



Correlação entre a modificação dos ligantes X da série de complexos [Cu(IPr)X] e do complexo [Cu(IPr)₂]Y e sua atividade antileishmaniana.

Palavras-chave: Cu(I); compostos N-heterocíclicos; leishmaniose.

Autores:

Maria Eduarda Fermoselli Dei Agnoli - Instituto de Química - Unicamp

Msc. Josielle Vieira Fontes - Instituto de Química - Unicamp

Profa. Dra. Camilla Abbehausen - Instituto de Química - Unicamp

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária que acomete cerca de 1 milhão de pessoas por ano. Ela é causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN). Os parasitas são transmitidos através de flebotomíneos (mosquito palha) e assumem a forma promastigota quando entram no organismo humano. Ao entrarem em contato com os macrófagos se tornam amastigotas e multiplicam-se no interior da célula até sua ruptura e liberação para a corrente sanguínea^{1,2}.

O tratamento é de alto custo e tóxico para o organismo humano³. Dessa forma, o estudo de fármacos alvo específicos são de grande relevância na tentativa de aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade dos medicamentos.

Neste contexto, os metalofármacos são uma alternativa viável. O cobre, por exemplo, é um metal traço essencial no corpo humano, devido a sua ação antioxidante que reduz os danos causados pela presença de radicais livres. O Cu(I) é classificado como um ácido mole, podendo interagir com biomoléculas presentes no parasita que contenham resíduos de aminoácidos com bases moles (cisteína, por exemplo), alterando seus processos biológicos e levando à morte celular⁴.

É necessário, entretanto, que o centro metálico seja estabilizado em uma tentativa de diminuição de reações laterais que aumentem a toxicidade. Neste caso, os ligantes do tipo carbenos-N-heterocíclicos σ -doador contribuem para a estabilização do centro metálico, devido ao par de elétrons livres no carbono que se ligam ao Cu(I) através de uma forte ligação sigma⁵. O ligante IPr, por exemplo, estabiliza o centro metálico, tornando-se altamente eficiente na redução da formação de componentes tóxicos, além de contribuir para um melhor balanço hidrofílico/lipofílico do composto⁴.

A partir dos resultados promissores da atividade do complexo [Cu(IPr)Cl] contra promastigotas de *L. amazonenses*⁴, foram selecionados os haletos Br e I para comparação de suas atividades antileishmaniana, avaliando assim a atividade em relação a propriedades periódicas como de eletronegatividade e raio iônico.

Portanto, esse projeto propõe sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antileishmania *in vitro* dos complexos com ligantes NHC de [Cu(IPr)X] em que X= Cl, Br e I.

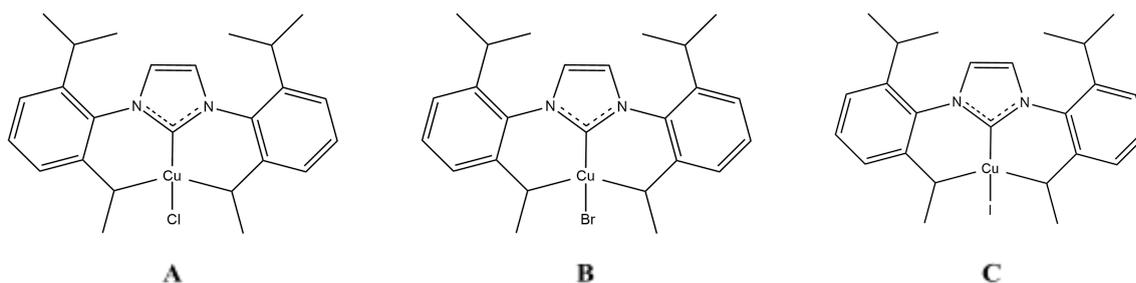


Figura 1: Complexos metálicos **A:** [Cu(IPr)Cl], **B:** [Cu(IPr)Br] e **C:** [Cu(IPr)I].

METODOLOGIA

1) Síntese do ligante cloreto de 1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)imidazólio (IPr.HCl)

A síntese foi realizada conforme método de Hans et al⁶. A primeira etapa consistiu na síntese da N,N'-bis(2,6-diisopropilfenil)etilenodiimina a partir da 2,6-diisopropilanilina, usando isopropanol como solvente. Foi preparada uma solução com glicoxal, água e isopropanol, que foi adicionada ao balão com diisopropilanilina. Após 24h a solução foi filtrada, o precipitado foi lavado com água e foi seco sob lâmpada IR.

Para sintetizar o ligante IPr.HCl foi adicionado o N,N'-bis(2,6-diisopropilfenil)etilenodiimina e paraformaldeído a acetato de etila à 70°C sob agitação constante. Após 45 min de agitação vigorosa, uma solução de clorotrimetilsilano em acetato de etila foi adicionada. Após agitação constante por 2h a 70°C, a solução foi mantida na geladeira durante a noite a 6°C. A suspensão foi filtrada e o precipitado foi lavado com acetato de etila e dietiléter. Seco em lâmpada IR até a obtenção do produto como um sólido branco.

2) Síntese dos complexos de Cu(I) carbenos-N-heterocíclicos [Cu(IPr)X] (X = Cl, Br e I)

A síntese foi realizada conforme método de Santoro et al⁷. Em um Schlenk foi adicionado IPr.HCl (1equiv), CuX (1 equiv) e K₂CO₃ (2 equiv). A mistura foi dissolvida em acetona e mantida em agitação constante a 60°C por 24h. A solução foi filtrada em sílica e extraída com diclorometano. O solvente foi concentrado em rotaevaporador e foi adicionado pentano para a precipitação do produto final, que foi lavado com pentano e seco a vácuo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

1) Caracterização

Através das técnicas de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e análise elementar podemos comprovar a formação dos complexos de interesse de cloro, bromo e iodo.

a) Análise elementar - CHN

A tabela 1 mostra os resultados obtidos pela análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio e os valores calculados dos compostos [Cu(IPr)X]. A partir dos resultados confirmamos a proporção de 1:1 metal/ligante nos complexos, confirmando a composição C₂₇H₃₆N₂CuX (X = Cl, Br e I).

Tabela 1: Cálculo teórico e resultado experimental da análise de CHN

Composto	Elemento	C	Erro	H	Erro	N	Erro
[Cu(IPr)Cl]	Calculado	66,56	0,12%	7,45	0,35%	5,75	0,05%
	Experimental	66,68		7,10		5,80	
[Cu(IPr)Br]	Calculado	61,06	1,0%	6,83	0,13%	5,27	0,07%
	Experimental	62,06		6,70		5,34	
[Cu(IPr)I]	Calculado	56,00	0,14%	6,26	0,25%	4,84	0,03%
	Experimental	55,86		6,01		4,81	

RMN de ^1H e ^{13}C

A partir do RMN de ^1H foi possível confirmar a formação da ligação C-Cu (figura 3), e portanto, a formação dos complexos $[\text{Cu}(\text{IPr})\text{X}]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ e I). A complexação do metal é observada devido a ausência do hidrogênio ligado ao carbono do anel de imidazol no espectro, pico característico por ser o mais deslocado no espectro do ligante IPr.HCl (figura 2).

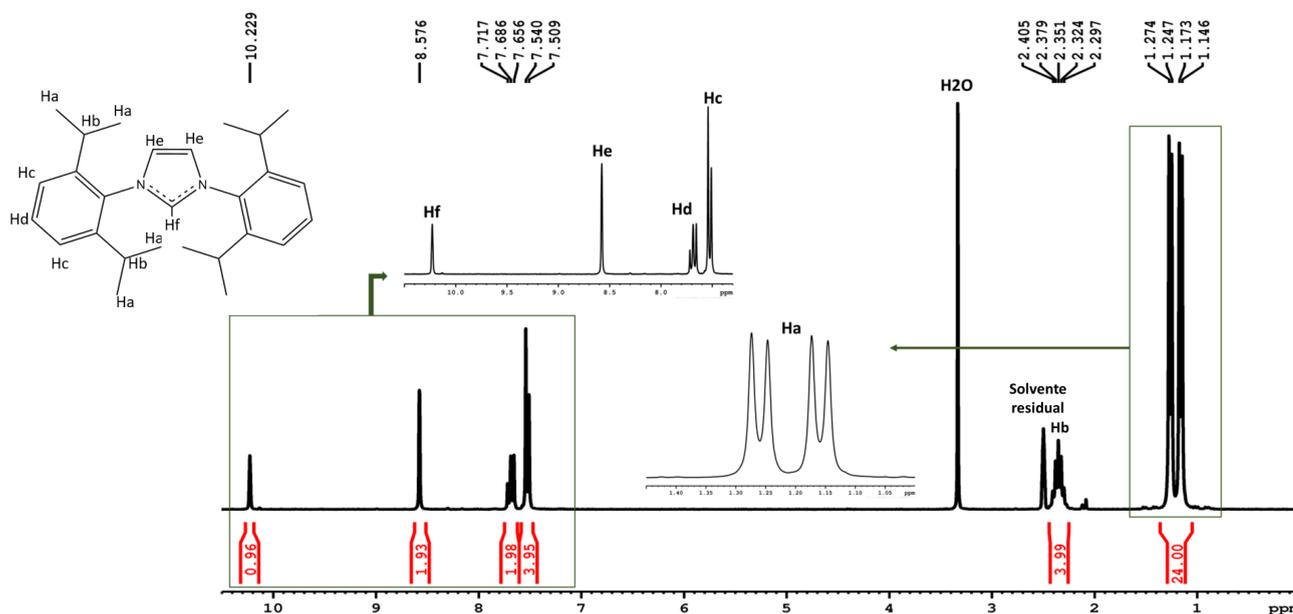


Figura 2: Espectro de RMN de ^1H do ligante IPr.HCl feito em DMSO- d_6 , 250 MHz. O pico em 2,50 e 3,33 ppm correspondem, respectivamente, ao solvente e à água. Notamos que o pico mais deslocado, em 10,23 ppm, indica o hidrogênio ligado ao carbono do anel de imidazol.

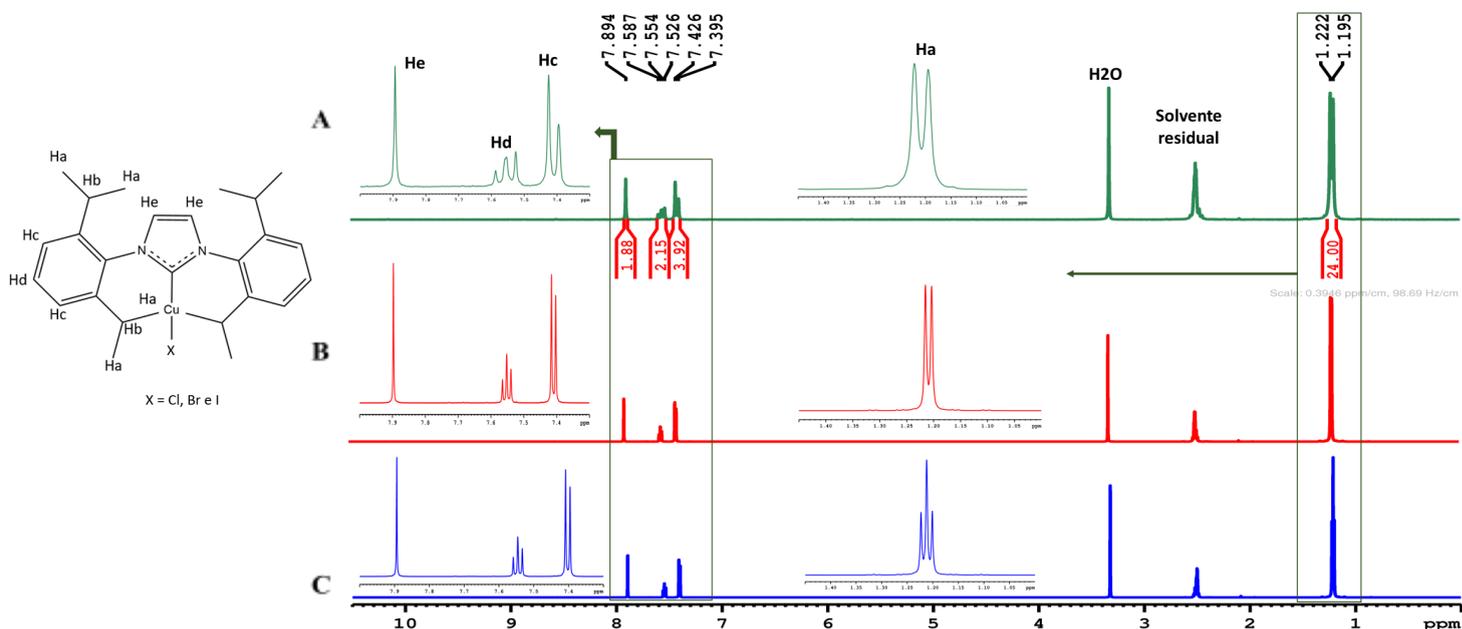


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H dos compostos A, B e C feitos em DMSO- d_6 , 600 MHz. Notamos a ausência do pico em 10,23 ppm presente no ligante, indicando a complexação do metal.

A partir dos espectros de RMN de ^{13}C (figura 4) obtidos é notável que o complexo de cloro apresenta a maior diferença em relação ao deslocamento dos compostos de bromo e iodo. Podemos observar esse deslocamento mais precisamente nos carbonos 15 do anel de imidazol. Essa variação pode ser explicada pela diferença de raio iônico entre os haletos⁸. Notamos que a eletronegatividade não é o fator predominante no deslocamento desses compostos, devido que o cloro, haleto mais eletronegativo da série estudada, não

apresenta o maior deslocamento. Portanto, podemos atribuir a maior desblindagem do anel de imidazol ao aumento do raio iônico dos haletos, dessa forma o iodo, haleto de maior raio iônico, possui o maior deslocamento no espectro (180,91 ppm), seguido pelo bromo (179 ppm) e pelo cloro (178,74 ppm).

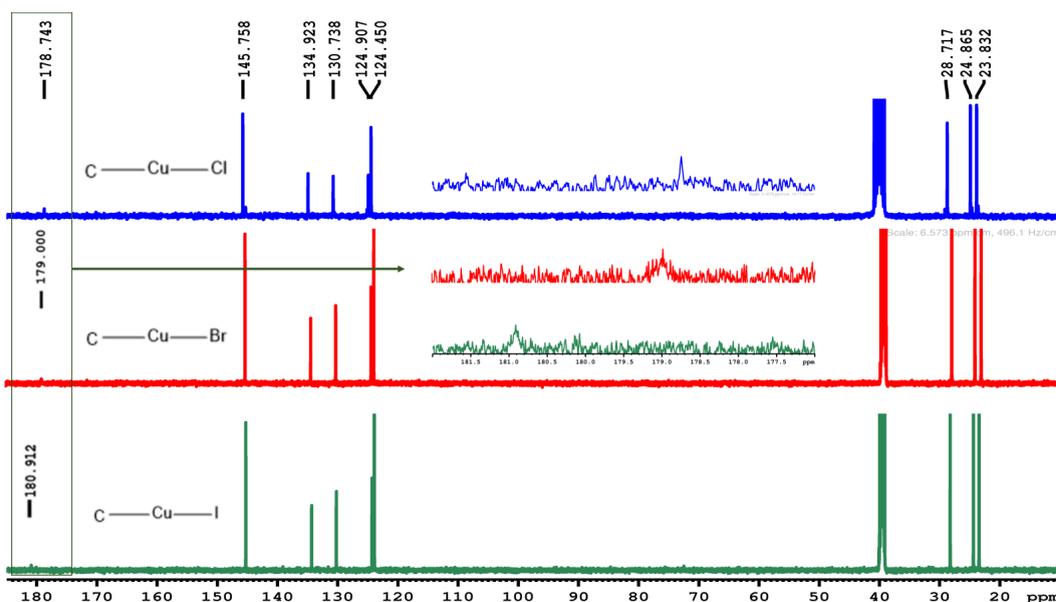


Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos A, B e C feitos em DMSO- d_6 , 300 MHz. Observamos a diferença de deslocamento entre os complexos formados por haletos diferentes.

Espectrometria de massas

Através da análise de espectrometria de massas foram obtidos os espectros dos complexos de cloro, bromo e iodo. Foi utilizado o espectro de massa do complexo $[\text{Cu}(\text{IPr})\text{I}]$ como referência, já que os picos são similares em todos os compostos estudados.

Os espectros de massas dos compostos (figura 5.A) apresentam picos de maior intensidade em torno de m/z 492, que mostram a formação de $[\text{Cu}(\text{IPr})\text{CH}_3\text{CN}]^+$, com fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{CuN}_3^+$, indicando a troca dos íons haletos Cl^- , Br^- e I^- por CH_3CN (acetonitrila, solvente). Também observamos o comportamento característico do padrão isotópico do cobre ($^{63}\text{Cu} = 69,17\%$ e $^{65}\text{Cu} = 30,83\%$) nos picos entre m/z 493 e m/z 495.

A figura 5.B mostra o padrão isotópico do cobre e formação de complexos $[(\text{IPr})\text{Cu}(\mu\text{-CH}_3\text{CN})\text{Cu}(\text{IPr})]^+$, onde a acetonitrila (CH_3CN) age como ligante ponte entre os centros metálicos. A formação dessa espécie, correspondente ao pico 939,4009 m/z , não foi observada no RMN ^1H nem de ^{13}C deste composto, portanto sua formação é provavelmente um artefato da técnica de eletrospray.

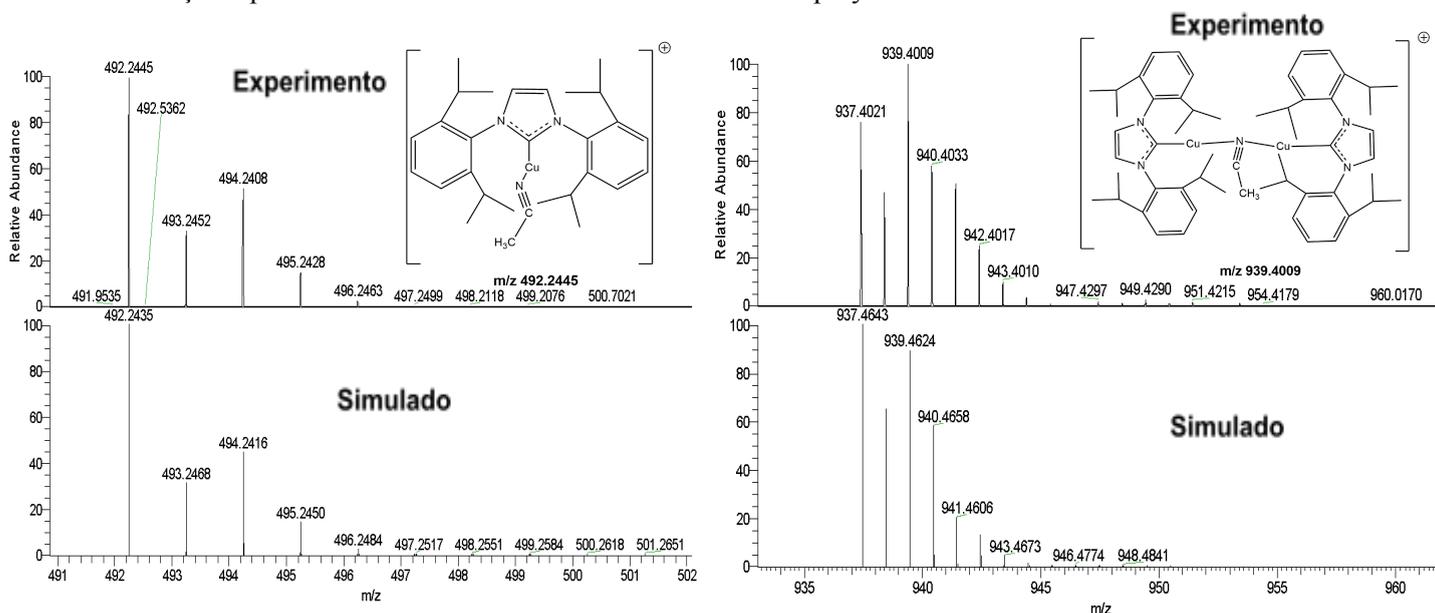


Figura 5: Espectrometria de massas de alta resolução pelo método de ionização por eletrospray no modo positivo do complexo C. A) Zoom na região de 491 à 502 m/z do composto e sua respectiva simulação. B) Zoom na região de 935 a 960 m/z do composto e sua respectiva simulação.

2) Estudo biológico

Foram analisadas a atividade dos complexos em concentrações diferentes em promastigotas de *L. amazonensis*.

A partir da tabela 2 observamos que ao aumentar a concentração dos complexos diminuimos a concentração de promastigotas viáveis, ressaltando que o complexo [Cu(IPr)I] apresentou a menor porcentagem de promastigotas viáveis.

Estudos biológicos estão em andamento para determinar a citotoxicidade (CC_{50}) e o índice de seletividade (IS) dos complexos nas células dos macrófagos.

Tabela 2: Resultados obtidos através do estudo preliminar em duas concentrações dos complexos A, B e C e determinação de promastigotas viáveis pelo método MTT.

Composto	<i>L. (L.) amazonensis</i> % promastigotas viáveis	
	50 μ M	25 μ M
[Cu(IPr)Cl]	2,6	4,3
[Cu(IPr)Br]	3,2	6,9
[Cu(IPr)I]	2,3	2,5

CONCLUSÕES

Através da utilização da técnica de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e análise elementar confirmamos a formação dos complexos [Cu(IPr)X] (X = Cl, Br e I). Os estudos preliminares em *L. amazonensis* demonstraram que os complexos podem apresentar potencial leishmanicida.

Dessa maneira, a fim de obter mais informações sobre o mecanismo de ação dos compostos estudados, serão conduzidos testes de lipofilicidade, antioxidante e testes de interação com BSA (albumina sérica bovina).

Além disso, foram testadas diferentes rotas de síntese⁹ para obtenção do complexo homoléptico [Cu(IPr)₂]Y (Y = BF₄ e PF₆), porém não foi possível obter o produto puro desejado.

REFERÊNCIAS

1. LEISHMANIASIS, 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 9 de julho de 2024.
2. OPAS. Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais. OPAS. 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso em: 4 maio 2023.
3. BARANIAK, Dagmara; BORYSKI, Jerzy. Triazole-Modified Nucleic Acids for the Application in Bioorganic and Medicinal Chemistry. **Biomedicines**, 9, 628, 2021.
4. FONTES, Josielle *et al.* Antileishmanial and Anti-Chikungunya Activity of Cu (I)-N-Heterocyclic Carbenes. **ChemistrySelect**, 7, e202201560, 2022.
5. HOPKINSON, Matthew *et al.* An overview of N-heterocyclic carbenes. **Nature**, 510, 485-96, 2014.
6. Hans, M. *et al.* **Beilstein Journal of Organic Chemistry**. 11, 2318–2325, 2015.
7. SANTORO, Orlando *et al.* A general synthetic route to [Cu(X)(NHC)] (NHC = N-heterocyclic carbene, X = Cl, Br, I) complexes. **Chem Commun**, 49, 10483-10485, 2013.
8. SILVERSTEIN, Robert M. *et al.* Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Tradução e revisão técnica Ricardo Bicca de Alencastro. -8. ed.- Rio de Janeiro: **GEN LTC**, 2019.
9. Díez-González, Silvia *et al.* Cationic Copper(I) Complexes as Efficient Precatalysts for the Hydrosilylation of Carbonyl Compounds. **Organometallics**, 25, 2355-2358, 2006.