

COMPLEXO DE COBRE (II) CONTENDO LIGANTES BIS (PIRAZOL-ENXOFRE): SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Ianka J. Nunes (IC),¹ Thalita F. B. de Alquino (PG),² Angela M. Casaril (PQ),² Lucielli Savegnago (PQ),² Daniela Hartwig (PQ),² Adriana C. Pinheiro (PQ),³

¹Universidade Federal de Pelotas – iankajacondinonunes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – thalitafer10@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- angela.casaril@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- luciellisavegnago@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas- dani.hartwig@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – acpinheiro@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas nas cadeias transportadora de elétrons durante o processo de respiração ou como resultado da interação com substâncias exógenas. Níveis baixos são essenciais para o bom funcionamento celular, mas níveis excessivos de ERO são responsáveis pelo “estresse oxidativo”, que tem sido associado à progressão de envelhecimento e diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e lesões inflamatórias (MEDINA, M. ET AL., 2019).

Nesse sentido, há uma necessidade crescente em desenvolver novos compostos que inibam esses radicais livres, os quais são denominados de antioxidantes. Os antioxidantes agem de diferentes formas, sendo estas através da inibição do mecanismo oxidativo, interrupção das reações deletérias em cadeia, além da inibição de reações de oxidação. (BORA, et al., 2019). Esses compostos podem ser produzido pelo nosso organismo ou absorvido endogenamente através da dieta de alimentos e fármacos (BLANCO, A. ET AL., 2017).

Os compostos organometálicos com atividades antioxidantes têm recebido atenção especial, considerando sua capacidade de proteger sistemas vivos e células de danos causados por estresse oxidativo e/ou radical livre. Esses complexos são geralmente doadores de hidrogênio ou doadores de elétrons para o sítio reativo na neutralização dos radicais livres (WAIL AL ZOUBI ET AL., 2019).

O cobre é um elemento essencial para a maioria dos organismos aeróbicos e está envolvido em muitas vias biológicas. Além disso, o cobre pode facilmente coordenar em sítios de ligantes orgânicos doadores, gerando compostos com diferentes números de coordenação e geometrias. O potencial redox do Cu(I)/Cu(II) no meio fisiológico varia dependendo da natureza do grupo doador, geometria molecular, efeitos eletrônicos e estéricos dos substituintes, e o modo de quebração do ligante. Além disso, tal transferência de elétrons sempre envolve modificações importantes da estereoquímica do metal oxidado/reduzido pertinente de complexos (SANTINI, C. ET AL., 2014).

Consequentemente, em muitos casos, a coordenação do ligante ao centro metálico leva a uma melhoria das atividades farmacológicas devido à efeitos sinérgicos entre o metal e o ligante. Em alguns casos, os ligantes podem neutralizar a carga elétrica de Cu(II), aumentando a lipofilicidade do complexo, podendo intercalar com o DNA e / ou interagir com diferentes proteínas (MEDINA, M. ET AL., 2019).

Tendo em vista as características da química de coordenação do cobre, descrevemos a síntese e caracterização de um novo complexo de Cu(II), contendo o ligante pirazol-enxofre. O novo complexo de Cu(II) foi caracterizado por difração de raios X de monocrystal, análise elementar e espectroscopia de infravermelho. Além disso, foram realizados testes para avaliar a atividade antioxidante total do novo complexo pela captura do radical livre ABTS⁺, radical DPPH e inibição do ER.

2. METODOLOGIA

2.1. Procedimentos Gerais

As reações foram conduzidas sem o uso de atmosfera inerte e os procedimentos de cristalização foram realizados através da evaporação lenta do solvente. Os solventes utilizados na síntese do pré-ligante e complexo foram adquiridos de forma comercial, com grau de pureza compatível com o uso, sem necessidade de purificação prévia. Reagentes comerciais foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem purificação. O pré-ligante [3,5-Dimetil-1-fenil-4-(fenilsulfanil)-1H-pirazol] **1a** foi preparado seguindo procedimentos descritos na literatura (OLIVEIRA et al., 2015).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro IRAffinity-1, SHIMADZU, na região de 4000 a 500 cm⁻¹, sob o acessório ATR-ZnSe, localizado no laboratório localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A coleta de dados de difração de raios X do composto **2a** foi realizada em um difratômetro Bruker D8 Venture Photon10, utilizando a radiação de Mo K(α) (0,71073 Å) e sistema óptico de monocromatização, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

2.2. Síntese do Complexo de Cu(II)

2.2.1. [Cu[Bis{3,5-Dimetil-1-fenil-4-(fenilsufanil)-1H-pirazol}Cl₂] (2a)

Uma solução de CuCl₂.2H₂O (0,026g, 3,05mmol) em metanol (5mL), foi adicionada gota a gota em uma solução do pré-ligante **1a** (0,100g, 3,05mmol) em metanol (5mL). A mistura reacional foi deixada em temperatura ambiente por 24h com agitação constante. Após o tempo de reação, foi evaporado o solvente, a solução resultante foi filtrada por cânula filtro e o complexo **2a** lavado (3x5mL) com metanol gelado, em seguida a solução foi armazenada em um tubo de ensaio para cristalização. Monocristais de coloração verde foram obtidos dessa solução em temperatura ambiente e foram analisados por difração de raios X de monocristal. O complexo **2a** foi obtido como um sólido de cor verde com rendimento de 51,3% (0,127 g; 1,82 mmol). IV (ATR, cm⁻¹): ν 3040 (C-H), ν 1501 (C=C), ν 1385 (C=N), ν 1121 (NN).

2.3. Ensaio antioxidante para o complexo de Cu(II)

A atividade antioxidante do complexo **2a** foi avaliada através de sua capacidade em eliminar os radicais sintéticos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), cátion radical ácido 2,2-azinobis-3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS⁺) e inibir a formação de espécies reativas (ER) induzidas pela azida de sódio. O composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para todas as análises em diferentes concentrações (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM e 50 μM). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes.

Para determinar a atividade de eliminação de DPPH[•], foram misturadas diferentes concentrações de complexo de Cu(II) **2a** (0,1 - 50 μM) com uma solução metanólica de 0,1 mM Radical DPPH por 30 min a 30 °C no escuro.

Para determinação da atividade de neutralização dos radicais sintéticos ABTS⁺, diferentes concentrações de complexos de Cu(II) (0,1–50 μM) foram misturados com solução do radical 7mM ABTS⁺, e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 min no escuro. A absorbância resultante foi medida a 734 nm e registrado como capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição para os radicais DPPH[•] e ABTS⁺.

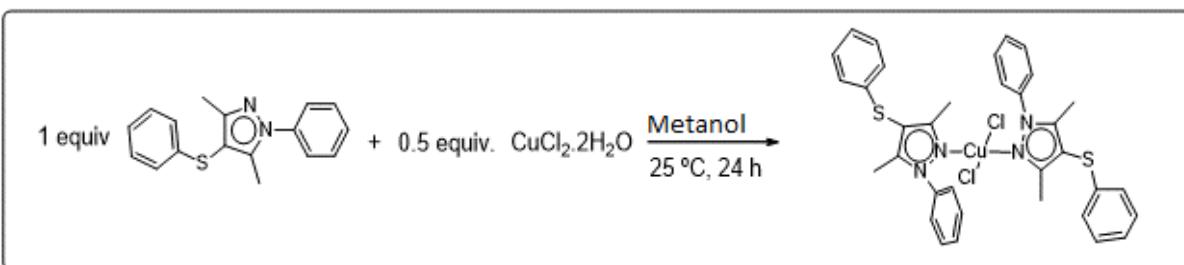
A avaliação da inibição da formação de ER foi realizada com homogenatos de tecidos, de camundongos Swiss machos (25-30 g; fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas). Os camundongos foram eutanasiados e o tecido cerebral foi rapidamente removido e colocado no gelo. O cortex pré-

frontal (PFC) e o hipocampo (HC) foram dissecados e homogeneizado em Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 (1/4, peso / volume [p / v]). O homogenato foi centrifugado por 10 min a 2500 × g e o sobrenadante resultante foi usado para a análise. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pré-ligante nomeado **1a** foi obtido seguindo procedimentos da literatura (OLIVEIRA et al., 2015), por meio de um sistema catalítico (sal de cobre e bipiridina), utilizando DMSO como solvente em reações multicomponentes, sendo caracterizado por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{14}H - ^{13}C .

A rota geral de síntese para o novo complexo de Cu(II), **2a**, a partir do pré-ligante pirazol-enxofre é apresentada no **Esquema 1**. A reação $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com 2 equiv. de **1a** em metanol, à temperatura ambiente levou a formação do complexo **2a** como um sólido de coloração verde. O complexo **2a** foi isolado com bom rendimento, sendo caracterizado por difração de raios-X de monocristal e espectroscopia na região do infravermelho.



Esquema 1. Rota geral de síntese do complexo de Cu(II) **2a**.

A atividade antioxidante do complexo **2a** $\text{Cu}[\text{Bis}\{3,5\text{-Dimetil-1-fenil-4-(fenilsufanil)-1H-pirazol}\}\text{Cl}_2]$ foi avaliada através de sua capacidade de eliminar os radicais sintéticos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $^+$), ácido 2,2-azinobis-3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS $^+$) e inibir a formação de espécies reativas (ER) induzidas pela azida de sódio.

O complexo **2a** foi eficaz na eliminação de radicais DPPH em concentrações que variam de 10 a 50 μM , resultando em um IC_{50} de 8,0 μM (6,7 a 15,7 μM) e I_{max} de $89,2 \pm 6,6\%$. O **2a** não foi capaz de inibir o radical ABTS $^+$ na concentração máxima de 50 μM . Além disso, o composto **2a** foi capaz de inibir a formação de ER induzida por azida de sódio no córtex pré-frontal (PFC) e hipocampo (HC) de cérebros de camundongos em concentrações 10-50 μM , resultando em um IC_{50} de 7,2 μM (3,4-16,0) e 10,5 μM (7,0-16,7) respectivamente. O pré-ligante pirazol-enxofre (**1a**) não inibiu 50% dos radicais sintéticos DPPH e ABTS em concentrações 1-500 μM resultando $I_{\text{max}} = 28,44 \pm 1,34\%$. No entanto, apresentou inibição similar a **2a** na formação de ER, presentes no córtex pré-frontal (PFC) em concentrações 50-500 μM com IC_{50} de (8,6 \pm 0,5%) (OLIVEIRA et al., 2020).

Tabela 1- Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* do complexo de cobre(II) **2a**.

Composto []	% Inibição		% formação RS	
	DPPH $^+$	ABTS $^+$	RS PFC	RS HC
2a [μM]				
0,1	1,8 \pm 0,7	-	-	-
0,5	5,7 \pm 2,0	-	-	-
1	1,5 \pm 0,2	-	88,0 \pm 21,5	86,8 \pm 6,1
5	1,4 \pm 0,0	-	53,4 \pm 5,1	76,6 \pm 7,8

10	87,3 ± 9,8**	-	44,4 ± 4,1*	42,9 ± 2,4**
50	89,2 ± 6,6**	-	19,0 ± 1,0*	21,0 ± 4,7**
I_{Max} (%)	89,2 ± 6,6	-	81,0 ± 1,0	79,0 ± 4,7
IC_{50} (μM)	8,0 (6,7 a 15,7)	-	7,2 (3,4 a 16,0)	10,5 (7,0 a 16,7)

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os valores são apresentados como: porcentagem de inibição dos radicais DPPH e ABTS⁺ quando comparado a um grupo controle sem inibição de radicais (inibição de 0%) e porcentagem de formação de ER quando comparado a um grupo sem inibição da ER (100% da formação da RS). O meio inibitório máximo concentração (IC_{50}) indica a concentração de compostos necessária para inibir 50% do DPPH^{•+}, ABTS⁺, e formação de RS. A porcentagem de inibição máxima é representada por I_{Max} . Os dados foram analisados por ANOVA de via, seguida pelo teste post hoc de Tukey (* p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001).

4. CONCLUSÕES

Uma nova classe de complexo de cobre(II) contendo ligante monodentado pirazol-enxofre foi sintetizado. A determinação estrutural revela a geometria quadrática e coordenação do nitrogênio do anel pirazol para o complexo **2a**.

O complexo **2a** demonstra inibição do radical DPPH a partir da concentração 10 μM, mostrando maior eficiência na eliminação e inibição dos radicais DPPH, quando em comparação com a molécula orgânica sem a presença do metal, o pré-ligante **1a**. O complexo **2a** exibe resultados similares ao pré-ligante **1a** na inibição de ER no PFC com 50 μM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D. Hartwig de Oliveira; D. Alves; R.G. Jacob; F.S.S. Sousa; P.T. Birmann; A.P. Pesarico; L. Savegnago. Evaluation of antioxidant activity and toxicity of sulfur- or selenium-containing 4-(arylchalcogenyl)-1*H*-pyrazoles. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** V.98: p. 441–448, 2020.
- OLIVEIRA, D.; AQUINO, T.; EDMILSON, J.; PERIN, G.; JACOB, R.; ALVESA, D. Direct Synthesis of 4-Organylselanylpyrazoles by Copper Catalyzed One-Pot Cyclocondensation and C-H Bond Selenylation Reactions. **Advanced Synthesis and Catalysis**, Brasil, v. 357, p. 4041-4049, 2015.
- BORA, G.; GOGOI, D.; SAIKIA, S.; PAREEK, A.; HANDIQUE, G. J. Stannous chloride catalyzed synthesis of Schiff bases from hydroxybenzaldehydes and determination of their antioxidant activity by ABTS and DPPH assay. **Indian Academy of Sciences**, India, v. p. 2019.
- Wail Al Zoubi, Abbas Ali Salih Al-Hamdani, Susan Duraid Ahmed, Hassan M.Basheer, Roaa Sabti Awad Al-Luhaihi, Adnan Dib, Young Gun Ko. Synthesis, characterization, and antioxidant activities of imine compounds. **J Phys Org Chem.** V. 32, p.3916, 2019.
- L. S. Lai, S. T. Chou, W. W. Chao, Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao. **J. Agric. Food Chem.** V. 49, p. 963 – 968, 2001.
- SANTINI, C.; PELLEI, M.; GANDIN, V.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; MARZANO, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews.** v.114, p. 815– 862, 2014.
- J.J. M. Medina, L. G. Naso, A. L. Pérez, A. Rizzi, N. B. Okulika, M. Valcarcel, C.I. Salado, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. **Biomed Pharmacother.** V. 111, p. 414–426, 2019.