iminodibenzila ligada ao dien de alguma forma diminuiu a afinidade ou dificultou o equilíbrio na competição pelo metal. Isto também poderia explicar porque o ligante em livre apresentou uma grande afinidade pelo cobre, enquanto o mesmo não foi observado para o **dado-en**.

Para o **dado-dien** (L), têm-se os seguintes equilíbrios (Equação 4, Equação 5 e Equação 6):

onde K_{CACu} é a constante de ligação condicional de CACu a pH 7 (2.0×10^{12} M [Saari, 1984]) e K_{app} é a constante de ligação condicional para a formação de $\text{Cu}(\text{bado-dien})_2$.

A expressão para K é dada pela Equação 7:

$$\text{Equação 7:} \quad K = \frac{[\text{CA}][\text{CuL}_2]}{[\text{CACu}][\text{L}]^2}$$

De acordo com a Figura 46, para $[\text{bado-dien}] = 13.4 \mu\text{M}$ há 50% de recuperação da fluorescência, indicando que metade da calceína está ligada ao cobre e, então, $[\text{CA}] = [\text{CA-Cu}]$. Portanto, metade ($1 \mu\text{M}$) do cobre original está complexado com o **bado-dien**. A substituição destas informações na Equação 7 resulta em $K = 5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, que pode ser usada para estimar $\log K_{\text{app}}$ (Equação 5) como 16. Esta constante de formação aparente é inferior à constante termodinâmica, uma vez que tem o efeito da salinidade e do tampão. Estas figuras indicam que **bado-dien** poderia ser adequado para manter o cobre fortemente ligado mesmo na

escala micromolar ($\sim 3\%$ de metal livre quando $\text{Cu}(\text{dado-dien})_2 = 1 \mu\text{M}$). Por outro lado, **da-do-en** poderia entregar Cu(II) para substratos endógenos com alta afinidade, o que poderia ser interessante para sobrecarregar os organismos alvo com este potencialmente tóxico íon. Este sequestro dos cátions metálicos pelos ligantes dfo, no caso do ferro, e dien, no caso do cobre, demonstra que estes complexos formados são bem estáveis. Tais resultados de estabilização concordam com os altos valores das constantes de formação deles (Tabela 3) e também já eram esperados, pois se sabe que os ligantes hidroxamatos possuem grande afinidade por íons Fe(III) e os ligantes amino possuem grande afinidade pelo Cu(II). Esta última fica bem clara quando olhamos o decréscimo nos valores das constantes de afinidade do cobre quando complexado com dien, en e ea, sendo que a diferença entre estes ligantes é justamente possuir três, dois ou um grupos amino, respectivamente.

Tabela 3: Valores de $\log(K)$ entre cobre e ferro com os ligantes desferrioxamina, calceína, etanolamina, etilenodiamina e trietilenodiamina.

Complexo	$\log K$	Referência
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{dfo})]$	30,6	(a)
$[\text{Cu}(\text{dfo})]$	14,0	(a)
CAFe^{II}	14	(b)
CAFe^{III}	24	(b)
CACu	12,3	(c)
$[\text{Fe}(\text{en})_3]^{2+}$	9,72	(d)
$[\text{Fe}(\text{dien})_2]^{2+}$	10,53	(d)
$[\text{Cu}(\text{ea})_2]^{2+}$	9,8	(d)
$[\text{Cu}(\text{en})_2]^{2+}$	11,2	(d)
$[\text{Cu}(\text{dien})_2]^{2+}$	20,9	(d)

Referências: (a) [Kontoghiorghes, 1995]; (b) [Breuer, 1996]; (c) [Saari, 1984]; (d) [Smith, 1975].

4.1.5. Estudo da atividade pró-oxidante na presença de peróxido

Em uma microplaca de 96 poços foram acrescentadas soluções de nta, **dado-ea**, **dado-en**, **dado-dien**, Cu^{2+} , $[\text{Cu}(\text{nta})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ de forma que, em um volume final de $200 \mu\text{L}$, estes compostos estivessem numa concentração igual a $10 \mu\text{M}$. Também foi estudada uma solução de $[\text{Fe}(\text{nta})]$ como controle positivo (com-

plexo pró-oxidante) do experimento. Junto a todas essas soluções foi acrescentada uma solução de DHR em HBS/Chelex de forma que neste mesmo volume final estivesse com concentração 50 μM . Nestes meios reacionais foram acrescentadas soluções de peróxido de hidrogênio para que as concentrações finais fossem iguais a 0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM . Após preparada a microplaca, ela foi lida conforme descrito no item 3.2.8, obtendo-se os seguintes gráficos:

Figura 47: Taxa de fluorescência da sonda DHR com soluções 10 μM de nta, **dado-ea**, **dado-en**, **dado-dien**, Cu²⁺, [Cu(NTA)]⁻, [Cu(**dado-ea**)]²⁺, [Cu(**dado-en**)₂]²⁺ ou [Cu(**dado-dien**)₂]²⁺ variando a concentração de H₂O₂ de 0 a 80 μM .

Figura 48: Taxa de fluorescência inicial da sonda DHR (50 μ M) catalisada por concentração variada de H_2O_2 (0 – 80 μ M) e concentração constante dos complexos de Cu(II) (10 μ M) (u.a. = unidade arbitrária de fluorescência).

Repetiu-se o experimento descrito acima, porém mantendo a concentração final de peróxido de hidrogênio e da sonda DHR em 50 μ M e variando a concentração final dos outros compostos (metal, ligantes e complexos) em 0, 2,5 5, 10, 20 e 40 μ M.

Figura 49: Taxa de fluorescência da sonda DHR com solução 50 μM de H_2O_2 e variando a concentração de soluções de nta, **dado-ea**, **dado-en**, **dado-dien**, Cu^{2+} , $[\text{Cu}(\text{nta})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ entre 0 e 40 μM .

Figura 50: Taxa de fluorescência inicial da sonda DHR (50 μM) catalisada por concentração variada dos complexos de $\text{Cu}(\text{II})$ a uma concentração constante de 50 μM de H_2O_2 (u.a. = unidade arbitrária de fluorescência).

Nos dois experimentos, foram utilizadas condições de pseudo primeira ordem a fim de estimar as velocidades iniciais de oxidação da sonda DHR (Figura 48 e Figura 50).

No caso em que o peróxido foi mantido constante (Figura 50), nota-se que o k do metal livre e do $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$ são comparáveis (~ 6 e 9×10^4 u.a. $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectivamente), pois o ea é um quelante fraco para Cu(II). O fato deles serem maiores do que para os outros quelantes está relacionado com o potencial de redução formal do centro metálico. Cu(II) tem um E_f de +0.167 V/NHE. Entretanto, ligantes com 4 nitrogênios como en e dien apresentam um forte desdobramento do campo ligante, o que se traduz em valores de E_f mais negativos (-0.360 e -0.324 V/NHE, respectivamente) [Tabbi, 2013], resultando em uma diminuição da velocidade de formação do intermediário Cu(I)OOH quando $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ reage com peróxido [Yamamoto, 1989]. O complexo redox inativo [Cu(nta)] foi adicionado a este experimento como comparativo e, conforme esperado, ele não catalisou a oxidação do DHR a uma velocidade significativa [Portas, 2012].

Manter a concentração de todos os complexos a 10 μM e variar a concentração de peróxido de 0 a 80 μM apresentou resultados pouco expressivos (maior valor de k para o $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, aproximadamente igual a $2,5 \times 10^3$ u.a. $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), indicando que as velocidades de oxidação dependem mais da variação da concentração dos complexos metálicos do que de peróxido (Figura 48). Isto também pode sugerir que as espécies que geram oxidação são baseadas nos metais e não em espécies reativas de oxigênio (ERO) derivadas do peróxido. Este resultado é interessante, pois sabe-se que amastigotas de *Leishmania* conseguem contornar o ambiente rico em peróxido dos macrófagos [Naderer, 2008], tornando esta ferramenta de defesa ineficaz neste caso.

Somados, estes resultados indicam que os ligantes **dado-en** e **dado-dien** podem atuar como sequestrantes de íons redox-ativos e seus respectivos complexos com cobre podem agir como compostos pró-oxidantes em ambiente rico de peróxido.

4.1.6. Atividade biológica

As taxas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* que permaneceram viáveis foram calculadas, gerando os gráficos de dose resposta nas páginas seguintes (Figura 51: , Figura 52, Figura 53, Figura 54 e Figura 56). Para efeitos de comparação, os valores obtidos de densidade óptica de todos os ensaios foram normalizados considerando que, quando os compostos estavam ausentes (concentração 0 μM), as células não sofreram danos e, portanto, a viabilidade é de 100%.

A avaliação da atividade anti-parasitária dos compostos etanolamina e dietilenotriamina foi feita através da contagem do número de células íntegras após 48h, pois a mistura apresentou coloração magenta quando adicionado o Meio 199, inviabilizando a leitura espectrofotométrica da densidade óptica.

Por terem sido obtidas pequenas quantidades de materiais nas etapas anteriores de síntese e purificação, não foram realizados testes de atividade anti-leishmânia e de citotoxicidade nas concentrações mais elevadas para todos os compostos.

Figura 51: Curva dose-resposta para dien, **dado-dien**, e iminodibenzila contra promastigotas de *L. amazonensis* após exposição em concentrações variadas aos compostos.

Figura 52: Curva dose-resposta para ea, **dado-ea**, e iminodibenzila contra promastigotas de *L. amazonensis* após exposição em concentrações variadas aos compostos.

Figura 53: Curva dose-resposta para en, **dado-en**, e iminodibenzila contra promastigotas de *L. amazonensis* após exposição em concentrações variadas aos compostos.

Através das curvas representadas nas Figura 51, Figura 52 e Figura 53 foram obtidos os valores de concentração inibitória para 50% dos parasitas (IC50), apresentado na Tabela 4: Valores de IC50.

Tabela 4: Valores de IC50 obtidos para os compostos iminodibenzila, ea, **dado-ea**, en, **dado-en**, dien e **dado-dien** contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	IC50 (μM)
Iminodibenzila	107,7 ± 4,0
dien	< 3
dado-dien	> 100
ea	< 3
dado-ea	não ativo
en	< 3
dado-en	19,9 ± 2,2

Pelos valores obtidos descritos acima, nota-se que os ligantes ea, en e dien apresentaram atividade anti-leishmânia significativa ($IC_{50} < 3 \mu M$), porém eles não podem ser administrados para pacientes devido às suas toxicidades elevadas. Dentre os ligantes sintetizados neste estudo, o único que apresentou o resultado de IC_{50} em uma faixa terapeuticamente relevante foi o **dado-en** ($IC_{50} 19,9 \pm 2,2 \mu M$). Considerando este resultado, fez-se o teste de citotoxicidade para células RAW 264,7 do ligante **dado-en** comparando com a iminodibenzila. Como resultado, obteve-se a seguinte curva dose-resposta (Figura 54).

Figura 54: Curva dose-resposta avaliando a viabilidade de macrófagos RAW 264,7 quando expostos a concentrações variadas de iminodibenzila e **dado-en**.

Tabela 5: Valores de IC_{50} obtidos para os compostos iminodibenzila e o ligante **dado-en**, contra células do tipo RAW 264,7.

Composto	IC_{50} (μM)
Iminodibenzila	> 100
dado-en	> 50

Através dos valores obtidos, observa-se que o ligante **dado-en** é menos tóxico para os macrófagos RAW do que para o protozoário *L. amazonensis*. O fato de que a iminodibenzila seja significativamente pouco tóxica para *L. amazonensis* está de acordo com dados da literatura recente que apontam para a necessidade de um cloro-substituinte no anel aromático para a efetiva inibição da tripanotona redutase [O’Sullivan, 2015]. Além disso, dos três ligantes produzidos, **dado-en** é o mais semelhante à clomipramina (Figura 55); a substituição extra de –OH em **dado-ea** provoca uma queda de lipofilicidade, que é outro parâmetro crucial para a inibição da enzima tripanotona redutase [O’Sullivan, 2015]. Embora tão lipofílico como **da-do-en**, o ligante **dado-dien** é provavelmente muito volumoso para ser um inibidor eficiente.

Figura 55: Comparativo das estruturas dos ligantes deste trabalho e do inibidor da tripanotona redutase, clomipramina.

Também foram testadas as atividades anti-leishmânia e citotóxica dos complexos formado entre Cu(II) e os ligantes **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien**.

Figura 56: Curva dose-resposta dos derivados de cobre com **dado-ea**, **dado-en** e **dado-dien** contra (a) promastigotas de *L. amazonensis* e (b) macrófagos RAW 264,7.

Tabela 6: Valores de IC₅₀ (μM) obtidos para os complexos de cobre contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos RAW.

Composto	<i>L. amazonensis</i>	RAW
Cu^{2+}	74.9 ± 13.0	>50
$[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$	>100	>100
$[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$	13.7 ± 0.3	43.3 ± 9.8
$[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$	38.6 ± 7.3	>100

A adição de cobre aos ligantes aumentou ligeiramente a citotoxicidade do $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ contra os protozoários mas, mesmo assim, a IC₅₀ obtida não está numa faixa farmacológica interessante. Nos outros ligantes, não foi observada nenhuma melhora na citotoxicidade, tanto para os protozoários quanto para os macrófagos, indicando que a adição do metal não representou um ganho para os compostos testados.

5. Conclusões

Foram sintetizados derivados da iminodibenzila funcionalizados com etilenodiamina, etanolamina e dietilenotriamina, com rendimentos superiores a 94% e confirmada através de HPLC, LC-MS e espectroscopia no infravermelho.

Fez-se a avaliação da estabilidade relativa dos ligantes formados através do teste de recuperação da fluorescência da calceína. Neste teste, concluiu-se que o ligante **dado-dien** possui uma afinidade muito maior com Cu(II) do que os outros ligantes sintetizados, apesar dos outros não terem uma afinidade nula.

A formação dos complexos após adição de sulfato de cobre(II) foi acompanhada por espectroscopia no ultravioleta-visível e, por esta mesma técnica, fez-se a estimativa da relação metal:ligante, concluindo-se que os complexos formados eram $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$.

Não foi possível realizar o teste *in vitro* da lipofilicidade dos ligantes e complexos formados, porém foi feita a simulação computacional baseado nas informações acumuladas anteriormente. Nesta simulação, constatou-se que os complexos formados são todos muito lipofílicos, sendo que o logP decresce na seguinte sequência: $[\text{Cu}(\text{dado-en})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+} > [\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$.

Ensaio de atividade pró-oxidante revelaram que o complexo $[\text{Cu}(\text{dado-ea})]^{2+}$ apresentou a maior taxa de atividade pró-oxidante, sendo independente da concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional e alcançando seu limiar quando presente em concentração aproximada de 10 μM . Os outros dois complexos também apresentaram atividade pró-oxidante maiores do que para Cu(II) conforme se aumenta a concentração do peróxido e um aumento gradual parecido com o metal sozinho quando a concentração de peróxido é constante e aumenta-se a concentração de compostos. Apenas o $[\text{Cu}(\text{dado-dien})_2]^{2+}$ que apresentou um aumento praticamente linear neste último caso.

Quando promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram expostos a concentrações variadas dos compostos deste estudo, observou-se que os ligantes ea, en e dien tiveram os menores valores de IC₅₀ (todos < 3 µM), porém a alta toxicidade deles inviabilizaria a utilização como fármacos. Dentre os ligantes sintetizados, somente o **dado-en** apresentou um resultado numa faixa viável (IC₅₀ 19,9 ± 2,2 µM). Da mesma forma, este ligante e a iminodibenzila foram testados com macrófagos RAW 264,7, observando-se que o **dado-en** apresentou IC₅₀ > 50 µM neste caso, ou seja, ele é mais tóxico para o protozoário do que para os macrófagos. A complexação com cobre não representou um aumento na atividade dos complexos, mas pode ser interessante para diminuir os efeitos colaterais dos ligantes.

Desta forma, o conjunto de resultados apresentados neste estudo indicam um potencial uso do composto **dado-en** no combate à leishmaniose, sendo necessário maiores estudos, como por exemplo, testes com a forma amastigota do protozoário, além de testes em outras espécies de *leishmania*.

6. Bibliografia

- [Ali, 2003] Ali, A., Zhang, Q., Dai, J. e Huang, X. *Calcein as a fluorescent iron chemosensor for the determination of low molecular weight iron in biological fluids*. *Biometals* (2003) **16**, 285-293.
- [Amaral, 2008] Amaral, S. e Espósito, B.P. *Fluorimetric study of the pro-oxidant activity of EUK 8 in the presence of hydrogen peroxide*. *Biometals* (2008) **21**, 425-432.
- [Andrews, 2011] Andrews, P.C., Frank, R., Junk, P.C., Kedzierski, L., Kumar, I., MacLellan, J.G. *Anti-Leishmanial activity of homo- and heteroleptic bismuth(III) carboxylates*. *J. Inorg. Biochem.* (2011), **105**, 454-461.
- [Arruda, 2005] Arruda, D.C., D’Alexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B., *Antileishmanial activity of the terpene nerolidol*. *Antimicrob Agents Chemother* (2005), **49**, 1679–1687.
- [Ashutosh, 2007] Ashutosh, Sundar, S., Goyal, N. *Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania*. *J. of Med. Microbiol.* (2007), **56**, 143-153.
- [ATCC, 2016] American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org/en/Products/All/TIB-71.aspx#generalinformation> acessado em 06 de agosto de 2016.
- [Atkins, 2010] Atkins, P.W.; Overton, T.L.; Rourke, J.P.; Weller, M.T. e Armstrong, F.A. Shriver and Atkins’ *Inorganic Chemistry*. 5ª edição, Oxford University Press, 2010.
- [Baiocco, 2011] Baiocco, P., Ilari, A., Ceci, P., Orsini, S., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Colotti, G. *Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and Leishmania infantum Proliferation*. *ACS Med. Chem. Lett.* (2011), **2**, 230–233.
- [Benítez, 2011] Benítez, J., Becco, L., Correia, I., Leal, S.M., Guiset, H., Pessoa, J.C. *et al.* *Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements*. *J. Inorg. Biochem.* (2011), **105**, 303-312.
- [Benson, 1992] Benson, T.J., McKie, J.H., Garforth, J., Borges, A., Fairlamb, A.H. Douglas, K.T., *Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase*. *Biochem. J.* (1992), **286**, 9-11.
- [Braga, 2012] Braga, S.F.P., *Síntese de inibidores potenciais da tripanotiona redutase: base para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da doença de chagas e leishmaniose*. Dissertação (mestre em ciências), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- [Breuer, 1996] Breuer, W., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I. *Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells*. *FEBS Letters* (1996), **382**, 304-308.

- [**Carmo, 2011**] Carmo, A.M.L., Silva, F.M.C., Machado, P.A., Fontes, A.P.S., Pavan, F.R., Leite, C.Q.F., Leite, S.R. de A., Coimbra, E.S., da Silva, A.D. *Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents*. Biomed. Pharmacother. (2011), **65**, 204-209.
- [**CDC, 2015**] Centers for Disease Control and Prevention, em português Centros para Prevenção e Controle de Doenças. <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>, acessado em 03/02/2015.
- [**ChemAxon, 2016**] Documentation of the logP plugin. <https://docs.chemaxon.com/display/docs/logP+Plugin>, acessado em 13/08/2016.
- [**Esperandim, 2013**] Esperandim, V.R., Ferreira, D.S., Rezende, K.C.S., Magalhães, L.G., Souza, J.M., Pauletti, P.M. *et al. In Vitro Antiparasitic Activity and Chemical Composition of the Essential Oil Obtained from the Fruits of Piper cubeba*. Planta Med (2013), **79**, 1653-1655.
- [**Espósito, 2002a**] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Slotki, I. e Cabantchik, Z.I. *Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients*. Eur. J. Clin. Invest. (2002a), **32**, 42-49.
- [**Espósito, 2002b**] Espósito, B.P., Epsztejn, S., Breuer, W., Cabantchik, Z.I., *A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids*. Anal Biochem (2002), **304**, 1-18.
- [**Espósito, 2003**] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Hershko, C. e Cabantchik, Z.I. *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation*. Blood (2003), **102**, 2670-2677.
- [**Espósito, 2011**] Espósito, B.P. *Toxicidade de metais essenciais: os casos do ferro e do manganês*. Tese de Livre-Docência, Instituto de Química da USP, 2011.
- [**Ferreira, 2008**] Ferreira, J.G., Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade contra a doença de Chagas. Tese (doutor em ciências), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [**Forbes, 2001**] Forbes, J.R., Gros, P. *Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions*. Trends in Microbiol (2001), **9**(8), 397-403.
- [**Franco, 2013**] Franco, L.P., de Góis, E.P., Codonho, B.S., Pavan, A.L.R., Pereira, I.O., Marques, M.J., de Almeida, E.T., *Palladium(II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on Leishmania (L.) amazonenses*. Med. Chem. Res. (2013), **22**, 1049-1056.

- [Frelon, 2003] Frelon, S., Douki, T., Favier, A., Cadet, J. *Hydroxyl Radical Is Not the Main Reactive Species Involved in the Degradation of DNA Bases by Copper in the Presence of Hydrogen Peroxide* Chem. Res. Toxicol. (2003), **16**, 191–197.
- [Frieden, 1985] Frieden, E., *New Perspectives on the Essential Trace Elements*, J. Chem. Ed. (1985), **62**(11), 917 – 923.
- [Gambino, 2011] Gambino, D. *Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents*. Coord. Chem. Rev. (2011), **255**, 2193-2203.
- [Gielen, 2005] *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents*, M. Gielen and E. Tiekink, Editors. 2005, John Wiley & Sons: West Sussex, xxxvii-xxxix.
- [Halliwell, 2007] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, 2007.
- [Haughland, 2001] Haughland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Molecular Probes, Inc., 2001.
- [Huynh, 2006] Huynh, C., Sacks, D.L., Andrews, N.W. *A Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosome*. J. Exp. Med. (2006), **203**(10), 2363-2375.
- [Iniguez, 2013] Iniguez, E., Sánchez, A., Vasquez, M.A., Martínez, A., Olivas, J., Sattler, A., Sánchez-Delgado, R.A., Maldonado, R.A. *Metal–drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against Leishmania major and Trypanosoma cruzi and non-toxic to human or murine normal cells*. J. Biol. Inorg. Chem. (2013), **18**, 779–790.
- [Jacoby, 1996] Jacoby, E.M., Schlichting, I., Lantwin, C.B., Kabsch, W., Krauth-Siegel, R.L. *Crystal Structure of the Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase-Mepacrine Complex* Proteins (1996), **24**, 73-80.
- [Karplus, 1989] Karplus, P.A., Pai, E.F., Schulz, G.E., *A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution*. Eur. J. Biochem. (1989), **178**, 693-703.
- [Kontoghiorghes, 1995] Kontoghiorghes, G.J. *Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs*. Toxicol. Letters (1995), **80**, 1-18.
- [Krieger, 2000] Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M.R., Fairlamb, A.H., Krauth-Siegel, R.L., Clayton, C. *Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress*. Mol Microbiol (2000), **35**(3), 542-552.
- [Levy, 2001] Levy, O., Erez, M., Varon, D., Keinan, E., *A new class of antiarrhythmic-defibrillatory agents*. Bioorg. Med. Chem. Lett. (2001), **11**, 2921-2926.

- [**Maffei, 2009**] Maffei, R.S., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Miguel, D.C., Uliana, S.R.B., Espósito, B.P. *Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial activity of copper(II) with fluorinated α -hydroxycarboxylate ligands*. *Biometals* (2009), **22**, 1095-1101.
- [**Marquis, 2007**] Marquis, J.F., Gros, P. *Intracellular Leishmania: your iron or mine?*. *Trends in Microbiol* (2007), **15**(3), 93-95.
- [**Martínez, 2012**] Martínez, A., Carreon, T., Iniguez, E., Anzellotti, A., Sánchez, A., Tyan, M., Sattler, A., Herrera, L., Maldonado, R.A., Sánchez-Delgado, R.A. *Searching for New Chemotherapies for Tropical Diseases: Ruthenium–Clotrimazole Complexes Display High in Vitro Activity against Leishmania major and Trypanosoma cruzi and Low Toxicity toward Normal Mammalian Cells*. *J. Med. Chem.* (2012), **55**, 3867-3877.
- [**Miguel, 2008**] Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Uliana, S.R.B. *Tamoxifen is effective in the treatment of Leishmania amazonensis infections in mice*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2008), **2**(6), e249.
- [**Miguel, 2009**] Miguel, D.C., Zauli-Nascimento, R.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Katz, S., Barbiéri, C.L., Uliana, S.R.B. *Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections*. *J. Antimicrob. Chemother.* (2009), **63**, 365-368.
- [**Miguel, 2011**] Miguel, D.C., Caracterização da atividade de tamoxifeno no tratamento da Leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação. Tese (doutorado em ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- [**Mishra, 2007**] Mishra, J., Saxena, A e Singh, S. *Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future*. *Curr. Med. Chem.* (2007), **14**, 1153-1169.
- [**Naderer, 2008**] Naderer, T., McConville, M.J. *The Leishmania–macrophage interaction: a metabolic perspective*. *Cellular Microbiol.* (2008), **10**(2), 301-308.
- [**Nakamoto, 1997**] Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B*. 5 ed. 1997, New York: Wiley Interscience.
- [**Navarro, 2003a**] Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E.F., Sierralta, A., Fernández-Mestre, M., Arrieché, P.S.D., Marchán, E. *Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity*. *J. Biol. Inorg. Chem.* (2003), **8**, 401-408.
- [**Navarro, 2003b**] Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E.F., Fernández-Mestre, M., Arrieché, D., Marchán, E. *Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against Leishmania mexicana of $[Cu(dppz)_2]BF_4$* . *J. Inorg. Biochem.* (2003), **97**, 364-369.
- [**Navarro, 2007**] Navarro, M., Hernández, C., Colmenares, I., Hernández, P., Fernández, M., Sierralta, A., Marchán, E. *Synthesis and characterization of $[Au(dppz)_2]Cl_3$. DNA interaction*

studies and biological activity against Leishmania (L) Mexicana. J. Inorg. Biochem. (2007), **101**, 111-116.

[Navarro, 2008] Navarro, M., Betancourt, A., Hernández, C., Marchán, E. *Palladium Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Biological Activity on Leishmania (L.) Mexicana*. J. Braz. Chem. Soc. (2008), **19** (7), 1355-1360.

[Navarro, 2009] Navarro, M. *Gold complexes as potential anti-parasitic agentes*. Coord. Chem. Rev. (2009), **253**, 1619-1626.

[NCBI, 2016] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (acessado em 16 de julho de 2016).

[Nguewa, 2005] Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Iborra, S., Najajreh, Y., Gibson, D., Martínez, E., Alonso, C., Pérez, J.M. *Water soluble cationic trans-platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania infantum*. J. Inorg. Biochem. (2005), **99**, 727-736.

[Nobel Prize, 2016] Nobel Assembly at Karolinska Institutet. *Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015*. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/press.pdf, acessado em 07 de Agosto de 2016.

[Nogueira, 2013] Nogueira, R.C., Rocha, V.P.C., Nonato, F.R., Tomassini, T.C.B., Ribeiro, I.M., dos Santos, R.R. e Soares, M.B.P. *Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of Physalis angulata concentrated ethanolic extract*. Environ. Toxicol. and Pharmacol. (2013), **36**, 1304-1311.

[Oliveira, 2008] Oliveira, R.B., Zani, C.L., Ferreira, R.S., Leite, R.S., Alves, T.M.A., da Silva, T.H.A., Romanha, A.J. *Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase*. Quím. Nova (2008), **31**(2), 261-267.

[O'Sullivan, 2015] O'Sullivan, M. C., Durham, T. B., Valdes, H. E., Dauer, K. L., Karney, N. J., Forrestel, A. C., Bacchi, C. J., Baker, J. F. *Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities*, Bioorg. Med. Chem. (2015), **23**(5), 996-1010.

[Ouellette, 2004] Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopolou, B. *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resistance Updates (2004), **7**, 257-266.

[Paletta-Silva, 2012] Paletta-Silva, R., Vieira-Bernardo, R., Cosentino-Gomes, D., Meyer-Fernandes, J. R. *Leishmania amazonensis: Inhibition of 3'-nucleotidase activity by Cu²⁺ ions*. Exp. Parasitol. (2012), **131**, 63-68.

[Patterson, 2011] Patterson, S., Alphey, M.S., Jones, D.C., Shanks, E.J., Street, I.P., Frearson, J.A., Wyatt, P.G., Gilbert, I.H., Fairlamb, A.H. *Dihydroquinazolines as a Novel*

Class of Trypanosoma brucei Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography. J. Med. Chem. (2011), **54**, 6514-6530.

[Pierson, 2010] Pierson, J.T., Dumètre, A., Hutter, S., Delmas, F., Laget, M., Finet, J.P., Azas, N., Combes, S. *Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins*. Eur. J. Med. Chem. (2010), **45**, 864-869.

[Pinto, 2013] Pinto, E.G., Pimenta, D.C., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Tempone, A.G. *Anti-microbial peptides isolated from Phyllomedusa nordestina (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of Leishmania and Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. (2013), **135**, 655-660.

[Polonio, 2008] Polonio, T., Efferth, T. *Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review)*. Inter. J. Mol. Med. (2008), **22**, 277-286.

[Portas, 2012] Portas, A.S., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Uliana, S.R.B., Espósito, B.P. *Increasing the activity of copper(II) complexes against Leishmania through lipophilicity and pro-oxidant ability*. J. Biol. Inorg. Chem. (2012), **17**, 107-112.

[Ramírez-Macías, 2012] Ramírez-Macías, I., Maldonado, C.R., Marín, C., Olmo, F., Gutiérrez-Sánchez, R., Rosales, M.J., Quirós, M., Salas, J.M., Sánchez-Moreno, M. *In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis*. J. Inorg. Biochem. (2012), **112**, 1-9.

[Reimão, 2014] Reimão, J.Q., Miguel, D.C., Taniwaki, N.N., Trinconi, C.T., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Uliana, S.R.B. *Antileishmanial Activity of the Estrogen Receptor Modulator Raloxifene*. PLoS Negl. Trop. Dis. (2014), **8**(15), e2842.

[Roat-Malone, 2007] Roat-Malone, R.M. in *Bioinorganic chemistry: a short course*, 2nd edition, 2007, John Wiley & Sons.

[Rocha, 2010] Rocha, J.R., Planejamento de inibidores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. 2010, 201f. Tese (doutorado em ciências), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

[RSC, 2016] Royal Society of Chemistry, ChemSpider. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13271858.html> acessado em 16 de julho de 2016.

[Saari, 1984] Saari, L.A., Seitz, W.R. *Immobilized Calcein for Metal Ion Preconcentration*, Anal. Chem. (1984), **56**, 813-814.

- [**Smith, 1975**] Smith, R.M., Martell, A.E. *Critical Stability Constants- Volume 2: Amines*, Plenum Press, 1975.
- [**Silverstein, 2005**] Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7ª edição, John Wiley & Sons, 2005.
- [**Smith, 1991**] Smith, K., Opperdoes, F.R., Fairlamb, A.H., *Subcellular distribution of trypanothione reductase in bloodstream and procyclic forms of Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. (1991), **48**, 109-112.
- [**Souza, 2006**] Souza, G.F.P., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Seabra, A.B., Miguel, D.C., de Oliveira, M.G., Uliana, S.R.B. *Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against Leishmania major and Leishmania amazonensis: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis*. Nitric Oxide (2006), **15**, 209–216.
- [**Srivastava, 2016**] Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., Singh, S. *Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis* Parasites & Vectors (2016) **9**, 277-291.
- [**Tabbi, 2013**] Tabbi, G., Giuffrida, A., Bonomo, R.P. *Determination of formal redox potentials in aqueous solution of copper(II) complexes with ligands having nitrogen and oxygen donor atoms and comparison with their EPR and UV–Vis spectral features* J. Inorg. Biochem. (2013) **128**, 137-145.
- [**Tiuman, 2011**] Tiuman, T.S., Santos, A.O., Nakamura, T.U., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V. *Recent advances in leishmaniasis treatment*. Int. J. Infect. Dis. (2011), **15**, e525-e532.
- [**Trinconi, 2014**] Trinconi, C.T., Reimão, J.Q., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Miguel, D.C., Uliana, S.R.B. *Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis*. Antimicrob. Agents Chemother. (2014), **58**(5), 2608-2613.
- [**Trinconi, 2016**] Trinconi, C.T., Reimão, J.Q., Coelho, A.C., Uliana, S.R.B. *Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents Chemother. (2016), **71**(5), 1314-1322.
- [**Tronco, 2015**] Tronco, C.M.T., Tamoxifeno no tratamento de Leishmaniose: atividades em esquemas terapêuticos combinados e estudo do mecanismo de ação. Tese (doutorado em ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- [**Vieites, 2009**] Vieites, M., Smircich, P., Guggeri, L., Marchán, E., Gómez-Barrio, A., Navarro, M., Garat, B., Gambino, D. *Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol N-oxide gold(I) complex with potent antiproliferative effect against Trypanosoma cruzi and Leishmania sp. insight into its mechanism of action*. J. Inorg. Biochem. (2009), **103**, 1300-1306.

- [**Visbal, 2008**] Visbal, G., Marchán, E., Maldonado, A., Simoni, Z., Navarro, M. *Synthesis and characterization of platinum–sterol hydrazine complexes with biological activity against Leishmania (L.) Mexicana*. J. Inorg. Biochem. (2008), **102**, 547-554.
- [**Viswanadhan, 1989**] Viswanadhan, V.N., Ghose, A.K., Revankar, G.R., Robins, R.K. *Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. (1989) **29** (3), 163–172.
- [**WHO, 2014**] World Health Organization, em português Organização Mundial da Saúde. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> acessado em 02/02/2015.
- [**Wils, 1994**] Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V., Legrain, S., Scherman, D. *High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells*. J. Pharm. Exp. Ther. (1994) **269** (2), 654-658.
- [**Yamamoto, 1989**] Yamamoto, K., Kawanishi, S. *Hydroxyl free-radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper(II) ion and hydrogen-peroxide*. J of Biol. Chem. (1989). **264**(26), 15435-15440.
- [**Yan, 2005**] Yan, S., Jin, L. e Sun, H. *Antimony in medicine* in Gielen, M. ; Tieckink, E. R. T. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents – The Use of Metals in Medicine*, John Wiley & Sons Ltd, England, 2005.
- [**Zilberstein, 1984**] Zilberstein, D., Dwyer, D. M., *Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite Leishmania*, Science, 23 november 1984, 977-979.

Súmula Curricular

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Anderson Arndt

Local e data de nascimento: São Paulo/SP em 13 de maio de 1983.

2. EDUCAÇÃO

Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas na Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mestre em Ciências (área Química Inorgânica), Instituto de Química – USP, São Paulo, 2010.

3. OCUPAÇÃO ATUAL

Chefe de Serviços de Laboratório na Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), desde março de 2016.

Especialista em Produção de Hemoderivados e Biotecnologia – Controle de Qualidade na Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), desde fevereiro de 2014.

4. PUBLICAÇÕES E RESUMOS DE CONGRESSOS

- ARNDT, A., BORELLA, M.I., ESPÓSITO, B.P., *Toxicity of manganese metallodrugs toward Danio rerio*. Chemosphere (Oxford), v. 96, p. 46-50, 2013.

- ARNDT, A., ESPÓSITO, B.P., BORELLA, M.I., Toxicidade de metalofármacos de manganês a *Danio rerio*. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - XI ECOTOX, 2010, Bombinhas. Livro de Resumos, 2010.

- SILVA, S.B.de.L., ARNDT, A., ESPÓSITO, B.P., *Trivalent Mn and Fe Complexes for the Degradation of Remazol Dyes*. Journal of Water Resource and Protection, v. 2, p. 209-213, 2010.

- ESPÓSITO, B.P.; ARNDT, A.; AMARAL, S., Fluorimetric study of the pro-oxidant activity of Mn(III) complexes. In: 38th International Conference on Coordination Chemistry, 2008, Jerusalém. Livro de Resumos, 2008.

- ARNDT, A., ESPÓSITO, B.P., Supressão de fluorescência e atividade pró-oxidativa de complexos de manganês(III). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2008.

- ARNDT, A.; VALVASSORI FILHO, A.; FRANCO, A.; PENTEADO, J.C.P.; CARVALHO, L.R.F., O que inalamos dentro de um carro novo?. In: 13 Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói. Livro de Resumos, 2005.