

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Edgar Hernando Lizarazo Jaimes

Estudo da atividade leishmanicida de novos complexos de
Sb(III) e Bi(III) com ligantes polipiridínicos

Belo Horizonte

2013

UFMG/ICEX/DQ 960^a

T. 432^a

Edgar Hernando Lizarazo Jaimes

Estudo da atividade leishmanicida de novos complexos de
Sb(III) e Bi(III) com ligantes polipiridínicos

Tese apresentada ao Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências-Química.

Belo Horizonte-MG-Brasil

2013

J254e Jaimes, Edgar Hernando Lizarazo
2013 Estudo da atividade leishmanicida de novos
T complexos de Sb(III) e Bi(III) com ligantes
polipiridínicos / Edgar Hernando Lizarazo Jaimes.
2013.
x, 116 f. : il.

Orientadora: Cynthia Peres Demicheli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Ligantes
(Bioquímica) - Teses 3. Antimônio - Uso terapêutico -
Teses 4. Agentes anti-infecciosos - Teses 5. Piridina -
Derivados - Teses I. Demicheli, Cynthia Peres,
Orientadora II. Título.

CDU 043



"Estudo da Atividade Leishmanicida de Novos Complexos de Sb(III) e Bi(III)
com Ligantes Polipiridínicos"

Edgar Hernando Lizarazo Jaimes


Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Cynthia Peres Demicheli
UFMG


Profa. Ynara Marina Idemori
UFMG


Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira
UFMG


Prof. Azevedo Batista
UFSCAR


Profa. Marciela Scarpellini
UFRJ

Belo Horizonte, 17 de abril de 2013.

Este Trabalho foi desenvolvido
sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª.
Cynthia Peres Demicheli

Dedico este trabajo a mi esposa Luz Elena por ser mi amor, mi complice, por caminar junto a mí, conquistando sueños y utopias.

Agradecimentos

- ✓ À Prof^ª. Cynthia Peres Demicheli pela orientação, apoio e dedicação durante a realização deste trabalho.
- ✓ Ao Professor Dr. Frédéric Frézard pela colaboração e dedicação durante a realização deste trabalho.
- ✓ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.
- ✓ Aos Professores, Dr. Nivaldo Speziali, Dr. Nelson Fernandes, Dr. Bernardo Rodrigues pela colaboração na realização deste trabalho.
- ✓ Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete, Lilian. Obrigado pelo carinho e atenção.
- ✓ Aos colegas do laboratório 201 Priscila, Ivana, Simoni, Júlio, Islam, Flavia, Bruno, Gabriel, Erika pelos bons momentos vividos, pela força e o carinho.
- ✓ Aos Colegas e amigos do Departamento de Química, Jeferson, Angel, Fabrício, Fernando, Sheila, Ricardo, Diego, Ana, obrigado pelas discussões que poderiam tornar o mundo melhor.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química pela ajuda ao longo desses anos.
- ✓ Ao Grande Machado de Assis pelo presente que deixou à humanidade e que tive a oportunidade de desfrutar nos tempos de ócio.
- ✓ A Eny e Fátima pelo carinho de mãe que recebi de vocês em Belo Horizonte.
- ✓ Aos meus amigos Oscar, Hans, Olger, Lalo e Raúl.
- ✓ A mi madre Elena, gracias por tanto amor... Tu eres mi heroína.
- ✓ A Omaira por ayudar a construir sueños de grandeza en la juventud Herranense.

RESUMO

A atividade da série de compostos polipiridínicos 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenantrolina (phen), dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) foi avaliada contra formas promastigotas, sensíveis e resistentes ao Sb(III), em cepas de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*. Todos os compostos foram mais ativos que o medicamento usado como controle, o tartarato de antimônio e potássio. O grupo bipy, phen e dpq apresentou valores de concentração inibitória CI_{50} na ordem de nmol L^{-1} , enquanto que os compostos do dppz apresentaram na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Foram sintetizados e caracterizados por métodos de análises físico-químicos dois compostos inéditos de Sb(III) e Bi(III) com o ligante dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz): $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$. As estruturas cristalinas desses complexos foram determinadas por difração de raios X de monocristal. A atividade desses complexos foi avaliada contra formas promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III) em cepas de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*.

A toxicidade do ligante e dos complexos foi avaliada em macrófagos peritoneais de camundongo. Os valores da concentração inibitória CI_{50} dos complexos em promastigotas de *Leishmania* foram muito menores que a concentração citotóxica CC_{50} em macrófagos peritoneais de camundongo. Para o dppz, e os complexos de Bi(III) e Sb(III), o índice de seletividade, calculado como CC_{50}/CI_{50} , foi 12,5, 4,8 e 7,0, respectivamente.

Foram preparados e caracterizados por métodos de análises físico-químicos cinco complexos de Sb(III) contendo os derivados polipiridínicos 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenatrolina (phen) e dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq): $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$, $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$, $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$. As estruturas cristalinas dos complexos da 1,10-fenantrolina foram determinadas pela primeira vez por difração de raios X.

A atividade desses complexos foi avaliada contra formas promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III) em cepas de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*. A atividade leishmanicida de todos os complexos foi muito superior quando comparados com a droga controle, o tartarato de antimônio(III) e potássio. Todos os complexos obtidos a partir do sal SbCl_3 apresentaram-se muito mais ativos que o sal. Em contraste, o complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$ apresentou menor atividade que o sal ϕSbCl_2 .

A coordenação do Sb(III) promoveu melhora significativa da atividade nos complexos da phen contra parasitas de *L. infantum chagasi*.

Os estudos de interação desses complexos com um modelo peptídico derivado da proteína nucleocapsídica NCp7 do vírus HIV (KGC) mostraram a capacidade desses complexos de formar novas espécies com o peptídeo. Os estudos de interação da phen com o sistema Zn(II)-KGC, mostraram a capacidade da phen para ejetar o Zn(II) do domínio dedo de zinco.

ABSTRACT

The activity of a series of polypyridyl compounds 2,2'-bipyridine (bipy), 1,10-phenanthroline (Phen), dipyrido [3,2-d: 2', 3'-f]quinoxaline (dpq) and dipyrido [3,2-a: 2', 3'-c]phenazine (dppz) was evaluated *in vitro* against the promastigote form of Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* and *Leishmania amazonensis* strains. All compounds were more active than potassium antimony tartrate, used as control drug. The bipy, Phen and dpq showed inhibitory concentration IC₅₀ values in the nanomolar range.

Two novel trivalent antimony(III) and bismuth(III) complexes with the nitrogen-donor heterocyclic ligand dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (dppz) were synthesized and characterized as [Sb(dppz)Cl₃].H₂O.CH₃OH and [Bi(dppz)Cl₃]. The crystal structure of Sb(III) complex was determined by X-ray crystallography. These complexes were evaluated for their activity against the promastigote form of Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania* strains. Both complexes were more effective than dppz alone in inhibiting the growth of *Leishmania* promastigotes and were at least 77 and 2400 times more active than potassium antimony tartrate in Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania*, respectively. The cytotoxicity of dppz and its complexes against mouse peritoneal macrophages occurred at dppz concentrations at least 6-fold greater than those found to be active against *Leishmania* promastigotes. To investigate the role of the metal in the improved antileishmanial activity of dppz, the activity of the Sb(III) complex was compared between the Sb-resistant mutants and their respective parental sensitive strains. The lack of cross-resistance to the Sb(III)-dppz complex together with the much lower activity of antimony tartrate, SbCl₃ and BiCl₃ strongly support the model that the metal is not active by itself but improves the activity of dppz through complexation.

Five Sb(III) complexes with 2,2'-bipyridine (bipy), 1,10-phenanthroline (Phen), dipyrido [3,2-d: 2',3'-f]quinoxaline (dpq) were prepared and characterized as: [Sb(bipy)Cl₃], [Sb(bipy)Cl₂], [Sb(Phen)Cl₃],

[Sb(Phen) ϕ Cl₂] e [Sb(dpq)Cl₃]. The crystal structures of the complexes with 1,10-phenanthroline were determined for the first time by X ray diffraction. These complexes were evaluated for their activity against Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania promastigotes*.

The leishmanicidal activities of these complexes were higher than those of potassium antimonyl tartrate. All the complexes obtained from the SbCl₃ salt were more active than the salt itself. On the other hand, than ϕ SbCl₂ salt was found to be highly active and more effective than the [Sb(bipy) ϕ Cl₂] complex.

The coordination of Sb (III) caused a significant improvement in the activity of Phen complex against parasites of *L. infantum chagasi*.

Studies of the interaction of these compounds with a peptide model of the zinc finger domain of the HIV-1 NCp7 protein (KGC), showed that these complexes formed new species with the peptide. Studies of Phen interaction with the Zn(II)-KGC system, indicated that Phen induced the ejection of Zn(II) from the zinc finger domain.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leishmanioses.....	1
1.2	Quimioterapia	3
1.3	Complexos metálicos com atividade biológica.....	6
1.4	Complexos metálicos da 2,2'-bipiridina e da 1,10-fenantrolina	8
1.5	Uso clínico dos metais pnictogênios Sb(III) e Bi(III).....	10
1.5.1	Bismuto(III).....	10
1.5.2	Antimônio(III)	12
1.6	Motivos dedos de zinco.....	15
1.7	Objetivos.....	18
2	PARTE EXPERIMENTAL	19
2.1	Materiais e Métodos	19
2.2	Síntese dos ligantes dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)	21
2.2.1	Síntese da dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq)	21
2.2.2	Síntese da dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)	22
2.3	Preparação dos complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz)Cl ₃].....	22
2.3.1	Preparação do complexo [Sb(dppz)Cl ₃].....	22
2.3.2	Preparação do complexo [Bi(dppz)Cl ₃].....	22
2.4	Preparação dos complexos de Sb(III) com 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenantrolina (phen) e dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq).....	23
2.5	Testes Biológicos	23
2.5.1	Avaliação in vitro da atividade antileishmania	24
2.5.2	Avaliação in vitro da atividade citotóxica.....	25
2.5.3	Estudo da interação com modelo de peptídeo dedos de zinco	26
2.5.4	Estudo do deslocamento do zinco.....	26
2.6	Determinação do coeficiente de partição n-octanol/água	27
3	DERIVADOS POLIPIRIDÍNICOS COMO AGENTES LEISHMANICIDAS	29

3.1	2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenatrolina (phen), dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) ..	29
3.1.1	Caracterização físico-química dos ligantes polipiridínicos dpq e dppz	29
3.1.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos ligantes dpq e dppz	33
3.1.4	Avaliação da atividade leishmanicida	35
3.1.5	Atividade citotóxica	37
4	COMPLEXOS DE Sb(III) E Bi(III) COM DPPZ	38
4.1	Caracterização físico-química dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III).....	38
4.2	Resultados das análises termogravimétricas dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III).....	39
4.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III)	41
4.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos de dppz com Sb(III) e BI(III).....	43
4.5	Análise por difração de raios X dos complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz) ₂ Cl ₃]	46
4.6	Testes Biológicos	51
4.6.1	Avaliação da atividade antileishmania.....	51
4.6.2	Atividade citotóxica	52
4.7	Coeficiente de partição óleo/água	53
5	COMPLEXOS DE Sb(III) COM Bipy, phen E dpq	55
5.1	Complexos da 2,2'-bipiridina (bipy) com Sb(III)	55
5.1.1	Caracterização físico-química dos complexos da 2,2'-bipiridina (bipy) com Sb(III).....	56
5.1.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos da bipy com Sb(III)	57
5.1.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos da bipy com Sb(III).....	60

5.2	Complexos da 1,10-fenantrolina (phen) com Sb(III)	65
5.2.1	Caracterização físico-química dos complexos da phen com Sb(III)	65
5.2.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos da phen com Sb(III)	66
5.2.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos da phen com Sb(III).....	70
5.2.4	Análise por difração de raios X de monocristal dos complexos da phen com Sb(III)	74
5.3	Complexo da dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) com Sb(III).. ..	77
5.3.1	Caracterização físico-química do complexo de dpq com Sb(III) ..	78
5.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do complexo de dpq com Sb(III)	79
5.3.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do complexo de dpq com Sb(III).....	80
5.3.4	Avaliação da atividade leishmanicida	83
6	MECANISMO DE AÇÃO	87
6.1	Motivos dedos de zinco como alvos na quimioterapia	87
6.2	Mecanismo de ação da 1,10-Fenantrolina (phen)	88
6.3	Interação com o modelo peptídico	89
6.4	Estudos do deslocamento do átomo de zinco.....	90
7	CONCLUSÕES.....	93
	Anexos.....	115

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Parasitas de Leishmania. a) promastigotas de Leishmania spp., b) amastigotas de Leishmania spp., c) mosquitos flebótomos e d) hospedeiros vertebrados. Fonte: <http://www.pediatrictropical.com/protozoarios%20tisulares.html>..... 1
- Figura 2-** Distribuição mundial dos casos de leishmaniose e da coinfeção Leishmania/HIV relatados entre 1990-1998. Fonte: <http://www.who.int/csr/resources/publications/html> 2
- Figura 3-** Apresentação comercial e estruturas propostas dos fármacos de antimônio pentavalente. a) e c) estibogluconato de sódio (Pentostan), b) e d) antimoniato de meglumina (Glucantime). Fonte: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/cutaneous.htm> 4
- Figura 4-** Estruturas dos fármacos a) anfotericina B, b) pentamidina e c) miltefosina. 5
- Figura 5-** Estruturas dos compostos a) 1,10- fenatrolina-5,6-diimina (ϕ) e b) dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) 6
- Figura 6-** Estrutura proposta do fármaco tártaro emético (Wijeratne, 2010). 13
- Figura 7-** Representação dos motivos dedos de zinco. O nome da proteína, número e o tipo de ZnF são apresentados em cada representação. 16
- Figura 8-** Representação dos arranjos de domínios dedos de zinco nas formas: a) sequencial, b) superposto e c) binuclear..... 17
- Figura 9-** Estruturas dos compostos dppz e dpq 30
- Figura 10-** Espectro no IV do composto dpq – suporte KBr (4000-400 cm^{-1}). 32
- Figura 11-** Espectro no IV do composto dppz – suporte KBr (4000-400 cm^{-1}). 32
- Figura 12-** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ligante dpq. 34
- Figura 13-** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do ligante dppz. 34
- Figura 14-** Representação genérica dos complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ 39

Figura 15 – Curvas de TG(roxo) e DTG(vermelha) do complexos [Bi(dppz)Cl ₃].	40
Figura 16 – Curvas de TG(roxo) e DTG(vermelha) do complexos [Sb(dppz)Cl ₃].	40
Figura 17 – Espectro no IV do complexo [Sb(dppz)Cl ₃] e do ligante dppz - suporte KBr.	41
Figura 18 – Espectro no IV do complexo [Bi(dppz)Cl ₃] e do ligante dppz - suporte KBr.	42
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do complexo [Sb(dppz)Cl ₃].	45
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do complexo [Sb(dppz)Cl ₃].	45
Figura 21 – Mapa de contornos HMQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do complexo [Sb(dppz)Cl ₃].	46
Figura 22 – Representação da unidade assimétrica do complexo [Sb(dppz)Cl ₃].	48
Figura 23 – Representação da unidade assimétrica do complexo [Bi(dppz) ₂ Cl ₃]DMSO(H ₂ O) _{1/2} .	48
Figura 24 – Superior: Curvas de absorvância em função da concentração dos complexos; Inferior: espectros das soluções padrão que foram usadas para construir as curvas.	54
Figura 25 – Coeficientes de partição óleo/água dos complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz)Cl ₃]. Os valores representam as médias ± desvio padrão (n=6).	54
Figura 26 – Representação genérica dos complexos [Sb(bipy)Cl ₃] e [Sb(bipy)φCl ₂].	57
Figura 27 – Espectro no IV do complexo [Sb(bipy)Cl ₃] e do ligante bipy - suporte KBr.	59
Figura 28 – Espectro no IV do complexo [Sb(bipy)φCl ₂] e do ligante bipy - suporte KBr.	60
Figura 29 – Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do complexo [Sb(bipy)Cl ₃].	62
Figura 30 – Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do complexo [Sb(bipy)Cl ₃].	62

Figura 31- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$	64
Figura 32- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$	64
Figura 33- Representação genérica dos complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$	66
Figura 34- Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e do ligante phen – suporte KBr.	68
Figura 35- Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ e do ligante phen – suporte KBr.	69
Figura 36- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$	72
Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$	73
Figura 38- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$	73
Figura 39- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$	74
Figura 40- Representação da unidade assimétrica do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$	76
Figura 41- Representação da unidade assimétrica do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]\text{CH}_3\text{COOH}$	77
Figura 42- Representação genérica do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$	78
Figura 43- Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$ e do ligante dpq – suporte KBr.	80
Figura 44- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$	82
Figura 45- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$	82
Figura 46- Espectro HMQC (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$	83
Figura 47- Espectro de dicroísmo circular do peptídeo $[\text{KGC}] = 50,0 \mu\text{M}$ em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre e em presença de concentrações equimolares dos complexos da bipy.....	89

- Figura 48-** Espectro de dicroísmo circular do peptídeo [KGC]= 50,0 μ M em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre e em presença de concentrações equimolares dos complexos da bipy.....90
- Figura 49-** Espectro de dicroísmo circular do peptídeo [KGC]= 50,0 μ M em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre, do peptídeo dedo de zinco KGC:Zn e na presença de phen.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reagentes utilizados na parte experimental.....	20
Tabela 2- Fórmula molecular, temperaturas de fusão, massas molares, rendimento das reações e análise elementar para os derivados polipiridínicos dpq e dppz.	30
Tabela 3- Atribuições dos sinais da absorção no infravermelho do dpq e dppz – suporte KBr.....	31
Tabela 4- Atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) para os ligantes dpq e dppz, em DMSO- <i>d</i> ₆	33
Tabela 5- Valores de CI ₅₀ dos derivados polipiridínicos contra parasitas de Leishmania.....	35
Tabela 6- Toxicidade dos compostos bipy, phen, dpq e dppz contra macrófagos peritoneais de camundongo.....	37
Tabela 7- Fórmula molecular, temperatura de fusão, massas molares, rendimento da reação, condutividade molar e análise elementar para os complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz)Cl ₃].....	39
Tabela 8- Atribuições das principais bandas de absorção no IV do ligante dppz e dos complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz)Cl ₃] – suporte KBr. ...	43
Tabela 9- Atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C dos complexos de Sb(III) e Bi(III).	44
Tabela 10- Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para os complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz) ₂ Cl ₃].....	49
Tabela 11- Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Sb(dppz)Cl ₃].	49
Tabela 12- Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Bi(dppz) ₂ Cl ₃].	50
Tabela 13- Concentrações inibitórias dos complexos de Sb(III) e Bi(III) contra promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III).	52
Tabela 14- Toxicidade dos complexos [Sb(dppz)Cl ₃] e [Bi(dppz)Cl ₃] contra macrófagos peritoneais de camundongo.....	52
Tabela 15- Análises elementar, massa molar, temperatura de fusão e condutividade dos complexos de Sb(III) com a bipy.	56

Tabela 16 – Atribuições das principais bandas de absorção IV para o ligante bipy e os complexos [Sb(bipy)Cl ₃] e [Sb(bipy)φCl ₂] – suporte KBr.	58
Tabela 17 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C do ligante bipy e do complexo [Sb(bipy)Cl ₃] em DMSO- <i>d</i> ₆	61
Tabela 18 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto φSbCl ₂ e do complexo [Sb(bipy)φCl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	63
Tabela 19 – Análises elementares, massa molar, temperatura de fusão e condutividade dos complexos de Sb(III) com a phen.	66
Tabela 20 – Atribuições das principais bandas de absorção nos espectros no IV para o ligante phen e os complexos [Sb(phen)Cl ₃] e [Sb(phen)φCl ₂] – suporte KBr.	67
Tabela 21 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C do ligante phen e do complexo [Sb(phen)Cl ₃] em DMSO- <i>d</i> ₆	70
Tabela 22 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C do sal φSbCl ₂ e do complexo [Sb(phen)φCl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	71
Tabela 23 – Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para as estruturas [Sb(phen)Cl ₃] e [Sb(phen)φCl ₂]	75
Tabela 24 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Sb(phen)Cl ₃].	76
Tabela 25 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Sb(phen)φCl ₂].	76
Tabela 26 – Percentuais dos elementos C,H,N (valor teórico), massa molar e temperatura de fusão e condutividade molar do complexo de Sb(III) com dpq.	78
Tabela 27 – Atribuições dos sinais da absorção no infravermelho do ligante dpq e do complexo [Sb(dpq)Cl ₃] – suporte KBr.	79
Tabela 28 – Atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C do ligante dpq e o complexo de Sb(III) em DMSO- <i>d</i> ₆	81
Tabela 29 – Concentrações inibitórias (CI ₅₀) dos complexos de Sb(III) contra promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III).	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Antimoniato de meglumina
bipy	2,2'-bipiridina
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dicroísmo circular
DMF	4,4-dimetil formamida
dppz	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dpq	Dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
phen	1,10-fenantrolina
HMQC	Heteronuclear Quantum Coherence
LV	Leishmaniose visceral
MI	Metalo-intercaladores
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IV	Infravermelho
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	Meio de cultura "Roswell Park Memorial Institute"
SBF	Soro bovino fetal inativado
R.R.	Rendimento da reação
RSb	Resistente ao Sb(III)
SSb	Sensível ao Sb(III)
TA	Tartarato de antimônio(III) e potássio
TG	Análise termogravimétrica
TP	Tripanotiona

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Tripanosomatidae* (Ross, 1903) Os parasitas causadores das leishmanioses possuem duas formas diferenciadas no ciclo de vida: a forma promastigota e a forma amastigota.

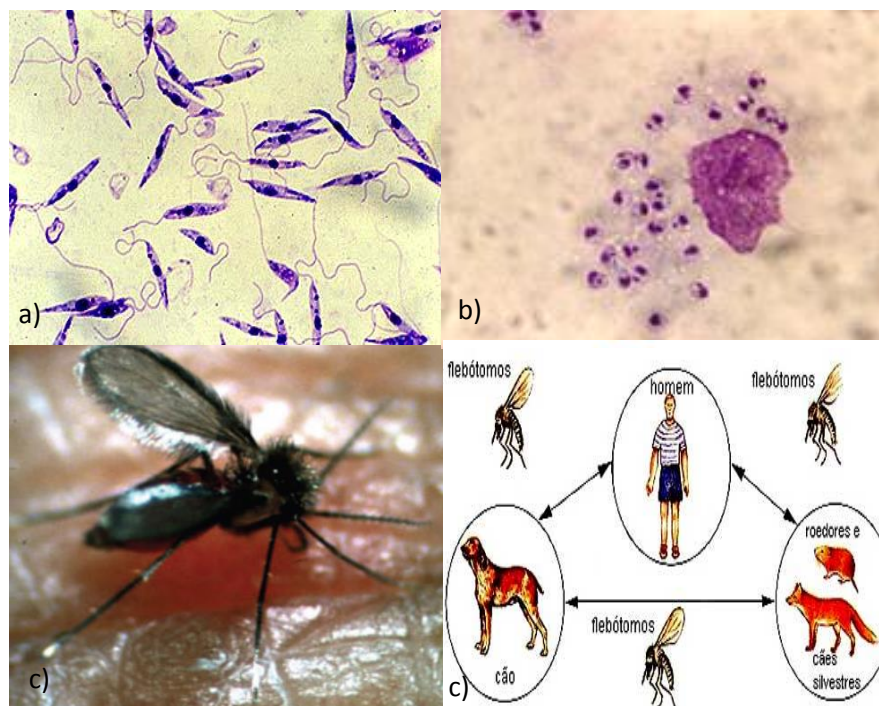


Figura 1 Parasitas de *Leishmania*. a) promastigotas de *Leishmania* spp., b) amastigotas de *Leishmania* spp., c) mosquitos flebotomos e d) hospedeiros vertebrados. Fonte: <http://www.pediatrictropical.com/protozoarios%20tisulares.html>.

A forma promastigota, presente no tubo digestivo do inseto vetor, é transmitida aos vertebrados pela picada de mosquitos denominados flebotomos (Herwaldt; 1999). Nos vertebrados, esses parasitas se transformam em amastigotas dentro das células do sistema fagocítico mononuclear: da derme, das mucosas, ou de órgãos como fígado, baço e

medula óssea (Figura 1) (WHO, 1993; Croft, 2006). Como hospedeiros vertebrados estão incluídos algumas espécies de mamíferos: roedores, canídeos, edentados, marsupiais e primatas (Genaro, 2000).

Essas doenças geralmente caracterizam-se por um espectro amplo de manifestações clínicas dependente da espécie de *Leishmania* envolvida, são agrupadas em dois grupos clínicos: a leishmaniose tegumentar (LT) associada à alta morbidade e a Leishmaniose Visceral (LV) associada à alta mortalidade (WHO, 2001). Embora a Leishmaniose visceral, ou Calazar seja causada principalmente por *L. donovani*, também pode ser causada por *L. infantum* e *L. chagasi*, esta doença manifesta-se com febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. A mortalidade, em casos de LV, é de 100% em indivíduos que não são tratados (Gontijo; 2004).

A leishmaniose tegumentar é subdividida em Leishmaniose mucocutânea e cutânea, a primeira é causada principalmente por *L. braziliensis*, manifesta-se com lesões que destroem as mucosas, enquanto a leishmaniose cutânea é causada por *L. mexicana*, *L. tropica* ou *L. major*, com lesões ulcerativas na pele (Murray, 2005).

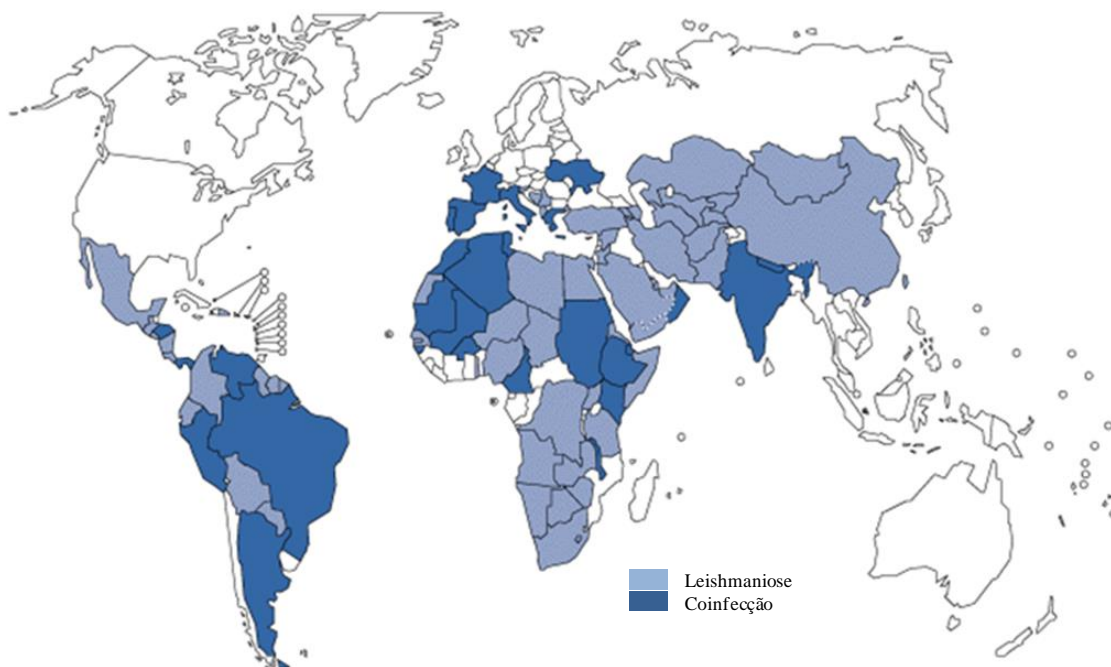


Figura 2 Distribuição mundial dos casos de leishmaniose e da coinfeção *Leishmania*/HIV relatados entre 1990-1998. Fonte: <http://www.who.int/csr/resources/publications/html>

As leishmanioses estão presentes em 88 países distribuídos entre os trópicos (Figura 2). Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença. Do total de casos de leishmaniose visceral relatados anualmente no mundo, 90% ocorrem na Índia, Nepal, Bangladesh, Brasil e Sudão (Murray, 2005); enquanto que do total das ocorrências de leishmaniose cutânea 90 % são registrados no Afeganistão, Brasil, Irão, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2001).

Na atualidade, muitos desafios devem ser enfrentados na busca de novos tratamentos para essa doença, dentre esses destacam-se o aparecimento de casos clínicos resistentes ao tratamento convencional com antimoniais (Sundar, 2000), o aparecimento de casos clínicos de coinfeção por parasitas do gênero *Leishmania* e HIV (Rosenthal, 1995) e os casos de predisposição à doença em pacientes portadores de câncer ou doenças auto-imunes (Desjeux, 2000).

1.2 Quimioterapia

Em países de língua inglesa, o tratamento das leishmanioses é feito principalmente com o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]); já em países de língua francesa, espanhola e no Brasil o medicamento de primeira escolha é o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), ambos pentavalentes. A apresentação comercial e as estruturas propostas para esses medicamentos são mostradas na Figura 3 (Berman, 1988; Frézard, 2008). Nesses medicamentos, o princípio ativo é o metal Sb(V). Devido a sua baixa absorção oral, esses compostos são administrados por via parenteral (injeção intravenosa ou intramuscular), num período de 20-40 dias. Porém, as doses diárias de 20 mg de Sb/Kg/dia, às vezes precisam ser administradas por mais de quatro meses, o que acarreta um grande problema social considerando que muitas vezes os pacientes residem em zonas rurais. A ocorrência desta doença em zonas rurais do Brasil dificulta a assistência aos pacientes que precisam se deslocar até um centro de saúde (e muitas vezes, permanecer) para receber o tratamento com controle médico. Nesse contexto, os casos de interrupção do tratamento se tornam

frequentes, o que tende a aumentar o aparecimento de resistência (Guerin, 2002; Amato, 1998).

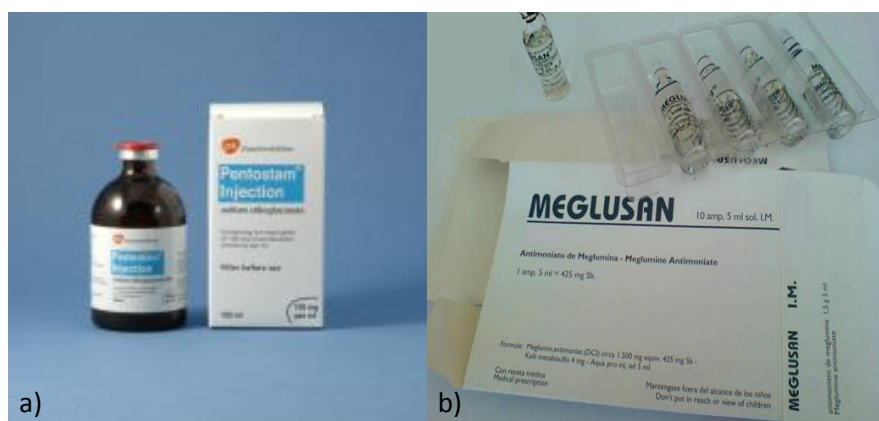


Figura 3 Apresentação comercial e estruturas propostas dos fármacos de antimônio pentavalente. a) e c) estibogluconato de sódio (Pentostan), b) e d) antimoniato de meglumina (Glucantime). Fonte:

<http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/cutaneous.htm>

Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, com taxas de cura que variam de 60 a 100%, não obstante, efeitos colaterais como disfunção gastrointestinal, dores musculares, arritmias e pancreatite estão presentes na maioria dos casos (Gasser, 1994), limitando seu uso em pessoas com insuficiência renal, cardiopatas, idosos e mulheres grávidas (Nogueira, 2001). O aparecimento de casos de resistência é o maior inconveniente dos tratamentos clássicos com antimoniais (Mandal, 2007; Hadighi, 2006) e, nessas situações, fármacos alternativos como a pentamidina, anfotericina B ou miltesfosina (Figura 4) têm apresentado

bons resultados em tratamentos clínicos. A pentamidina converteu-se numa alternativa atrativa no tratamento das leishmanioses cutâneas, principalmente devido às altas taxas de cura obtidas com doses baixas. Porém, seu uso em tratamentos de leishmanioses visceral mostrou-se menos eficiente por causa das doses elevadas que podem induzir uma alta toxicidade (Berman, 1997; Croft, 2005). A amfotericina B é um antifúngico com atividade antileishmania que apresenta alta toxicidade. Recentemente, foi apresentada uma formulação liposomal conhecida como AmBisome, aprovada pela *Food and Drugs Administration*, para o tratamento da leishmanioses visceral (Meyerhoff, 1999), não obstante, o elevado custo tem limitado seu uso. Embora, a miltefosina tenha-se mostrado ativa em tratamentos orais contra a leishmaniose visceral (Soto, 2007) seu uso não é efetivo contra outros tipos de leishmanioses (Yardley, 2005).

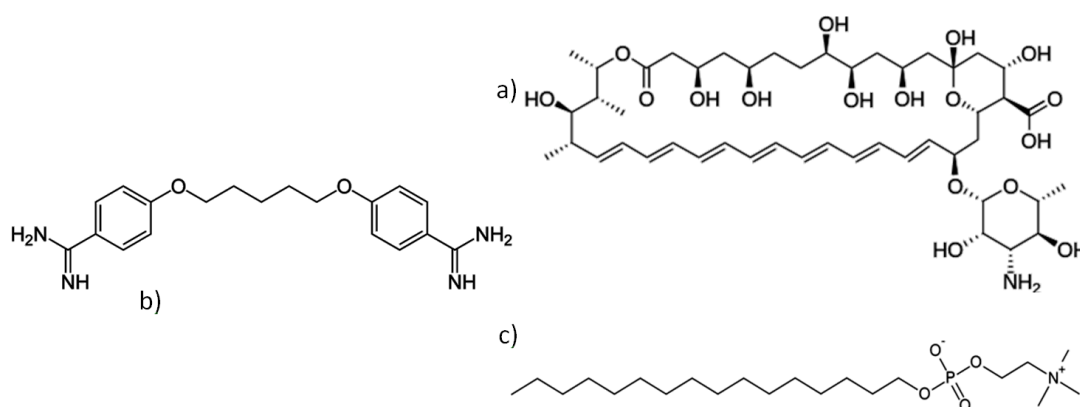


Figura 4 Estruturas dos fármacos a) amfotericina B, b) pentamidina e c) miltefosina.

Nas últimas décadas, foi avaliada a atividade antiparasitária de um número significativo de complexos metálicos com reconhecida atividade antitumoral. Na maioria dos casos, os compostos apresentaram elevada atividade contra trypanosomas (Kinnamon, 1979; Farrell, 1984) e Leishmanias (Mesa-Valle, 1989; Navarro, 2003). Foi sugerido que o mecanismo de ação desses complexos poderia estar envolvido com a inibição da síntese de ADN e ARN considerando a capacidade de interagirem covalentemente (Mesa-Valle, 1997), ou por intercalação com os ácidos nucleicos (Navarro, 2003).

1.3 Complexos metálicos com atividade biológica

A *cis*-diaminodichloroplatina(II), cisplatina, é o principal exemplo de um complexo metálico utilizado como agente quimioterápico. A sua atividade anticancerígena foi relatada na década de 1960 por Rosenberg e colaboradores (Rosenberg, 1969). O mecanismo de ação se inicia com a ativação do composto mediante a substituição dos íons cloreto da esfera de coordenação, por duas moléculas de água. Posteriormente, a forma ativa, *cis*-diaminodiaquoplatina(II), se liga covalentemente às bases purina do ADN, o que causa a inibição da replicação e da síntese de proteínas (Jamieson, 1999). O sucesso deste composto tem motivado um grande número de pesquisas focadas na síntese de análogos da cisplatina (Liu, 2011; Yin, 2011) e de novos complexos da Pt(II). Dentre os complexos da Pt(II), aqueles formados com os ligantes terpiridina e fenantrolina (Jennette, 1974) mostraram um mecanismo de interação diferente daquele apresentado pela cisplatina com o ADN. A interação entre esses complexos e o ADN não envolve a formação de ligação covalente, o que ocorre é a intercalação do ligante ao ADN (Jennette, 1974; Lippard, 1976).

Lerman, em 1961, foi o primeiro a propor a intercalação para explicar a forte afinidade de corantes orgânicos pelo ADN (Lerman, 1961).

Existem dois exemplos clássicos representativos de moléculas orgânicas que intercalam o ADN, estas são a dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) e a 1,10-fenantrolina-5,6-diimina, mostradas na Figura 5.

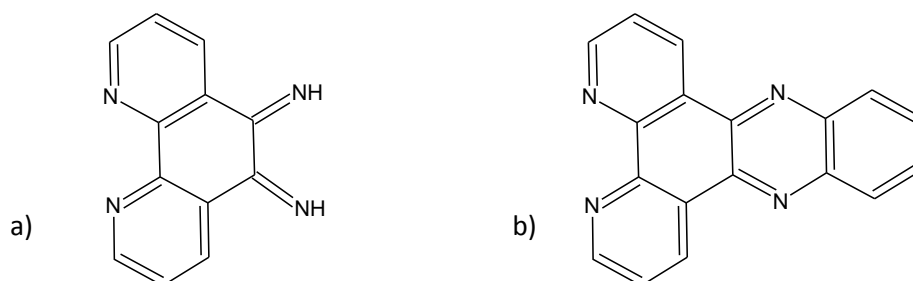


Figura 5- Estruturas dos compostos a) 1,10- fenatrolina-5,6-diimina (phi) e b) dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

A intercalação pode gerar modificações estruturais no ADN as quais podem induzir mudanças das funções e frequentemente inibem processos de transcrição, replicação e reparação do ADN, o que torna os intercaladores potentes agentes mutagênicos (Liu; 2011).

A coordenação de metais de transição a moléculas intercaladoras gera complexos conhecidos como metalo-intercaladores (MI). Nesses complexos, pelo menos um ligante deve ter um tamanho apropriado, normalmente até 9,16 Å de largura (Zeglis, 2007), com e um extenso sistema aromático que possibilite a intercalação. As propriedades dos MI podem ser moduladas pela natureza do metal coordenado ou por modificações na estrutura orgânica dos ligantes (Butsc, 2010). O centro metálico em determinados casos tem papel somente estrutural, mantendo a estrutura tridimensional rígida, proporcionando desta forma a intercalação com o ADN. Porém, dependendo das características eletrônicas do metal, o centro metálico pode ter uma função mais ativa como, por exemplo, dar origem a complexos fotoluminescentes ou agentes foto-oxidantes (Erkkila, 1999).

O uso do ligante bidentado dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz), tem despertado o interesse de vários pesquisadores nas últimas décadas devido à sua alta afinidade pelo ADN ($K_b \geq 10^6 \text{ M}^{-1}$). As propriedades fotofísicas e fotoquímicas de seus complexos superam aquelas dos complexos metálicos da fenantrolina, que foram inicialmente estudados e cuja afinidade pelo ADN é substancialmente menor (Chen, 1997).

Embora, a maioria dos complexos metálicos do dppz são relatados como MI, existem exemplos de complexos não iônicos, desse ligante e de análogos, que apresentam mecanismo de ação diferente da intercalação. Para esses complexos, a extensão do sistema aromático dos ligantes influencia fortemente na sua atividade, de forma semelhante aos MI, no entanto foi sugerido que sua toxicidade é devida à interação do ligante polipiridínico com alvos intracelulares (Scharwitz, 2008).

Complexos não iônicos foram relatados como agentes antitumorais de amplo espectro, sendo a maioria complexos de Pt(II) (Roy, 2008) com grupos abandonadores de labilidade moderada (Roy, 2008; Schäfer, 2007),

que podem ser trocados por moléculas de água, o que deixa o metal disponível para se ligar ao ADN de forma similar à cisplatina.

1.4 Complexos metálicos da 2,2'-bipiridina e da 1,10-fenantrolina

Os compostos 2,2'-bipiridina (bipy) e 1,10-fenantrolina (phen) são quelantes bidentados com maior densidade eletrônica no heteroatomo, com capacidade de atuarem tanto como π receptores como σ doadores (Bencini, 2010). Os derivados da phen apresentam estruturas rígidas planas ao contrário da bipy. Estas estruturas favorecem a lipofília e trazem vantagens farmacológicas, tais como estabilidade metabólica e biodisponibilidade oral (Marcaccini, 2004).

Foi sugerido que a atividade biológica da phen e da bipy seja devida à capacidade desses ligantes de se ligarem a íons metálicos fundamentais na atividade catalítica de metaloenzimas, ou presentes nos fluidos biológicos (Brandt, 1954). O ligante livre interrompe funções vitais de uma ampla variedade de sistemas biológicos induzindo a morte ou inibição da proliferação em diferentes organismos (Brandt, 1954). Esse efeito poderia ser devido à formação de complexos metálicos, que poderiam ter uma atividade citotóxica (McCann, 2000), ou devido à quelação de metais que são essenciais a esses organismos, como sugerido pela elevada estabilidade dos complexos da phen com os íons Fe(II), Ni(II), Co(II), Mn(II) e Zn(II) (MacLeod, 1952).

Em geral, os complexos metálicos da phen e de seus derivados são potenciais agentes capazes de induzir toxicidade em células tumorais (Krishna, 2003; Wheate, 2007; Prashanthi, 2012; Kellet, 2012), e de inibir o crescimento de agentes infecciosos como bactérias (Prashanthi, 2012; Mengjun, 2012) e fungos (Coyle, 2003; Mengjun, 2012). O mecanismo de ação desses complexos depende do íon metálico, não obstante o sistema heteroaromático planar do ligante possa induzir a intercalação do ADN, como dito anteriormente.

A habilidade dos complexos da bipy e da phen com Mn(II) e Cu(II) de catalisarem reações redox que envolvem proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos foi atribuída à interação dessas biomoléculas com H₂O₂ e o metal, envolvendo as típicas reações Fenton (Stadtman, 1993). Por outro lado, o complexo inerte [Ru(bipy)₃]²⁺ pode ser ativado fotoquimicamente gerando uma espécie radicalar que pode clivar o ADN (Carroll, 1987).

Com respeito ao ligante bipy, Lippard e colaboradores relataram que complexos ternários de platina contendo esse ligante têm a capacidade de se intercalarem no ADN (Lippard, 1976). Entretanto, a maioria dos complexos contendo o ligante relatados na literatura são complexos ternários onde a bipy atua simplesmente como um ligante auxiliar para estabilizar o complexo (Rutherford, 1997; Mansouri-Torshizi, 2011, Andrews, 2011).

Por outro lado, a bipy tem menor afinidade pelo ADN. Por exemplo, os complexos [Pt(bipy)(en)]²⁺ e [Pt(phen)(en)]²⁺ possuem constantes de ligação ao ADN de 10⁴ e 10⁵ M⁻¹ respectivamente (Howe-Grant, 1979).

O aumento da área de superfície do sistema π na série dos compostos bipy, phen e dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) induz, em geral, um aumento da atividade biológica nos complexos não iônicos desses ligantes (Scharwitz, 2008). Nesse caso, há uma correlação entre a concentração do complexo dentro das células e sua atividade biológica. É sugerido que o aumento do tamanho da área de superfície aromática desses ligantes, confere maior caráter lipofílico facilitando a passagem através da membrana celular (Harlos, 2008).

É importante resaltar que, embora não existam relatos da atividade antileishmania da 1,10-fenatrolina, seu uso na caracterização de metaloenzimas, especificamente como inibidor de metaloproteínas de espécies de *Leishmania* tem sido extensamente relatado. Por exemplo, a phen foi usada na caracterização bioquímica de proteínas de superfície de parasitas de *L. chagasi* (Alves, 2004) e na caracterização bioquímica de proteases intracelulares de *L. donovani* (Choudhury, 2010), e a ação da phen nesses casos está novamente relacionada com a quelação do metal.

Dentre as diversas funções deste tipo de metaloenzimas em parasitas, podemos citar os processos relacionados à invasão e multiplicação do parasita (Choudhury, 2010), aos mecanismos de nutrição (Williamson, 2003), na sobrevivência do parasita (Blackman, 2008) e no caso da metalopeptidase GP63 na hidrólise de proteínas da célula hospedeira e na modulação e escape da resposta imune (Yao, 2010). Devido às múltiplas funções que são fundamentais para a sobrevivência do parasita na célula hospedeira, as metalopeptidases são consideradas alvos potenciais de fármacos (Choudhury, 2010).

1.5 Uso clínico dos metais pnictogênicos Sb(III) e Bi(III)

O termo pnictogênio foi proposto inicialmente por van Arkel (Girolami, 2009) quando foi usado para referir-se aos elementos do grupo do nitrogênio. Dentre os elementos pertencentes a esse grupo, o metal bismuto e o metalóide antimônio são intensamente estudados e têm reconhecido uso na história da medicina.

1.5.1 Bismuto(III)

A forma ionizada mais estável do bismuto é o estado de oxidação +3. O Bi(III), em meio aquoso, apresenta elevada afinidade por ligantes que possuem grupos doadores como nitrogênio, oxigênio (Hancock, 1993) e enxofre (Phillips, 2007). Esta característica influencia fortemente a sua coordenação a biomoléculas refletindo na sua atividade biológica.

Embora, existam compostos de bismuto classificados como altamente tóxicos como o BiPh_2X (com X= haleto), vários outros compostos são considerados não tóxicos e de fácil manipulação (Klapötke, 1988). Alguns fármacos à base de bismuto são usados há mais de dois séculos na medicina para o tratamento de infecções gastrointestinais, hipertensão e infecções da pele (Suerbaum, 2002; Sun, 2004).

No início do século XX, Paul Ehrlich, considerado o pai da quimioterapia moderna, revolucionou a quimioterapia com a descoberta da arsfenamina comercializada como salvarsan, composto à base de arsênio utilizado no tratamento da sífilis. Nessa mesma época, compostos análogos contendo o Bi(III) mostraram ser igualmente ativos com a vantagem de apresentarem menores efeitos tóxicos (Klapötke, 1988). Na atualidade, o principal uso do bismuto é no tratamento de doenças gastrointestinais causadas pela bactéria *H. pylori* (Suerbaum, 2002).

Existem três medicamentos à base de Bi(III) que são usados mundialmente contra distúrbios gástricos, o subsalicitado de bismuto (Pepto-Bismol[®]), o subscitrato de bismuto coloidal (CBS, De-Nol[®]) e o citrato de bismuto/ranitidina (RBC, Tritec[®] e Pylorid[®]) (Lambert, 1991). O mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, acredita-se que o efeito protetor em úlceras seja devido aos complexos que são incorporados pela mucosa gástrica e se ligam às proteínas do tecido conectivo, proteínas do muco e enzimas, inibindo a aderência da bactéria (Sun, 2004).

Existem diferentes relatos que mostram a capacidade dos medicamentos à base de bismuto de interagir com diferentes proteínas humanas, dentre elas a albumina do soro sanguíneo (Sun, 2001), a metalotioneína (Sun, 1999) e as proteínas transportadoras de ferro: a transferrina (Li, 1996) e a lactoferrina (Zhang, 2001). Esta última proteína está presente em diversos fluidos tais como a bile, o suco pancreático e algumas secreções intestinais. Acredita-se que a ligação do Bismuto à lactoferrina iniba o crescimento das bactérias devido à diminuição da incorporação do ferro pela *H. pylori* (Sun, 1999). Dentro do parasita, o bismuto pode inibir enzimas essenciais como a urease e a hidrogenase, ou proteínas que ligam íons níquel, essenciais na sobrevivência das bactérias. A urease catalisa a hidrólise de uréia para gerar amônia, esse composto é essencial para neutralizar o lúmen gástrico e a mucosa favorecendo a colonização de ambientes ácidos no estômago (Zhang, 2006). A *H. Pylory* sintetiza pequenas proteínas citoplasmáticas ricas em histidina (Hpn), a função destas metaloenzimas é armazenar e transferir os íons Ni(II) a outras enzimas essenciais para a bactéria; o Hpn foi sugerido como potencial alvo do Bi(III) (Ge, 2006). Recentemente, foi

relatado que a incorporação do Fe(III) por bactérias *H. pylori* é diminuída em presença de íons Bi(III), sugerindo que os transportadores do ferro do agente patogênico poderiam estar envolvidos na incorporação do Bi(III) (Tsang, 2011).

Atualmente, o bismuto é usado em medicina para reduzir os efeitos secundários do tratamento do câncer com a cisplatina (Boogaard, 1991). Observa-se também o seu uso como radiofármaco na terapia contra o câncer (Kozak, 1986). Recentemente, o potencial dos compostos de bismuto para o tratamento das leishmanioses também foi relatado (Andrews, 2011).

1.5.2 Antimônio(III)

O antimônio, assim como o arsênio, é um metalóide do grupo 15 que apresenta duas formas iônicas principais na natureza, a forma trivalente Sb(III) e a forma pentavalente Sb(V). Em solução aquosa, em pH fisiológico, o Sb(III) existe principalmente como hidróxido, Sb(OH)_3 (Porquet, 2007), que é acumulado facilmente nas células de todos os organismos vivos, sendo transportado pelas proteínas de membrana denominadas aquagliceroporinas (Maciaszczyk-Dziubinska, 2012).

A configuração eletrônica do antimônio, $[\text{Kr}]5s^25p^3$, permite a utilização dos orbitais s, p e em alguns casos dos orbitais 5d para formar 3, 4, 5 e 6 ligações covalentes, permitindo a existência de um grande número de complexos do antimônio. O Sb(III) forma complexos com uma ampla variedade de ligantes, entre eles, tiamidas heterocíclicas (Ozturk, 2010; Hadjikakou, 2008), nitrilo-acetatos (Popov, 2005), e tiosemicarbazonas (Reis, 2010). Esses complexos de Sb(III) mostraram atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células. Complexos organometálicos de Sb(III) com arilidroxamatos (Wang, 2005) e com ligantes derivados do ditiofosforo (Keppler, 1993) também mostraram atividade contra células de leucemia. Foi sugerido que o mecanismo de ação do Sb(III) contra células

de leucemia envolve a perturbação da homeostase de tiois intracelulares com posterior aumento de espécies reativas do oxigênio (Wyllie, 2006).

Até o século XIX não existia tratamento contra as leishmanioses, e na maioria dos casos os pacientes estavam condenados a conviver com a doença até a morte (Lainson, 1983). O rumo da história das leishmanioses muda em 1912, quando o jovem cientista brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna observou, pela primeira vez, a eficácia do tártaro emético (complexo de Sb(III) Figura 6) no tratamento das leishmanioses tegumentar americana (Vianna, 1913). Porém, ainda na primeira metade do século XX os antimoniais trivalentes foram substituídos pelos antimoniais pentavalentes devido à alta toxidez da forma trivalente. Também no início século XX o tártaro emético foi usado na Itália no tratamento do Calazar (Rath, 2003) e na África para o tratamento da doença do sono (Borst, 1995).

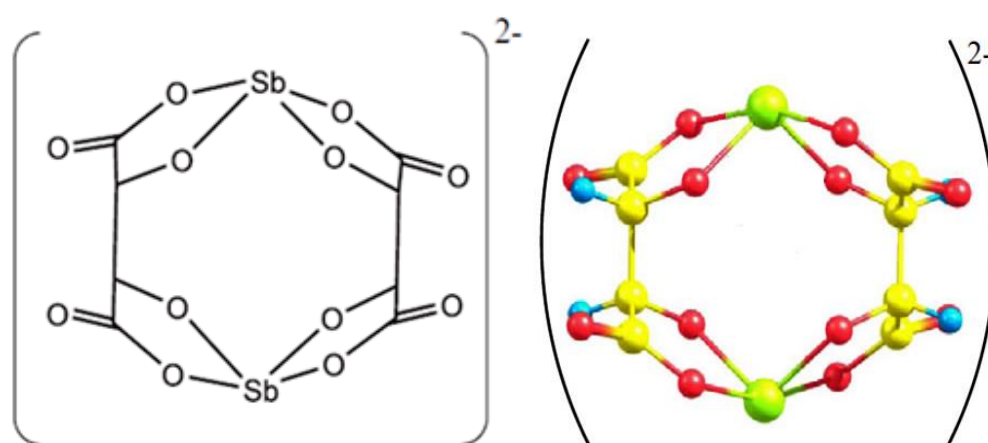


Figura 6- Estrutura proposta do fármaco tártaro emético (Wijeratne, 2010).

Apesar de serem utilizados por mais de sessenta anos no tratamento das leishmanioses, pouco se sabe sobre o metabolismo (Gebel, 1997), mecanismo de ação (Berman, 1998; Demicheli, 2002) e de toxicidade (Berman, 1998) dos antimoniais pentavalentes. Ainda não foram identificadas a forma final do princípio ativo e seu alvo biológico. Entretanto, supõe-se que a atividade dos antimoniais pentavalentes requer sua dissociação e transferência do metal para uma ou várias biomoléculas (Marsden, 1985).

Um estudo demonstrou que a baixa toxicidade do Sb(V) poderia ser atribuída em parte, às altas taxas de excreção deste em relação à forma trivalente (Goowin, 1943). Para que os antimoniais exerçam a atividade contra as leishmanioses, o antimônio deve ingressar na célula hospede, atravessar a membrana fagolisosomal e atuar contra o parasita encontrado ali. A rota de incorporação do Sb(V) dentro do macrófago não é bem conhecida e é sugerido que o transportador de fosfato seja o responsável por ela (Rosen, 2002). Somente o Sb(III) apresenta forte atividade contra as duas formas do parasita (Serenio, 1998; Croft, 1981) suportando a hipótese de que o Sb(V) atuaria como uma pró-droga que precisa ser reduzida na forma mais ativa, o Sb(III). A redução de Sb(V) a Sb(III), no organismo, foi comprovada através de dosagens realizadas em amostras de sangue e urina humanas e parece ser fundamental na atividade farmacológica (Burguera, 1993). Entretanto, o local da redução e a biomolécula que promoveria tal reação, permanecem desconhecidos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs que tióis intracelulares poderiam estar envolvidos, como agentes redutores, na conversão *in vivo* do Sb(V) a Sb(III). Essa hipótese se baseia na observação de que, no antimoniato de meglumina (AM), a glutathiona e a tripanotiona, principais tióis encontrados nos macrófagos e no parasita, podem promover a redução de Sb(V) a Sb(III) em condições próximas às fisiológicas (Frézard, 2001).

Também foi sugerido que um modo de ação do Sb(III) estaria relacionado com a capacidade desse metal de reduzir os níveis de tripanotiona (TP) dentro do parasita (Cunningham, 1994) por inibição da tripanotiona redutase (TR), afetando a atividade tampão exercida pelos tióis, e expondo o parasitas às espécies reativas do oxigênio geradas pelo macrófago (Wyllie, 2004)

Apesar de não existir atualmente nenhum uso clínico do Sb(III), vários estudos relatam o potencial citotóxico contra diferentes tipos de câncer relacionados, principalmente, com a capacidade do Sb(III) de afetar o metabolismo da glutathiona (Lecureur, 2002; Willye, 2006).

Um segundo modelo tem como hipótese que o Sb(V) seria o próprio fármaco. Evidência de potenciais alvos do Sb(V) que respaldam este

mecanismo foi relatada por Demicheli e colaboradores (Demicheli, 2002). Foi demonstrada a formação de complexos de adenosina e guanosina com o Sb(V) sugerindo que esses complexos poderiam atuar inibindo os transportadores purinas da *Leishmania* (Carter, 2000).

Com respeito aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelo parasita ao antimônio é sugerido que são devidos a múltiplos fatores. O mecanismo de resistência primário consiste na diminuição da concentração da espécie ativa dentro do parasita, a qual pode ser ocasionada por uma diminuição da incorporação do metal. Recentemente, foi demonstrado que a proteína aquagliceroporina (AQP1) é responsável por incorporar o antimônio trivalente em parasitas de *Leishmania* (Gourbal, 2004). A superexpressão dessa proteína em *L. major* induz hipersensibilidade ao Sb(III), enquanto que sua deleção induz resistência (Gourbal, 2004; Marqis, 2005), como observado nas formas promastigota e amastigota intracelular em isolados clínicos de *L. donovani*, resistentes ao Sb(V) (Decuypere, 2005), sugerindo o envolvimento dessas proteínas no mecanismo de resistência.

A diminuição da espécie ativa do antimônio em parasitas também pode ser ocasionada por um incremento do transporte de efluxo do metal. Relatos da literatura sugerem que proteínas MRP (*multidrug resistance-associated protein*), envolvidas com o efluxo da droga em diferentes espécies de *Leishmania* poderiam estar associadas com os mecanismos de resistência (Essodaigui, 1999).

Finalmente, o mecanismo de resistência primário pode ser ocasionado pela inibição da formação da espécie ativa. A diminuição da redução do Sb(V) em Sb(III), observada em formas amastigotas de *L. donovani*, resistentes ao estibogluconato de sódio (Shaked-Mishan, 2001), sugerem que este fator poderia estar envolvido com os mecanismos de resistência, embora até hoje não tenha sido relatado para isolados clínicos.

1.6 Motivos dedos de zinco

O termo dedos de zinco (*zinc finger*, ZnF) foi utilizado pela primeira vez em 1985 para descrever o motivo originado pela sequência de 30 aminoácidos

capaz de interagir com o ADN, identificado no fator de transcrição FTIIIA na espécie de anfíbio chamada *Xenopus laevis*. Nesse motivo, dois resíduos de cisteína e de histidina (Cys₂His₂) se ligam tetraedricamente ao íon Zn(II) (Miller, 1985).

Existem aproximadamente 20 tipos de motivos dedos de zinco formados pelas múltiplas combinações de resíduos de histidina e cisteína que podem se coordenar ao Zn(II), e pelo tipo e número de aminoácidos presentes entre os resíduos que estabilizam o zinco, como exemplificado na Figura 7 (Krishna, 2003). As proteínas desse tipo podem conter de 1 a 40 motivos dedos de zinco (Brayer, 2008). Em proteínas que possuem múltiplos motivos, somente 3 ou 4 ZnF estão envolvidos na interação com o ADN (Lu, 2003).

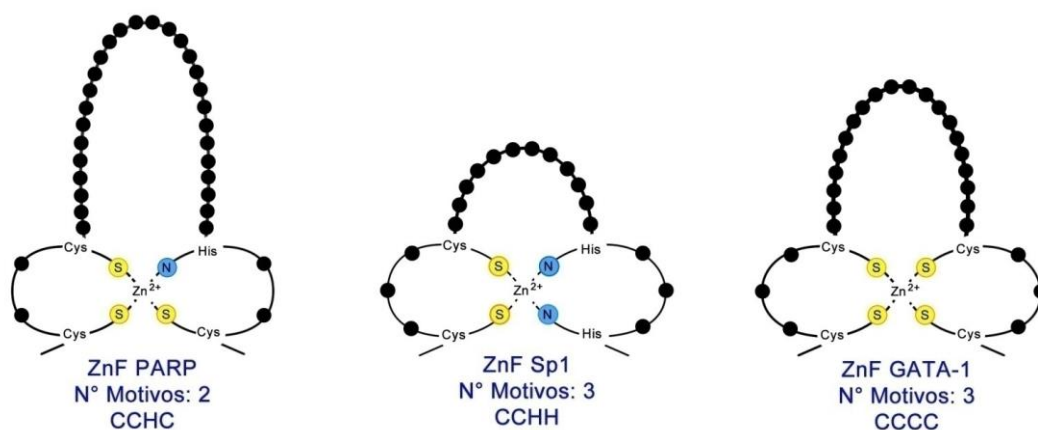


Figura 7- Representação dos motivos dedos de zinco. O nome da proteína, número e o tipo de ZnF são apresentados em cada representação.

No domínio, o átomo de zinco pode estar coordenado a diferentes combinações de resíduos de cisteína e histidina, e a sequência e a quantidade de aminoácidos entre esses resíduos são variáveis. Os tipos mais comuns de modelos são CCCC (Cys-Cys-Cys-Cys), CCHH (Cys-Cys-His-His), CCHC (Cys-Cys-His-Cys) e CCCH (Cys-Cys-Cys-His) (Klug, 1987). Na presença de mais de um desses domínios, é possível encontrá-los em diferentes arranjos na cadeia peptídica, tais como: sequencial, superposto e binuclear (Figura 8) (Berg, 1996).

Estruturas secundárias de proteínas como alfa hélice e folha beta podem estar presentes em motivos dedos de zinco.

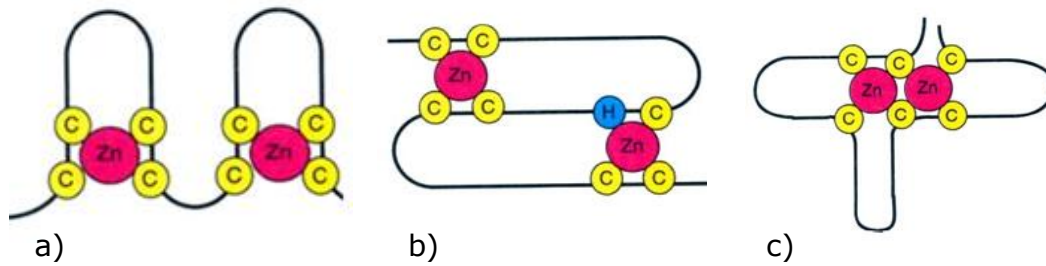


Figura 8- Representação dos arranjos de domínios dedos de zinco nas formas: a) sequencial, b) superposto e c) binuclear.

O papel do íon Zn(II) nesses motivos é meramente estrutural, e em relação a outros metais ele é preferido devido às suas propriedades: a) não participa de reações redox, b) possui uma configuração eletrônica d^{10} , onde a geometria de coordenação não depende da estabilização do campo ligante e c) devido a seu caráter relativamente macio (segundo a classificação de Pearson) quando comparado com os demais metais de transição, pode ligar-se a átomos de N e S presentes nas Cys e His, respectivamente (Lipscomb, 1996).

As funções dessas proteínas são diversas e incluem regulação da expressão gênica, empacotamento do ARN e regulação da apoptose entre outras (Laity, 2001). A liberação ou substituição do íon Zn(II) pode induzir a perda das funções biológicas dessas proteínas, como relatado para a proteína FTIIIA (Makowski, 1992) e proteínas do vírus HIV-1 (Lee, 1996).

Em geral, os motivos dedos de zinco do tipo Cys_2His_2 são os mais abundantes no genoma de células eucariotas, estimativas indicam que no ser humano 3% do genoma codifica este tipo de motivo (Matthews, 2002). O genoma de protozoários kinetoplastídeos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*) codifica principalmente motivos do tipo Cys_3His (Ivens, 2005) envolvidos na regulação do ciclo de vida dos parasitas (Kramer, 2010). A elevada seletividade das interações entre os motivos *dedos de zinco* e segmentos de ácidos nucléicos têm permitido o desenvolvimento de pesquisas de complexos de Co(III) que ligados a essas sequências podem direcionar a inativação de proteínas dedos de zinco do tipo Cys_2His_2 implicadas no desenvolvimento de câncer (Hurtado, 2012).

1.7 Objetivos

- Obter e caracterizar os ligantes polipiridínicos dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz).
- Avaliar a atividade leishmanicida de compostos polipiridínicos em promastigotas de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao Sb(III).
- Obter novos complexos de Sb(III) e Bi(III), com o ligante dppz, fazer sua caracterização físico-química e avaliar a atividade leishmanicida em promastigotas de *Leishmania*.
- Obter novos complexos de Sb(III), com os ligantes bipy, phen e dpq, fazer sua caracterização físico-química e avaliar a atividade leishmanicida em promastigotas de *Leishmania*.
- Avaliar o modo de interação dos complexos polipiridínicos com modelos peptídicos dedos de zinco.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e Métodos

- Faixa de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em um aparelho Mettler FT80, com razão de aquecimento de 4 °C/min.

- Termogravimetria (TG)

As análises térmicas (TG/DTG) foram realizadas em um equipamento da marca Mettler TG-50, modelo STAR. Os estudos foram feitos em atmosfera de ar (50 mL/min) entre 25 e 700 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min.

- Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer FT-IR System Spectrum GX, do Departamento de Química da UFMG. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e os espectros foram obtidos na região de 4000-400 cm^{-1} .

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contornos COSY e HMQC foram obtidos nos espectrômetros Bruker Avance DPX 200 (200 MHz) e DPX 400 (400 MHz) do laboratório de Análises de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Eficiência do Departamento de Química da UFMG. Os solventes empregados na solubilização das amostras foram CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$ usando-se TMS ($\delta=0$) como referência interna.

- Análise de difração de raios X de monocristal

As estruturas cristalográficas foram determinadas em colaboração com os professores Dr. Nivaldo L. Speziali (Departamento de Física, UFMG), e Dr. Bernardo Rodrigues (Departamento de Química, UFMG). As análises de difração de raios X foram feitas à temperatura ambiente em um difratometro Xcalibur Atlas Gemini (Instituto de Ciências Exatas da UFMG).

Os dados de difração de raios X para os complexos [Sb(dppz)Cl₃], [Bi(dppz)₂Cl₃], [Sb(phen)Cl₃] e [Sb(phen)₂Cl₂] foram obtidos à temperatura ambiente, usando radiação monocromática Mo-K α ($\lambda = 0,71069 \text{ \AA}$). A obtenção dos parâmetros de rede e a integração das reflexões foram realizadas usando o programa CRYCALISPRO (Version 1.171.33.55). As estruturas foram resolvidas utilizando o programa SHELXS-97 e refinadas pelo método de mínimos quadrados em F^2 . Todos os átomos, exceto o hidrogênio foram refinados anisotropicamente. Todos os hidrogênios foram geometricamente adicionados na estrutura que foi posteriormente refinada com vínculos.

- Reagentes e tratamento de solventes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os reagentes e a procedência estão listados na Tabela 1.

Tabela 1- Reagentes utilizados na parte experimental.

Reagentes	Procedência
Ácido clorídrico	Aldrich
Ácido nítrico	Merck
Ácido sulfúrico	Merck
Ácido p-tolueno sulfônico	Merck
Brometo de sódio	Aldrich
Diclorometano	Merck
Etanol	Merck
Etilenodiamina	Aldrich
Éter étilico	Merck
Hidróxido de sódio	Aldrich
<i>o</i> -fenilenodiamina	Aldrich
Metanol	Merck
Tricloreto de antimônio	Aldrich
Tricloreto de bismuto	Aldrich

Os solventes metanol e etanol utilizados foram tratados a fim de se eliminar água e outros eventuais resíduos. Cada um dos solventes foi refluxado em magnésio e iodo ressublimado durante 30 minutos e logo separado por destilação simples.

- Medidas de condutância eletrolítica

As medidas de condutância eletrolítica foram feitas utilizando-se um condutivímetro Digimed, modelo DM3, equipado com célula condutimétrica de 3 mL de capacidade e constante igual a 1 cm^{-1} . Para calibrar o equipamento foram usadas soluções padrões de NaCl, KCl, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 na concentração de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMF (5% de DMSO). As determinações da condutância eletrolítica dos complexos foram realizadas nas mesmas condições à temperatura ambiente.

2.2 Síntese dos ligantes dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

2.2.1 Síntese da dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq)

A síntese desse composto foi feita seguindo o protocolo reportado por Delgadillo (Delgadillo, 2003). Dissolveram-se 0,50 g de 1,10-fenatrolina-5,6-diona (2,4 mmol) em 35 mL de etanol, após completa solubilização adicionou-se 700 μL de etilendiamina (4,1 mmol) e traços de ácido p-tolueno sulfônico como catalisador da reação. A mistura foi colocada em refluxo durante 12 horas, em seguida, o condensador foi retirado para eliminar parte do solvente por evaporação. O aquecimento foi interrompido depois da formação de um sólido bege o qual foi filtrado e lavado em um funil de büchner com água e 40 mL de éter etílico. O sólido foi seco em linha de vácuo, a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 6 horas. Foram obtidas 0,315 g do produto.

2.2.2 Síntese da dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

A síntese do ligante dppz foi feita seguindo o protocolo reportado por Liang e colaboradores (Liang,2003).

Dissolveram-se 0,515 g de 1,10-fenatrolina-5,6-diona (2,5 mmol) em 15 mL de etanol. Após completa solubilidade foi adicionada uma solução de 0,530 g de o-fenilendiamina (4,1 mmol) em 10 mL de etanol e traços de ácido p-tolueno sulfônico como catalisador da reação. A mistura foi colocada em refluxo durante 4 horas, em seguida o condensador foi retirado para eliminar o solvente por evaporação. O aquecimento foi interrompido depois da formação de um sólido marrom, o qual foi lavado em um funil büchner com 60 mL de etanol frio e 60 mL de éter etílico frio. O sólido foi seco em linha de vácuo a 40 °C durante 6 horas e finalmente foi purificado por recristalização em 40 mL de metanol e seco em estufa a 100 °C. Foram obtidas 0,5499 g do produto.

2.3 Preparação dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃]

2.3.1 Preparação do complexo [Sb(dppz)Cl₃]

O complexo de Sb(III) foi obtido por adição lenta de 0,4 mmol do correspondente ligante dppz dissolvido em 10 mL de metanol a 15 mL de uma solução metanólica do sal SbCl₃, em uma relação molar ligante-metal 1:1. A solução foi agitada magneticamente, a 40 °C, durante 6 horas. Depois de resfriado à temperatura ambiente, o sólido obtido foi filtrado, lavado com clorofórmio e seco em linha de vácuo, a 40 °C durante 10 horas. Foram obtidas 0,159 g do produto.

2.3.2 Preparação do complexo [Bi(dppz)Cl₃]

O complexo de Bi(III) foi obtido por adição lenta de 0,4 mmol do ligante dppz dissolvido em 10 mL de metanol a uma solução metanólica do sal

BiCl_3 , em uma relação molar ligante-metal 1:1 . A solução foi agitada à 40 °C durante 6 horas. Depois de resfriado à temperatura ambiente, o sólido obtido foi filtrado, lavado com clorofórmio e seco em linha de vácuo à 40 °C durante 10 horas. Foram obtidas 0,196 g do produto.

2.4 Preparação dos complexos de Sb(III) com 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenantrolina (phen) e dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq)

O sal dicloreto de fenilantimônio [ϕSbCl_2] foi preparado por reação de reorganização de uma mistura de SbCl_3 e trifenilantimônio, na relação molar 2:1 de acordo com o protocolo descrito por Nunn e colaboradores (Nunn, 1983).

Os complexos foram obtidos de acordo com o procedimento relatado por Nunn (Nunn, 1996), por adição lenta de 0,2 mmol do respectivo ligante (bipy, phen ou dpq), dissolvidos em 10 mL de clorofórmio a 15 mL de uma solução de clorofórmio do respectivo sal (SbCl_3 ou ϕSbCl_2), em uma relação molar ligante-metal 1:1. A solução formada foi mantida em refluxo por 1 hora. O precipitado da reação foi separado por filtração a quente da suspensão e o sólido obtido foi lavado com clorofórmio e seco à 40 °C, em linha de vácuo, durante 6 horas.

2.5 Testes Biológicos

Os testes de atividade antileishmania em promastigotas e de toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo foram realizados em colaboração com o professor Dr. Frédéric Frézard do Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG. Os testes foram realizados pelos alunos Pricila Gomes Reis (doutorado) e Moan Felipe Moan Berbet (iniciação científica).

2.5.1 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania

- Linhagem de parasitas de *Leishmania*

Parasitas de *Leishmania (leishmania) amazonensis* (linhagem MHOM/BR/1989/BA199) e de *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* (linhagem MCAN/BR/2002/BH400) foram incubados a 25 °C em meio α -MEM, suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 100 mg/mL de kanamicina, 50 mg/mL de ampicilina, 2 mM de L-glutamina, 5 mg/mL de hemina e 5 mM de biopterina.

- Parasitas resistentes ao Sb(III)

Promastigotas das espécies de *Leishmania amazonensis* (BA199Sb2700.2) e *Leishmania infantum chagasi* (BH400Sb2007.2) resistentes ao Sb(III), foram obtidos por um método descrito previamente por Oullette e colaboradores (Oullette; 1991). Para obtenção dos mutantes as cepas sensíveis ao Sb(III) de *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* foram incubadas em meio α -MEM, em presença de concentrações crescentes de Sb(III) até concentrações de 2.700 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

- Método espectrofotométrico

A atividade antileishmania foi avaliada por espectrofotometria no visível (λ 600 nm) em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), mediante a determinação da concentração do composto que inibe o crescimento celular dos parasitas em 50 % (CI₅₀) em relação ao crescimento das parasitas não tratadas com os compostos (Ouellette; 1990).

Promastigotas de *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* em fase de crescimento logarítmica, foram diluídos em α -MEM e depositadas em placas de 24 poços, de forma a se obter 1,5 mL de suspensão com a concentração final de 1×10^6 parasitas mL^{-1} . Os parasitas foram incubados com diferentes concentrações dos compostos, a 25 °C, em agitação constante por 72 horas. Outros grupos de parasitas foram tratados com tartarato de antimônio(III) e potássio (controle positivo), SbCl₃ e BiCl₃. As soluções

estoques (5 mM) dos complexos, do ligante e dos sais dos metais foram preparados em DMSO e posteriormente diluídas no mesmo meio de cultura até a faixa de concentração do teste, sem exceder a concentração do DMSO em 0,2 %, concentração relatada como não tóxica em parasitas de *Leishmania* (Ma, 2004; Habtemariam, 2003). Foram testadas por triplicata 10 concentrações dos compostos na faixa de 0 – 2,0 uM, em três experimentos independentes.

Os valores de concentração inibitória CI_{50} foram calculados das curvas de crescimento dos parasitas medindo a absorvância em 600 nm (Ouellette, 1990), utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. Todos os testes foram feitos em triplicata, em três experimentos independentes.

2.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica

Para os ensaios de toxicidade, *in vitro*, dos complexos foram usados macrófagos de camundongo extraídos da cavidade intraperitoneal.

A atividade citotóxica dos compostos foi determinada por ensaio colorimétrico usando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), de acordo com o protocolo relatado por Mosmann (Mosmann, 1983). Este protocolo baseia-se na capacidade das células viáveis intactas de reduzirem o sal de tetrazólio por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas.

As células foram incubadas em placas de 96 poços, com o volume de células ajustado para $4,0 \times 10^6$ macrófagos por poço em um volume final de 0,1 mL. Os macrófagos foram incubados à 37 °C em atmosfera de 5% CO_2 por 2 horas, para aderências dos macrófagos aos poços. Após o período de incubação as células não aderidas foram removidas por lavagem com meio RPMI. Os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença dos compostos ($1- 20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio RPMI com 10% de SBF à 37 °C em atmosfera de 5% CO_2 por 24 horas. Como controle positivo do experimento, macrófagos aderidos foram incubados na presença apenas de RPMI 1640 completo. Após o período de incubação com as drogas o meio foi trocado e as células novamente incubadas com MTT (0,5 mg/mL) por 4 horas.

Os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, onde a densidade ótica foi lida em comprimento de onda de 572 nm.

Os valores de concentração citotóxica CC_{50} foram calculados das curvas dose-resposta quando a concentração do composto induziu 50% de morte dos macrófagos, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. Todos os testes foram feitos em triplicata, em três experimentos independentes.

2.5.3 Estudo da interação com modelo de peptídeo dedos de zinco

Foi utilizado um modelo de peptídeo derivado da proteína nucleocapsídica NCp7 do vírus HIV. O peptídeo apresenta um motivo dedo de zinco do tipo CCHC e a seguinte sequência de aminoácidos KGCWKCGKEYHQMKDCTE (KGC).

Experimentos da interação dos complexos com o peptídeo foram realizados através da técnica de dicroísmo circular (DC). Realizou-se uma comparação dos espectros de absorção da radiação dicroica circular para soluções do peptídeo livre e do peptídeo incubado por 10 minutos com os complexos na relação molar 1:1. Um volume de 2,5 mL de uma solução $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ do peptídeo KGC, em tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 7,2), foi adicionado em uma cubeta de 1 cm de caminho ótico e os espectros de DC foram registrados, à $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em um espectropolarímetro Chirascan Spectropolarimeter (Applied Photophysics, UK), na região de comprimentos de onda entre 240-400 nm. Os espectros de DC das soluções do peptídeo e dos complexos na relação 1:1 foram registrados nas mesmas condições. Todos os espectros apresentados correspondem a uma média de cinco varreduras. O espectro do tampão feito nas mesmas condições foi subtraído a cada espectro.

2.5.4 Estudo do deslocamento do zinco

O modelo dedo de zinco, Zn(II)-KGC, foi preparado com uma solução equimolar do peptídeo KGC e acetato de zinco ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), em tampão

fosfato ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), incubado durante 20 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera de argônio.

O experimento de competição entre a 1,10-fenantrolina e os modelos dedos de zinco foi realizado através da comparação dos espectros de dicroísmo circular das soluções do peptídeo livre, e do modelo de dedo de zinco que foi incubado por 10 minutos com a phen na relação molar 1:1. Todos os espectros apresentados correspondem a uma média de cinco varreduras. O espectro do tampão feito nas mesmas condições foi subtraído a cada espectro.

2.6 Determinação do coeficiente de partição n-octanol/água

Os coeficientes de partição dos complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ foram determinados em sistema n-octanol(saturado de água)/água (saturado de n-octanol) mediante o método do *Shake-flask*. Para obter as soluções de n-octanol saturado com água e de água saturado com n-octanol, volumes iguais de água e n-octanol foram misturados e agitados mecanicamente por 24 horas, posteriormente centrifugadas por 5 minutos e as fases separadas por decantação. Assim obteve-se uma solução de água saturada de n-octanol (*água-oct*) e uma solução de n-octanol saturada de água (*n-octanol-ág*).

A partir de soluções estoques dos complexos de Sb(III) e Bi(III) ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em DMSO), foram preparadas soluções diluídas dos complexos em n-octanol saturado com água, com a concentração final de 10 e $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Depois, foram preparados diferentes sistemas de partição, na relação *octanol-ág/água-oct*, 1:1, 1:2 e 2:1. A mistura foi agitada mecanicamente por 10 minutos e centrifugada por 5 minutos. Após a separação das fases, a concentração do complexo no sistema n-octanol saturado com água foi determinado por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta ($\lambda = 271 \text{ nm}$).

A estabilidade do ligante dppz e dos complexos foi investigada por espectroscopia de absorção na região UV, nas mesmas condições experimentais de concentração e sistema de partição. Os espectros dos complexos foram diferentes daqueles do ligante, e não foram observadas mudanças significativas em função do tempo.

O coeficiente de partição é obtido pela divisão da concentração do complexo na fase oleosa pela concentração do complexo na fase aquosa ($P=C_{oct}/C_{\acute{a}gua}$). O erro relatado corresponde ao desvio padrão das 6 medidas obtidas no protocolo.

Os valores da concentração dos complexos foram calculados pela equação de Beer-Lambert, que descreve a curva do gráfico da absorvância dos padrões dos complexos (em n-octanol saturado com água) contra a concentração dos mesmos.

O cálculo do valor de log P para o ligante dppz foi feito pelo programa *on line* ALOGPS 2.1, disponível no *Virtual Computational Chemistry Laboratory* (VCL; 2012).

3 DERIVADOS POLIPIRIDÍNICOS COMO AGENTES LEISHMANICIDAS

3.1 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenatrolina (phen), dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz)

Embora, existam vários relatos na literatura da atividade antiparasitária de complexos metálicos contendo os ligantes polipiridínicos dppz e dpq (Navarro, 2003: 2007), não existem relatos quantitativos da atividade intrínseca desses ligantes contra esses parasitas. No caso particular do ligante dppz, foi relatada a atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, mas os valores quantitativos dessa atividade não foram relatados. A baixa solubilidade do dppz foi a justificativa dada pelos autores para a impossibilidade da determinação da IC₅₀ (Benítez, 2009).

Apesar dos ligantes polipiridínicos de menor tamanho como a phen e a bipy, serem mais solúveis e de existir relatos da atividade antiparasitária de complexos metálicos contendo esses ligantes, não há relatos da atividade leishmanicida desses ligantes, os quais são considerados ligantes auxiliares na estabilização de complexos ternários (Boutaleb-Charki, 2009)

3.1.1 Caracterização físico-química dos ligantes polipiridínicos dpq e dppz

Foram sintetizados os compostos dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) como descritos na seções 2.2.1 e 2.2.2 da parte experimental, respectivamente.

As fórmulas moleculares, temperaturas de fusão, massas molares, rendimentos das reações, e análises elementares para os compostos dppz e dpq estão apresentados na Tabela 2. As estruturas desses compostos são mostradas na Figura 9.

Existe na literatura a caracterização dos compostos dpq e dppz por diferentes métodos físicos de análise, portanto, a caracterização desses compostos, neste trabalho, foi baseada na comparação com os dados obtidos de temperatura de fusão, bandas características dos espectros no infravermelho e sinais de RMN de ^1H da literatura (Navarro, 2003; Che, 2006).

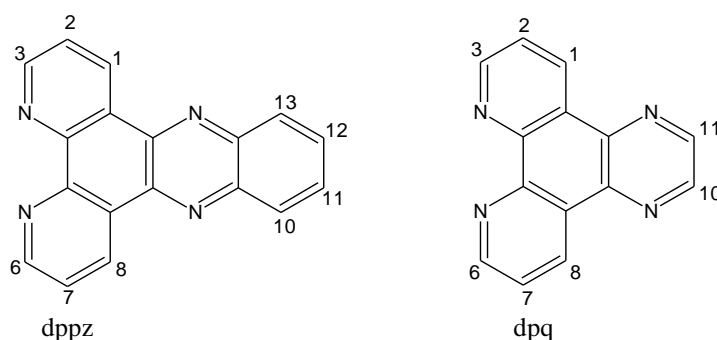


Figura 9- Estruturas dos compostos dppz e dpq

Tabela 2– Fórmula molecular, temperaturas de fusão, massas molares, rendimento das reações e análise elementar para os derivados polipiridínicos dpq e dppz.

Composto	Fórmula molecular	PF(°C)	MM (g mol^{-1})	Rendimento (%)	Análise Elementar		
					%C	%H	%N
dpq	C ₁₄ H ₈ N ₄	208-209	232	57	71,20 (71,78)	3,80 (4,30)	24,00 (23,92)
dppz	C ₁₈ H ₁₀ N ₂	250	282	78	75,60 (76,58)	3,30 (3,57)	19,20 (19,85)

PF: ponto de fusão; R.R: rendimento da reação; (valores teóricos)

3.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos compostos dpq e dppz

Nas Figuras 10 e 11 estão ilustrados os espectros no infravermelho dos compostos dpq e dppz, e as atribuições dos sinais estão descritos na Tabela 3.

As atribuições das principais bandas no IV (KBr) para o dpq e dppz relatadas por Che *et al*, coincidem com as bandas obtidas para esses ligantes neste trabalho (Che, 2006). Observou-se nos espectros no IV

desses ligantes, a presença das bandas correspondentes ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N})$ na região espectral de $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3– Atribuições dos sinais da absorção no infravermelho do dpq e dppz – suporte KBr.

Composto	Número de Onda, cm^{-1} (intensidade)	Atribuições
dpq	3036(m), 3008 (m)	$\nu \text{Csp}^2\text{-H}$
	1630 (m), 1582(m), 1572(m), 1466(m), 1390(m)	$\nu \text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$
	1118(m)	$\nu \text{C-N}$
	1117(F), 804(m), 740(F)	$\gamma \text{Csp}^2\text{-H}$
dppz	3048(m), 3018(m)	$\nu \text{Csp}^2\text{-H}$
	1626(m), 1572(m), 1488(m)	$\nu \text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$
	1072(F)	$\nu \text{C-N}$
	1134(m), 810(m), 740(F)	$\gamma \text{Csp}^2\text{-H}$
	3410(F)	$\nu \text{O-H}$

Para o espectro do dpq, as bandas em $1630, 1582, 1572$ e 1466 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$, enquanto que para o dppz esses estiramentos aparecem em $1626, 1572$ e 1488 cm^{-1} (Navarro, 2003). A banda larga em 3432 e 3410 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H é devida principalmente à presença de moléculas de água presente no dpq e dppz, respectivamente. No espectro do dpq foi observada a banda de deformação axial simétrica do CO_2 atmosférico em 2630 cm^{-1} .

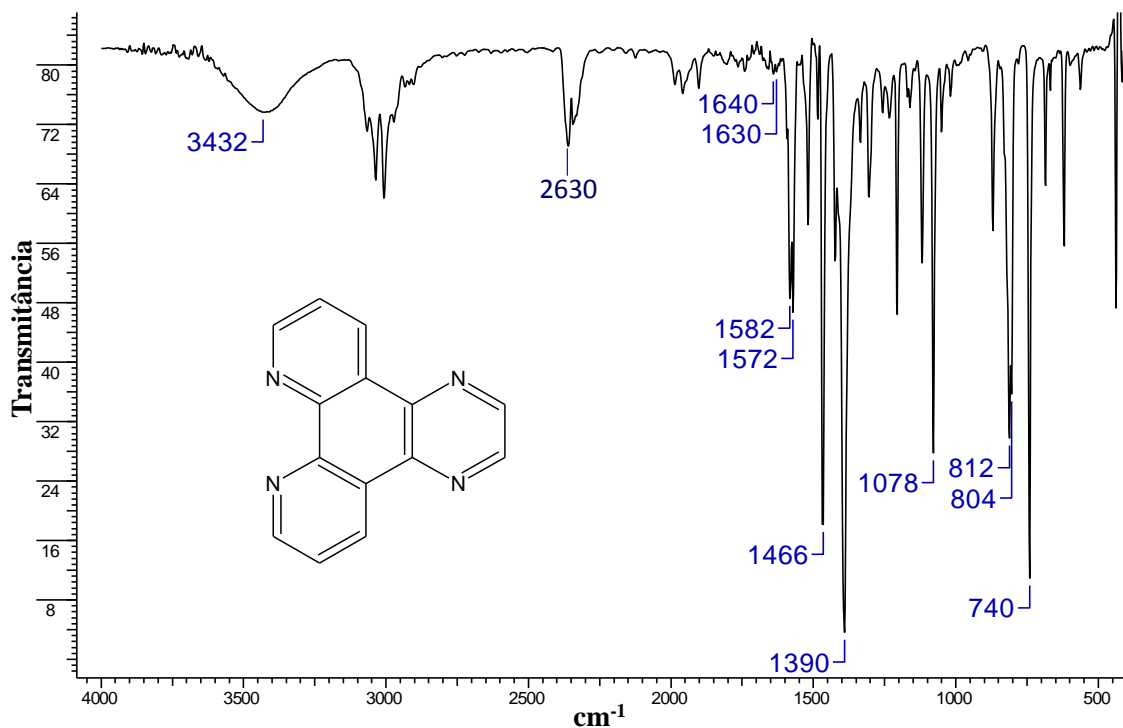


Figura 10– Espectro no IV do composto dpq – suporte KBr (4000-400 cm⁻¹).

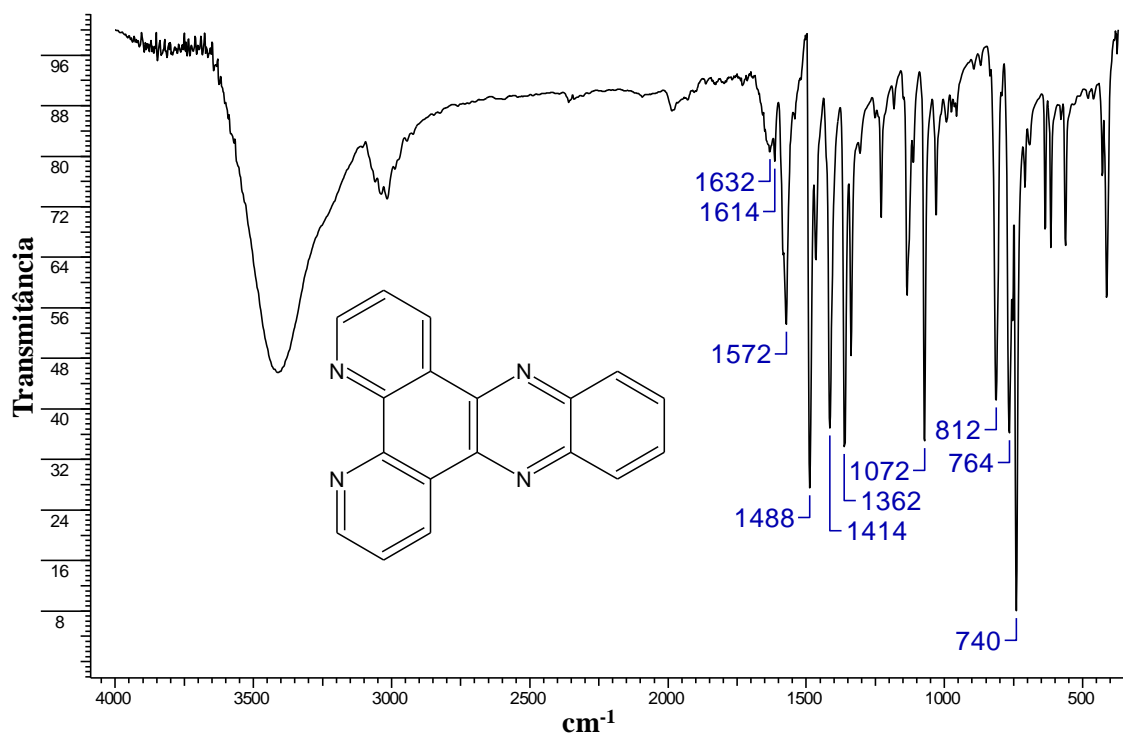


Figura 11– Espectro no IV do composto dpz – suporte KBr (4000-400 cm⁻¹).

3.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos ligantes dpq e dppz

Os espectros de RMN de ^1H do dpq e do dppz estão apresentados nas Figuras 12 e 13 e as atribuições dos sinais estão descritos na Tabela 4. As atribuições dos sinais de hidrogênio para o dpq e dppz estão de acordo com os dados relatados por Che e colaboradores (2006). O espectro do composto dpq apresenta quatro sinais, sendo um duplete correspondente aos hidrogênios H(3,6; δ 9,24 ppm), dois duplos dupletos correspondente a H(1,8; δ 9,46ppm); H(2,7; δ 7,97 ppm) e um singlete correspondente ao H(10,11; δ 9,18 ppm).

O espectro do composto dppz apresenta cinco sinais, sendo todos os sinais duplos dupletos correspondentes aos hidrogênios H(1,8; δ 9,53ppm); H(3,6; δ 9,22 ppm); H(10,13; δ 8,39 ppm); H(11,12; δ 8,06 ppm), e H(2,7; δ 7,94 ppm).

Tabela 4– Atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênios (ppm) para os ligantes dpq e dppz, em DMSO- d_6 .

Atribuições H	dpq	Atribuições H	dppz
H(1,8)	9,46(9,45)	H(1,8)	9,53
H(2,7)	7,97(7,77)	H(2,7)	7,94
H(3,6)	9,24(9,27)	H(3,6)	9,21
H(10,11)	9,18(8,95)	H(10,13)	8,39
		H(11,12)	8,06

Os valores entre parênteses para o dpq correspondem aos sinais de RMN ^1H obtidos em CDCl_3

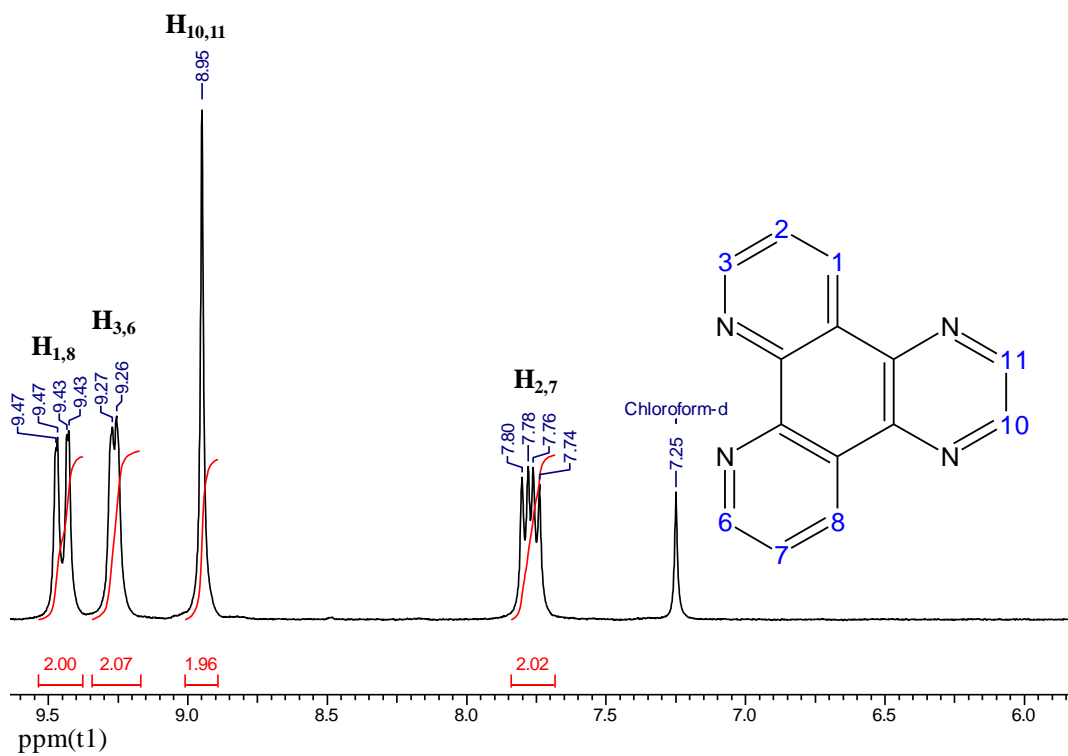


Figura 12- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ligante dpq.

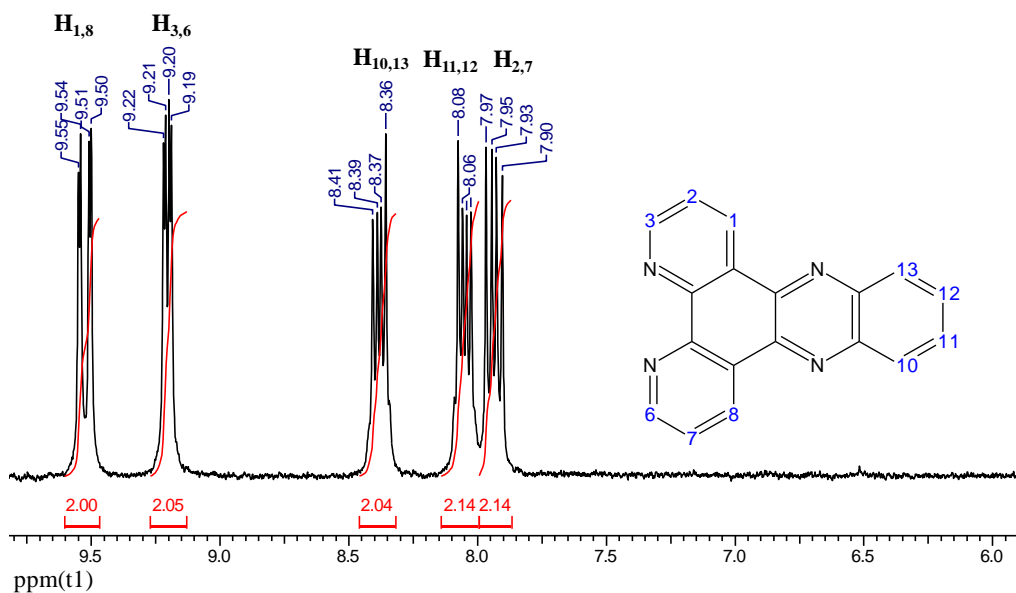


Figura 13- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do ligante dppz.

3.1.4 Avaliação da atividade leishmanicida

A atividade antileishmania foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), mediante a determinação da concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas (CI_{50}). Os testes foram realizados de acordo com o procedimento descrito na seção 2.5.1.

Os resultados dos valores da CI_{50} para cada um dos compostos são apresentados na Tabela 5.

Todos os compostos polipiridínicos apresentaram forte atividade antileishmania, com valores de CI_{50} muito inferiores aos obtidos para o fármaco controle, o tartarato de antimônio(III) e potássio .

Os compostos dpq e dppz mostraram maior atividade para a cepa *L. chagasi*, com valores de CI_{50} entre 0,81-1,86 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para dppz e entre 0,69- 0,85 nmol L^{-1} para o dpq. Enquanto a phen mostrou-se mais seletiva para a *L. amazonensis* com valores de CI_{50} entre 0,49-0,84 nmol L^{-1} .

Tabela 5– Valores de CI_{50} dos derivados polipiridínicos contra parasitas de Leishmania.

Cepa	$(CI_{50}) \pm \text{MEP}$				
	dpq nmol L^{-1}	dppz $\mu\text{mol L}^{-1}$	bipy nmol L^{-1}	phen nmol L^{-1}	TA $\mu\text{mol L}^{-1}$
<i>L. chagasi</i> S-Sb(III)	0,69±0,1	0,81±0,04	15,84±1,4	7,78±2,3	100±3
<i>L. chagasi</i> R-Sb(III)	0,85±0,2	1,86±0,08	21,70±2,6	2,29±0,5	>2700
<i>L. amazonensis</i> S-Sb(III)	2,23±0,2	>2	16,18±1,5	0,84±0,1	83±1
<i>L. amazonensis</i> R-Sb(III)	1,52±0,4	2,00±0,05	7,43±1,7	0,49±0,07	>2700

TA-tartarato de antimônio(III) e potássio , fármaco controle; MEP-média do erro padrão; S-Sb e R-Sb sensível e resistente ao Sb(III), respectivamente

A principal mudança dos compostos analisados neste trabalho é o incremento de anéis aromáticos e heteroaromáticos na série. Esperava-se que esse aumento favorecesse a atividade dos compostos, no entanto, as

atividades antileishmania para o dppz foram muito menores que para a bipy, phen e dpq com valores de CI_{50} na ordem micromolar para o dppz, enquanto que para a bipy, a phen e o dpq estiveram na ordem nano molar.

As diferenças significativas da atividade antileishmania entre o dppz e os demais compostos polipiridínicos, sugere um mecanismo de ação diferente entre esses compostos. Não obstante, a diferença da atividade leishmanicida também poderia ser induzida por efeitos de solubilidade. Nesse caso, a maior extensão do composto polipiridínico dppz seria a responsável pela baixa solubilidade nos meios de ensaio desse composto, limitando sua biodisponibilidade, o que não ocorreria com a bipy, a phen e o dpq que são mais solúveis (Harlos, 2008).

Devido à maior extensão do sistema aromático nos compostos dppz e dpq, o mecanismo de ação mais provável deveria envolver a interação com o ADN, como relatado para um análogo catiônico do dppz que apresentou uma forte interação com o ADN (Phillips, 2004), porém eles também poderiam atuar como agentes quelantes. Em contraste, para a bipy e a phen pode-se sugerir um mecanismo de ação relacionado com a perda da atividade biológica de metalopeptidases (Alves, 2004; Choudhury, 2010) ou de proteínas dedos de zinco (Makowski, 1992) do parasita. A elevada constante de equilíbrio do sistema $Zn(II)$ -phen $\sim 1,5 \times 10^6$ (Eatough, 1970) e $Zn(II)$ -bipy $2,5 \times 10^5$ (Yamasaki, 1956) em meio aquoso suportaria essa hipótese.

Os resultados da atividade leishmanicida para o composto dppz apresentam-se similares aos relatados para diversas substâncias químicas naturais e sintéticas determinadas também em formas promastigotas, sendo seus valores de CI_{50} da ordem de micromolar. Entretanto, os resultados obtidos para a bipy, phen e dpq foram surpreendentes, pois esses compostos se mostraram extremadamente ativos. É importante dizer que não existem relatos de valores de CI_{50} na ordem de nanomolar, como os obtidos neste trabalho, para a bipy, a phen e o dpq. Alguns dos relatos de atividade leishmanicida em formas promastigotas envolvem as nitrobenzenosulfonamidas (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. Guayanensis*, *L. amazonensis*; valores de CI_{50} 3,1- 18,2 μmolL^{-1}) (Bilbao-Ramos, 2012)

derivados do nitrofurano (*L. major*; valores de CI_{50} 10,73-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Behrouzi-Fradmoghadam, 2008), 1,4-dihidropiridinas (*Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V) braziliensis* e *Leishmania major*; valores de CI_{50} 2,6- 181 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Reimão, 2010); compostos nitroaromáticos (*Leishmania (L.) amazonensis*; valores 50,6 - > 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Lopes, 2011).

É importante ressaltar que, embora o fármaco de controle, o tartarato de antimônio e potássio, seja a mais ativa e tóxica das drogas antimoniais, sua atividade antileishmania frente aos compostos polipiridínicos foi muito inferior.

3.1.5 Atividade citotóxica

O procedimento do teste de toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo foi descrito na seção 2.5.2.

Ao comparar os resultados de toxicidade dos compostos polipiridínicos (Tabela 6), observou-se que não há relação da toxicidade com a extensão do sistema aromático, sendo o composto phen o mais tóxico da série com valores de CC_{50} na ordem de nmol L^{-1} , enquanto que os valores para a bipy, o dpq e o dppz estiveram na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O composto dpq apresentou o maior valor de índice de seletividade, sendo 750 e 2415 vezes mais seletivo contra *L. infantum chagasi* que o dppz e a phen, respectivamente.

Tabela 6–Toxicidade dos compostos bipy, phen, dpq e dppz contra macrófagos peritoneais de camundongo.

	bipy	phen	dpq	dppz
CC₅₀	> 20,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$	37,36 nmol L^{-1}	> 8,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$	12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
IS	>1262	4,8	>11594	15,4

CC_{50} : concentrações que induzem 50% de toxicidade em macrófagos. IS: índice de seletividade, calculado como a razão entre o CC_{50} em macrófagos de camundongo e o CI_{50} em *L. infantum chagasi* SSb.

4 COMPLEXOS DE Sb(III) E Bi(III) COM DPPZ

Complexos metálicos contendo o ligante dppz caracterizam-se por sua elevada afinidade pelo ADN e excelentes propriedades fotoquímicas. As aplicações potenciais desses complexos na medicina são muito amplas, como relatado nas últimas décadas por vários grupos de pesquisa, exemplos são o seu potencial uso como fotosensibilizadores na terapia fotodinâmica (Sasmal, 2007) e como sondas fluorescentes (Zhang, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que complexos de Au(III) e Cu(II) com o dppz possuem elevada atividade contra protozoários kinetoplastídeos, os quais mostraram-se fortemente ativos contra parasitas de leishmania (Navarro, 2003; 2007) e, posteriormente, foi relatado que o complexo de V(IV) apresentava elevada atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Benítez, 2009).

Foram obtidos dois complexos inéditos de Bi(III) e Sb(III) com o dppz, que foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . As estruturas cristalográficas dos complexos foram determinadas mediante o método de difração de raios X de monocristal.

4.1 Caracterização físico-química dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III).

Foram sintetizados complexos de dppz a partir dos sais SbCl_3 e BiCl_3 , como descrito no item 2.3 da parte experimental.

As fórmulas moleculares, temperaturas de fusão, massas molares, rendimentos das reações, valores da condutividade e os resultados das análises elementares para os complexos de dppz estão apresentados na Tabela 7. Os resultados das análises elementares e condutimétricas sugerem a formação de complexos neutros como representado na Figura 14.

Tabela 7– Fórmula molecular, temperatura de fusão, massas molares, rendimento da reação, condutividade molar e análise elementar para os complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃].

Composto	$(\mu\text{S}/\text{cm})$ DMF (5% DMSO)	Fórmula molecular	PF (°C)	MM ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	R.R (%)	Análise Elementar		
						%C	%H	%N
[Sb(dppz)Cl ₃] CH ₃ OH H ₂ O	11,7	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₃ N ₄ SbO _{1,25}	250	510	78	41,21 (41,70)	2,73 (2,65)	10,25 (10,24)
[Bi(dppz)Cl ₃]	12,62	C ₁₈ H ₁₀ BiCl ₃ N ₄	340	597	82	36,21 (36,15)	1,63 (1,67)	9,19 (9,37)

PF: ponto de fusão; R.R: rendimento da reação; (valores teóricos)

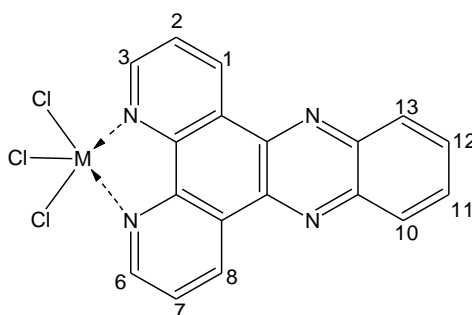


Figura 14– Representação genérica dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃].

4.2 Resultados das análises termogravimétricas dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III)

As curvas TG/DTG obtidas para os complexos [Bi(dppz)Cl₃] e [Sb(dppz)Cl₃]MeOH.H₂O são mostradas nas Figuras 15 e 16.

A análise das curvas TG/DTG do complexo [Bi(dppz)Cl₃] mostrou que a decomposição se dá em três etapas (Figura 15). A primeira, entre 28,76 e 431,32 °C (38,47%) e a segunda entre 431,32 e 488,77 °C (3,4%) relacionadas à perda de matéria orgânica.

Na terceira etapa entre 488,77 e 750,02 (18,21%), a porcentagem de resíduo obtida, 39,92%, é atribuída à formação de óxidos de Bi, sendo esse valor muito próximo ao valor teórico (38,81%).

A análise das curvas TG/DTG do complexo [Sb(dppz)Cl₃]MeOH.H₂O mostrou que a decomposição também se dá em três etapas (Figura 16). A primeira

entre 32,61- 201,52 °C, é responsável pela saída das moléculas de cristalização, sendo 1,0 molécula de água e 1,0 molécula de MeOH (8,67%).

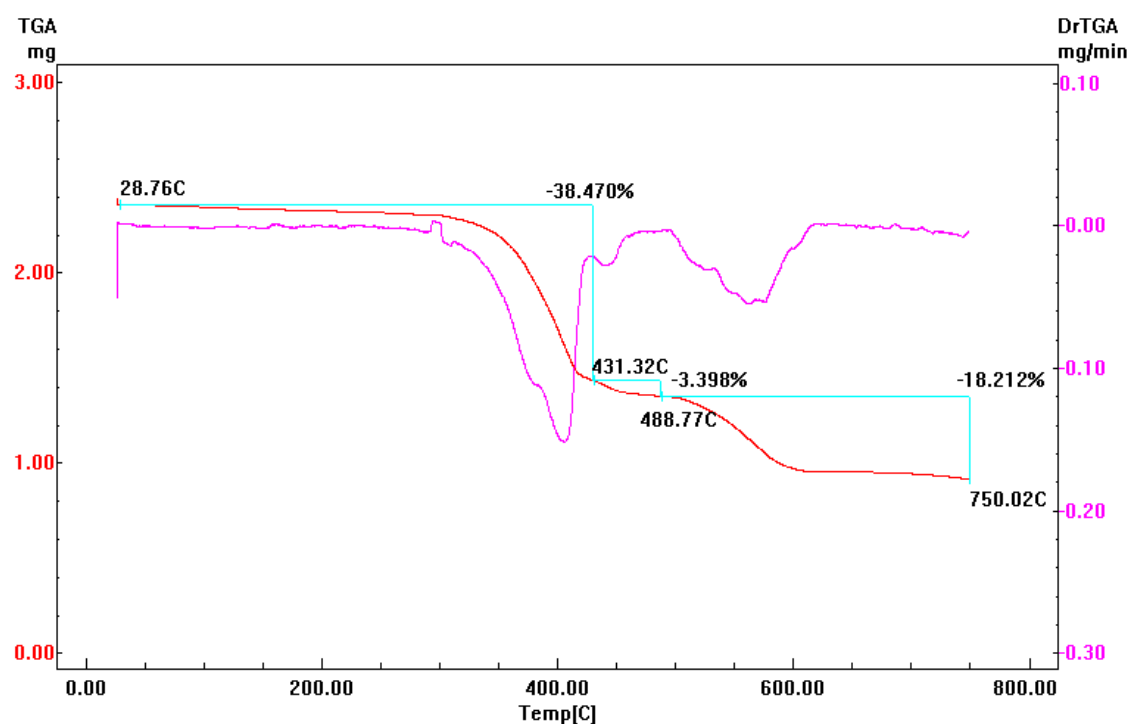


Figura 15– Curvas de TG(rox) e DTG(vermelha) do complexos $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$.

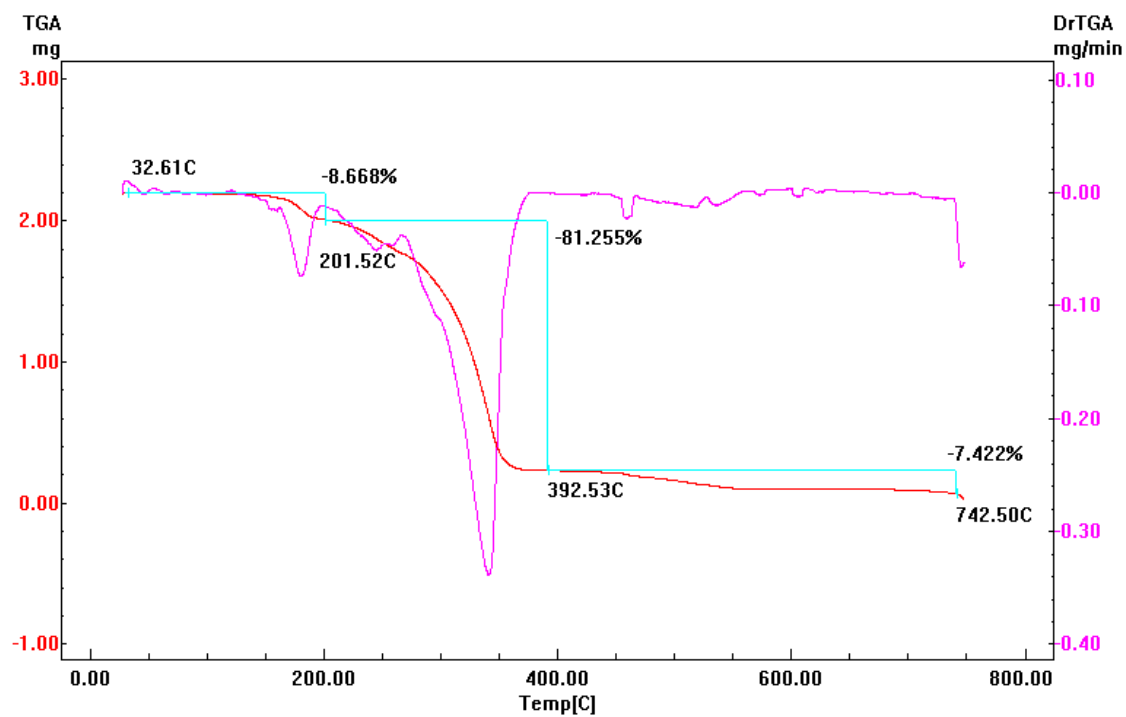


Figura 16– Curvas de TG(rox) e DTG(vermelha) do complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$.

A segunda entre 201,52 e 392,53 °C (81,26%) e a terceira entre 392,53 e 742,53(7,42%), estão relacionadas à decomposição do complexo e a perda de matéria orgânica.

No entanto, os dados obtidos através da TG para o complexo [Sb(dppz)Cl₃]MeOH·H₂O não nos fornecem cálculos consistentes com a presença de óxidos de Sb, sendo esse percentual (2,66%) muito menor do que o valor teórico. Possivelmente, essa diferença é devida à volatilização da espécie do Sb (estibina) que pode ser gerada.

4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos de dppz com Sb(III) e Bi(III)

Nas Figuras 17 e 18 estão ilustrados os espectros no infravermelho dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃], e as atribuições dos sinais do ligante e dos complexos estão descritos na Tabela 8.

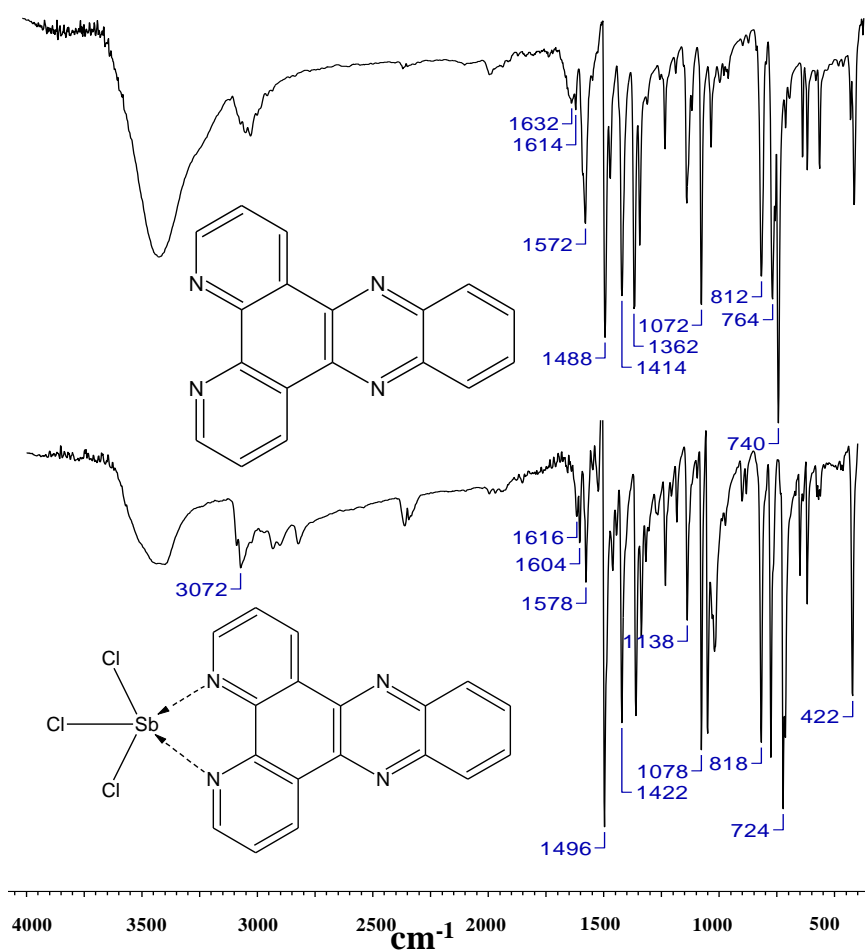


Figura 17– Espectro no IV do complexo [Sb(dppz)Cl₃] e do ligante dppz - suporte KBr.

Nesses espectros destacam-se as bandas da região de 1626-1338 cm^{-1} correspondentes às vibrações $\nu(\text{C}=\text{N})$ e $\nu(\text{C}=\text{C})$, as quais foram fortemente afetadas com relação ao ligante livre. A vibração atribuída ao $\nu(\text{C}=\text{N})$, que encontra-se em 1658-1626 cm^{-1} no espectro do dppz livre desloca-se para 1616-1604 cm^{-1} no espectro do complexo de Sb(III) e para 1646-1586 cm^{-1} no complexo de Bi(III), indicando a coordenação do metal com os nitrogênios (Navarro, 2007). A vibração atribuída ao $\nu(\text{C}-\text{N})$ que encontra-se em 1074 cm^{-1} no espectro do dppz livre, desloca-se para 1078 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} , nos espectros dos complexos de Sb(III) e Bi(III), respectivamente, reforçando a formação da ligação do metal com os nitrogênios.

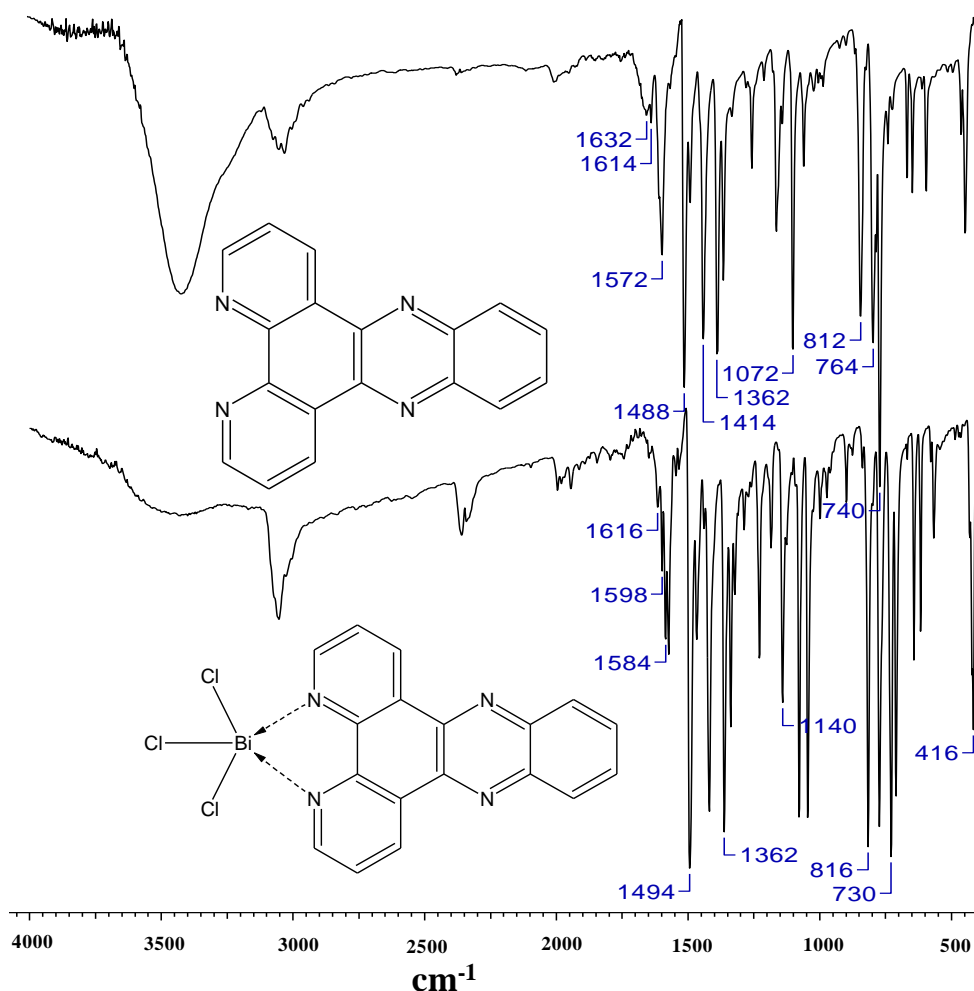


Figura 18– Espectro no IV do complexo $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e do ligante dppz - suporte KBr.

Tabela 8– Atribuições das principais bandas de absorção no IV do ligante dppz e dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃] – suporte KBr.

Composto	Absorção IV, cm ⁻¹ (intensidade)	Atribuições
dppz	3048(m), 3018(m)	ν Csp ² -H
	1626(m), 1586(m), 1574(m), 1488(m)	ν C=C, C=N
	1074(F)	ν C-N
	1134(m), 810(m), 740(F)	γ Csp ² -H
[Sb(dppz)Cl ₃]	3072(m), 3026(m)	ν Csp ² -H
	1614(m), 1604(m), 1578(m), 1494(F), 1422(m)	ν C=C, C=N
	1078(F)	ν C-N
	1138(m), 818(m), 724(F)	γ Csp ² -H
[Bi(dppz)Cl ₃]	3052(m), 3028(m)	ν Csp ² -H
	1616(m), 1598(m), 1584(m), 1494(F)	ν C=C, C=N
	1078(F)	ν C-N
	1140(m), 816(m), 730(m)	γ Csp ² -H

4.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos de dppz com Sb(III) e BI(III)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do complexo [Sb(dppz)Cl₃] estão apresentados nas Figuras 19 e 20. As atribuições dos sinais de ¹H foram feitas através da comparação com os deslocamentos químicos e as multiplicidades para o ligante dppz livre (Navarro, 2003). As atribuições dos carbonos e hidrogênios foram feitas com o auxílio de mapas de contorno HMQC.

As atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos de Sb(III) e Bi(III) com o dppz são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9– Atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos de Sb(III) e Bi(III).

Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)				
	dppz	[Sb(dppz)Cl ₃]	$\Delta\delta$	[Bi(dppz)Cl ₃]	$\Delta\delta$
H(1,8)	9,53	9,68	0,15	9,54	0,01
H(3,6)	9,21	9,31	0,10	9,39	0,18
H(10,13)	8,39	8,39	0,00	8,32	-0,07
H(11,12)	8,06	8,17	0,11	8,04-8,08	-
H(2,7)	7,94	8,11	0,17		
C(3,6)		151,07		152,10	
C(17,18)		145,20		146,28	
C(21,22)		141,63		141,68	
C(15,20)		139,93		140,07	
C(1,8)		134,55		134,36	
C(11,12)		131,59		131,55	
C(10,13)		129,11		129,12	
C(16,19)		127,33		127,45	
C(2,7)		125,29		125,23	

Nos espectros de RMN de ^1H obtidos em DMSO- d_6 , para os complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃], foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos do ligante dppz na região entre δ 7,97 e 9,54 ppm. No espectro do complexo [Sb(dppz)Cl₃], as principais variações dos deslocamentos dos hidrogênios são observadas para H(1,8; $\Delta\delta= 0,15$) e H(2,7; $\Delta\delta= 0,17$) em relação ao ligante livre e, para o complexo [Bi(dppz)Cl₃] as principais variações são observadas para os sinais dos hidrogênios H(1,8; $\Delta\delta= 0,14$) e H(3,6; $\Delta\delta= 0,18$). Essa tendência na variação é similar à relatada por

Navarro e colaboradores para o complexo iônico de Au(III) (Navarro; 2007).

As atribuições dos sinais dos carbonos para esses complexos estão de acordo com os dados relatados por Yáñez para o complexo de Ru(II) com o dppz (Yáñez, 2009). Nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ foram observados nove sinais, como esperado.

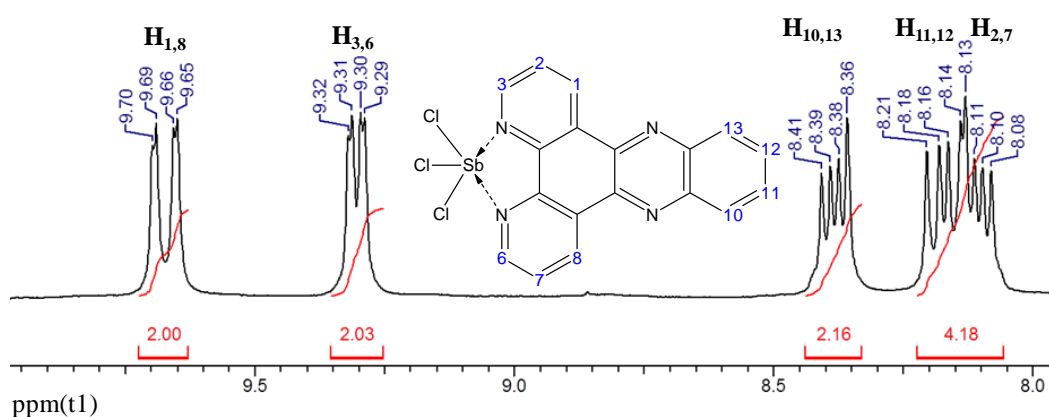


Figura 19- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$

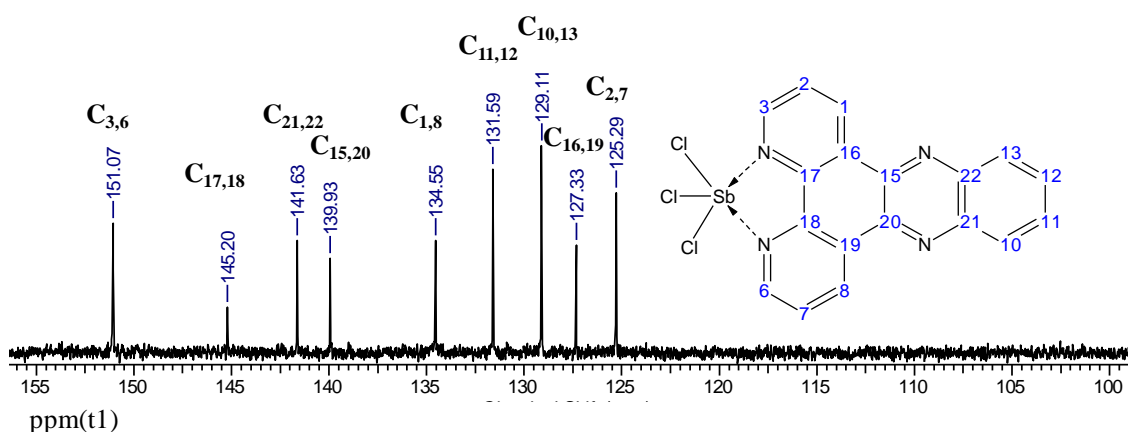


Figura 20- Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$.

O mapa de contornos HMQC do complexo permitiu identificar a correlação C-H como mostrado na Figura 21 para o complexo $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$. As

correlações verificadas foram: H_{1,8}/C_{1,8}; H_{3,6}/C_{3,6}; H_{10,13}/C_{10,13} e H_{11,12}/C_{11,12}; H_{2,7}/C_{2,7}.

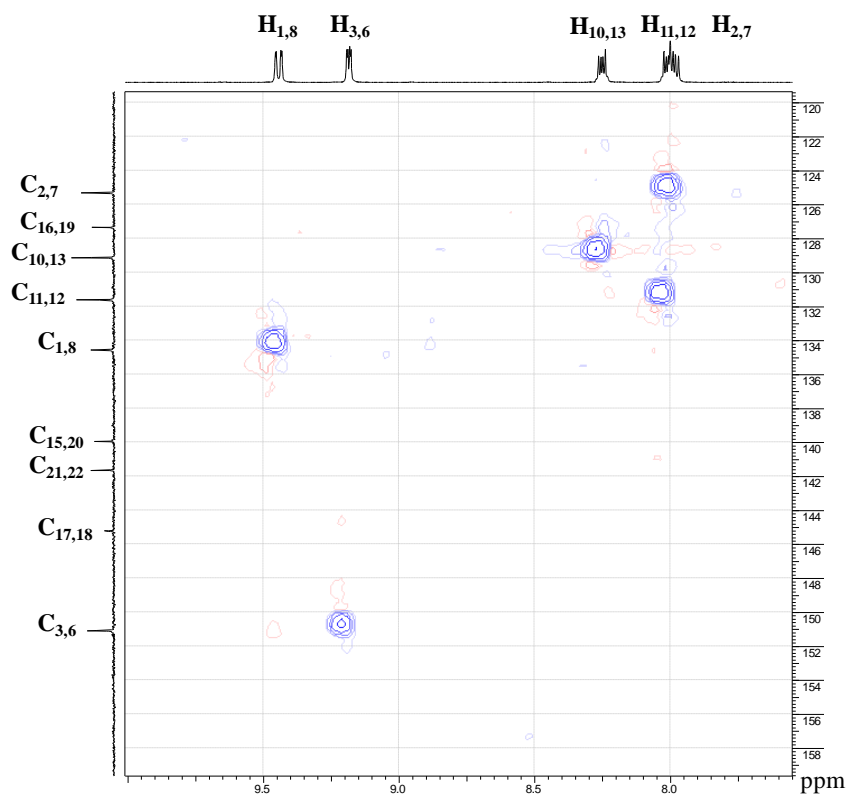


Figura 21– Mapa de contornos HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆) do complexo [Sb(dppz)Cl₃].

4.5 Análise por difração de raios X dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)₂Cl₃]

Devido à maior solubilidade do complexo [Sb(dppz)Cl₃] no meio da reação foi possível obter cristais desse complexo por evaporação lenta da solução metanólica da reação. Em contraste, para o complexo de bismuto os cristais foram obtidos por evaporação lenta de uma solução saturada do complexo [Bi(dppz)Cl₃] em DMSO, e em todas as tentativas foram obtidos cristais geminados do complexo com uma relação metal:ligante (1:2), diferente do material sólido não cristalino com relação (1:1). As amostras cristalinas do

complexo $[\text{Bi}(\text{dppz})_2\text{Cl}_3]$ não foram caracterizadas por outras técnicas instrumentais nem foram usadas em testes biológicos.

Os dados cristalográficos e os detalhes da coleta dos dados e do refinamento das estruturas são apresentados na Tabela 10.

As estruturas obtidas para os complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})_2\text{Cl}_3]$ são apresentadas nas Figuras 22 e 23. Os dois complexos cristalizaram no sistema monoclinico. A unidade assimétrica do cristal do complexo $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ contém uma molécula de metanol e uma molécula de água acima e abaixo do plano formado pelo dppz.

A unidade assimétrica do cristal do complexo $[\text{Bi}(\text{dppz})_2\text{Cl}_3]$ contém duas moléculas de DMSO e três moléculas de água ao redor de duas moléculas do complexo.

A geometria do entorno do Sb(III) corresponde a uma pirâmide distorcida de base quadrada, com o N(2) como vértice, e os Cl(1), Cl(3), Cl(3) e N(1) ocupando o plano equatorial. As quatro ligações equatoriais apresentam em média uma distância de ligação de $2,498 \pm 0,12 \text{ \AA}$, enquanto a ligação Sb(1)-N(2) é de $2,245(4) \text{ \AA}$. A somatória dos ângulos formados pelo metal e os átomos do plano equatorial é de 354° (Cl(3)-Sb-Cl(1) $95,22(5)^\circ$, Cl(3)-Sb-Cl(2) $91,68(5)^\circ$, N(1)-Sb-Cl(1) $84,23(5)^\circ$, N(1)-Sb-Cl(2) $82,97(5)^\circ$), esses dados sugerem uma distorção da pirâmide de base quadrada ideal (Yin; 2009).

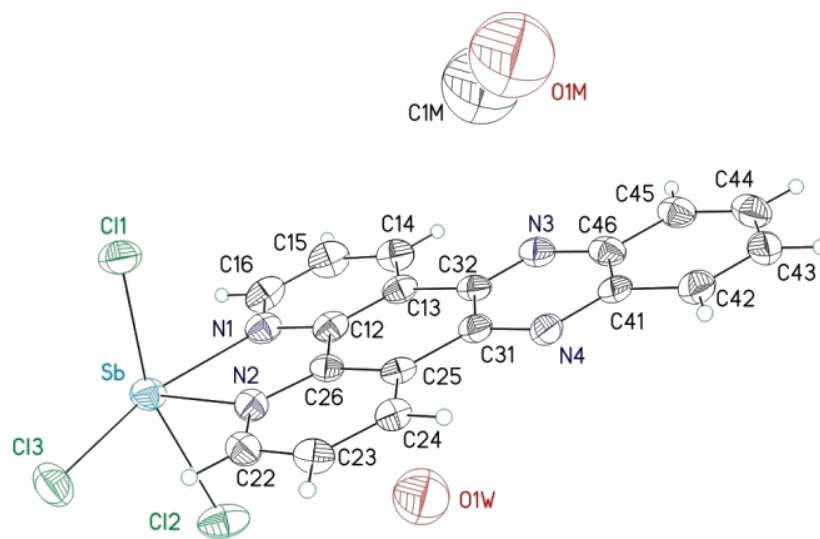


Figura 22– Representação da unidade assimétrica do complexo $[Sb(dppz)Cl_3]$.

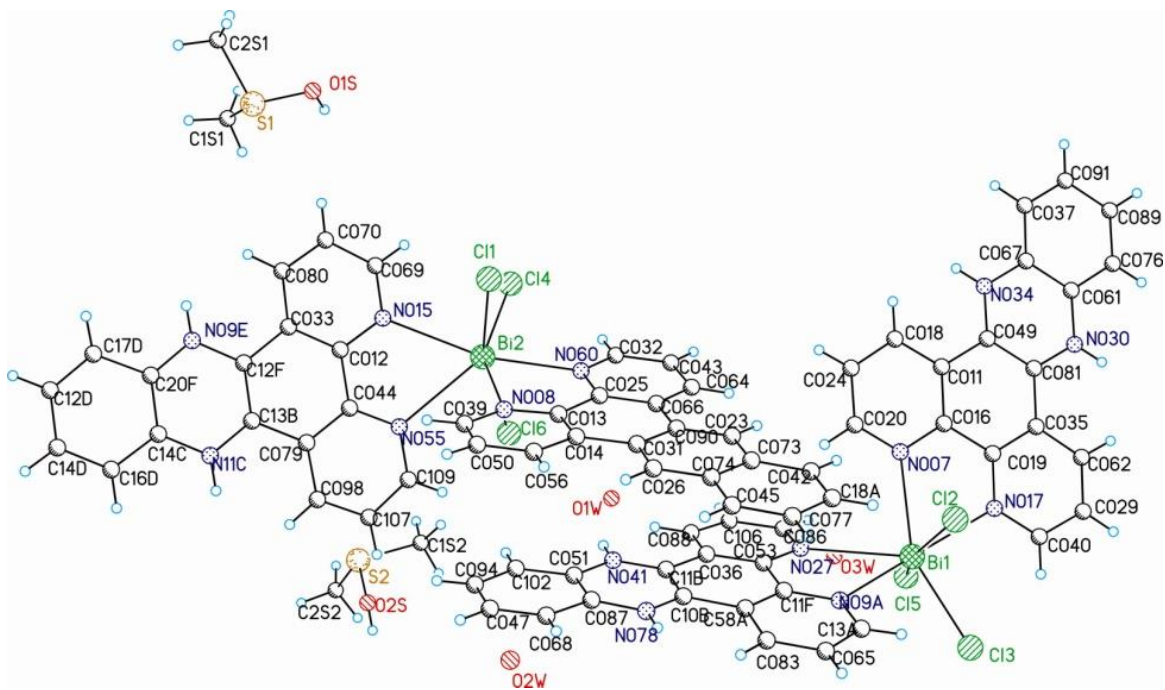


Figura 23– Representação da unidade assimétrica do complexo $[Bi(dppz)_2Cl_3] \cdot DMSO(H_2O)_{1/2}$.

Tabela 10– Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para os complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)₂Cl₃]

	[Sb(dppz)Cl ₃]	[Bi(dppz) ₂ Cl ₃]DMSO2H ₂ O
Fórmula empírica	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₃ N ₄ O _{1.25} Sb	C ₃₉ H ₂₇ BiCl ₃ N ₇ O _{2.50} S
Massa molecular (g mol ⁻¹)	542,41	981,07
Temperatura (K)	293(2)	293(2)
Sistema cristalino	Monoclinic	Monoclinic
Grupo espacial	P2(1)/c	P2(1)/c
a (Å)	10,3244(2)	17,5414(3)
b (Å)	13,2760(3)	21,2233(3)
c (Å)	14,5753(3)	19,3301(3)
α (o)	90	90
β (o)	92,0930(19)	95,9588(15)
γ (o)	90	90
V (Å ³)	1994,44(7)	7157,45(19)
Z	4	8
F (000)	1056	3840
Densidade calculada (mg/m ³)	1,805	1,821
Dimensões do cristal mm ³	0,2 × 0,2 × 0,3	0,2 x 0,15 x 0,15
Intervalo de θ (°)	4,29–62,65	2,53–66,22
Reflexões coletadas	9035	196254
Reflexões independentes	3138	196254
R _{int}	0,0355	0,0000
Transmissão máximo/mínima	1,000 / 0,30303	-
Dados/restrrição/parâmetros	3138 / 0 / 247	196254 / 0 / 965
S(Goodness-of-fit on F ²)	1,060	1,028
Índices final R	R _I = 0,0352, wR ₂ = 0,0826	R _I = 0,0889, wR ₂ = 0,2211
[I > 2σ(I)]	2478	-
Índices R (Todos os dados)	R _I = 0,0522, wR ₂ = 0,0886	R _I = 0,1291, wR ₂ = 0,2530
Δρ Max/min (Å ⁻³)	0,761/-0,560	6,620/-2,418

As distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) representativos para os complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)₂Cl₃] são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11– Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Sb(dppz)Cl₃].

Ligação	Distância (Å)	Ângulo (°)
Sb-N(2)	2,245(4)	N(2)-Sb-N(1) 71,44(14)
Sb-N(1)	2,345(4)	N(1)-Sb-Cl(3) 159,07(10)
Sb-Cl(3)	2,4992(15)	N(2)-Sb-Cl(3) 87,73(11)
Sb-Cl(1)	2,5126(13)	N(2)-Sb-Cl(1) 82,14(10)
Sb-Cl(2)	2,6348(14)	N(1)-Sb-Cl(1) 84,23(10)
N(1)-C(16)	1,334(6)	Cl(3)-Sb-Cl(1) 95,22(5)
N(1)-C(12)	1,351(6)	N(2)-Sb-Cl(2) 80,25(10)
N(2)-C(22)	1,336(6)	N(1)-Sb-Cl(2) 82,97(10)
N(2)-C(26)	1,368(6)	Cl(3)-Sb-Cl(2) 91,68(5)
		Cl(1)-Sb-Cl(2) 160,80(5)

A geometria em torno do Bi(III) corresponde a um prisma trigonal monoencapuzado distorcido, com o Cl(3) sobre o eixo principal, como vértice do capuz, e os N(017), N(09A) e Cl(2), Cl(5) formando à base quadrada do prisma à qual está ligado o Cl(3). Um parâmetro característico para os poliedros desse tipo é o valor dos ângulos formados pelo vértice do capuz, o átomo metálico e os átomos da base quadrada que devem ser iguais a 79,9°. Para o complexo [Bi(dppz)₂Cl₃], a média dos ângulos formados pelo metal Bi(1), o átomo Cl(3), os átomos da base quadrada do prisma é de 88.89°(Cl(3)-Bi(1)-Cl(2) 88,32(4), Cl(3)-Bi(1)-Cl(5) 90,09(4) N(017)-Bi(1)-Cl(3) 91,12(8) e Cl(3)-Bi(1)-N(09A) 86,04(8)) indicando uma distorção do prisma ideal.

Tabela 12– Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo [Bi(dppz)₂Cl₃].

Ligação	Distância	Ângulo	(°)
Bi(1)-N(017)	2,516(4)	N(007)-Bi(1)-N(027)	78,92(11)
Bi(1)-N(007)	2,579(4)	N(007)-Bi(1)-N(09A)	112,65(11)
Bi(1)-N(09A)	2,661(4)	N(017)-Bi(1)-N(007)	65,21(11)
Bi(1)-N(027)	2,761(3)	N(007)-Bi(1)-Cl(2)	78,65(8)
Bi(1)-Cl(3)	2,5874(11)	N(007)-Bi(1)-Cl(3)	154,16(9)
Bi(1)-Cl(2)	2,6096(10)	N(007)-Bi(1)-Cl(5)	93,74(8)
Bi(1)-Cl(5)	2,7915(11)	N(09A)-Bi(1)-(027)	60,35(11)
N(007)-C(020)	1,333(6)	N(017)-Bi(1)-N(09A)	160,58(11)
N(007)-C(016)	1,357(6)	Cl(2)-Bi(1)-N(09A)	78,71(8)
N(017)-C(040)	1,340(6)	Cl(3)-Bi(1)-N(09A)	86,04(8)
N(017)-C(019)	1,365(6)	N(09A)-Bi(1)-Cl(5)	123,14(8)
N(09A)-C(11F)	1,341(6)	N(017)-Bi(1)-N(027)	133,71(11)
N(09A)-C(13A)	1,340(6)	N(017)-Bi(1)-Cl(2)	82,01(8)
N(027)-C(086)	1,325(6)	N(017)-Bi(1)-Cl(3)	91,12(8)
N(027)-C(053)	1,344(6)	N(017)-Bi(1)-Cl(5)	76,01(8)
Bi(2)-N(060)	2,493(4)	Cl(2)-Bi(1)-N(027)	119,68(8)
Bi(2)-N(008)	2,603(4)	Cl(3)-Bi(1)-N(027)	126,82(8)
Bi(2)-N(015)	2,650(4)	N(027)-Bi(1)-Cl(5)	78,29(8)
Bi(2)-N(055)	2,701(4)	Cl(3)-Bi(1)-Cl(5)	90,09(4)
Bi(2)-Cl(4)	2,6320(10)	Cl(3)-Bi(1)-Cl(2)	88,32(4)
Bi(2)-Cl(1)	2,6355(10)		
Bi(2)-Cl(6)	2,7614(11)		
N(060)-C(032)	1,347(6)		
N(060)-C(025)	1,347(6)		
N(008)-C(013)	1,353(6)		
N(008)-C(039)	1,333(6)		
N(015)-C(012)	1,367(6)		
N(015)-C(069)	1,328(6)		
N(055)-C(044)	1,343(6)		
N(055)-C(109)	1,323(6)		

4.6 Testes Biológicos

4.6.1 Avaliação da atividade antileishmania

A atividade antileishmania foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), mediante determinação da concentração inibitória de 50%, realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.5.1.

Os dois complexos mostraram-se bastante ativos contra as formas promastigotas de *Leishmania*, como mostrado na Tabela 13. Analisando os valores da concentração inibitória CI_{50} , observou-se que a atividade antileishmania para os dois complexos foi muito maior que para os sais $SbCl_3$ e $BiCl_3$. Os valores de CI_{50} para o complexo $[Bi(dppz)Cl_3]$ foram 954,2 e 819,7 vezes mais ativos do que para o sal $BiCl_3$ em cepas de *Leishmania infantum chagasi* sensível e resistente ao Sb(III), respectivamente. Enquanto que para as cepas *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao Sb(III), os valores respectivos de CI_{50} para o complexo $[Bi(dppz)Cl_3]$ foram 580,4 e 446,4 vezes mais ativos que o $BiCl_3$. Ao comparar os valores de CI_{50} do complexo $[Sb(dppz)Cl_3]$ com o sal $SbCl_3$ observou-se um comportamento similar ao do complexo de bismuto e do respectivo sal $BiCl_3$, ainda que o sal $SbCl_3$ seja muito mais ativo que o sal $BiCl_3$.

Nas cepas sensíveis ao Sb(III), os valores de CI_{50} dos complexos foram superiores aos valores do fármaco de controle, o tartarato de antimônio(III) e potássio e nas cepas resistentes ao Sb(III), onde o fármaco controle é relativamente inativo, o complexo $[Sb(dppz)Cl_3]$ conseguiu escapar dos mecanismos de resistência desses mutantes. Não foi observado o fenômeno de resistência cruzada para o complexo $[Bi(dppz)Cl_3]$.

Embora a coordenação do Sb(III) tenha promovido uma melhora significativa das atividades dos complexos contra parasitas de *Leishmania*, de 1,31 a 3,26 vezes maiores com relação ao dppz livre, não foram observadas diferenças significativas entre as cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), sugerindo que o metal não é o responsável direto pela atividade antileishmania no complexo $[Sb(dppz)Cl_3]$.

Tabela 13– Concentrações inibitórias dos complexos de Sb(III) e Bi(III) contra promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III).

Cepa	CI ₅₀ (μmol·L ⁻¹)±MEP					
	dppz	[Bi(dppz)Cl ₃]	[Sb(dppz)Cl ₃]	TA	SbCl ₃	BiCl ₃
<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i> SSb	0,81±0,04	0,59±0,01	0,62±0,01	100±3	341±2	563±2
<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i> RSb	1,86±0,08	0,61±0,02	0,57±0,01	>2700	462±3	>500
<i>L. amazonensis</i> SSb	> 2	1,07±0,03	0,95±0,01	83±1	362±2	621±2
<i>L. amazonensis</i> RSb	2,00±0,05	1,12±0,01	0,92±0,02	>2700	1502±2	>500

TA: tartarato de antimônio(III) e potássio , fármaco de controle; MEP: média do erro padrão; SSb e RSb: sensível e resistente ao Sb(III), respectivamente.

4.6.2 Atividade citotóxica

O procedimento do teste de toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo foi descrito na seção 2.5.2.

Ao comparar os resultados de toxicidade dos complexos com os valores obtidos para o dppz (apresentado na seção 3.1), observou-se um aumento da toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo após a coordenação do metal ao dppz, sendo o complexo [Bi(dppz)Cl₃] mais tóxico do que o complexo [Sb(dppz)Cl₃], como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14–Toxicidade dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃] contra macrófagos peritoneais de camundongo

	dppz	Bi(dppz)Cl ₃	Sb(dppz)Cl ₃
CC ₅₀ (μmol·L ⁻¹)	12,5	4,8	7,0
IS	15,4	8,1	11,3

CC₅₀: concentrações que induzem 50% de toxicidade em macrófagos. IS: índice de seletividade, calculado como a razão entre o CC₅₀ em macrófagos de camundongo e o CI₅₀ em *L. infantum chagasi* SSb.

Dos valores de índice de seletividade (IS) e da concentração citotóxica em macrófagos, mostradas na Tabela 13, observa-se que o complexo [Sb(dppz)Cl₃] apresenta maior índice de seletividade para a *L. infantum chagasi* Ssb do que o complexo [Bi(dppz)Cl₃] e que o ligante dppz mostrou-se ainda mais seletivo e menos tóxico que os complexos.

4.7 Coeficiente de partição óleo/água

Em geral, a extensão da interação de um soluto com sistemas microheterogêneos é avaliada de forma quantitativa mediante seu coeficiente de partição, sendo o sistema bifásico octanol-água frequentemente usado para determinar essa constante. Existem diferentes métodos para a determinação da partição molecular quantitativa em sistemas modelos de biomembranas (Santos, 2003). No método *Shake-flask* a determinação do log P é feito dosando-se a amostra em qualquer das fases (Wilson, 2012). A escolha de se trabalhar com a fase orgânica é feita principalmente para compostos que podem sofrer hidrólises em água, ou para compostos altamente lipofílicos que dificultam a solubilidade em água (Ràfols, 2012). Compostos hidrofóbicos possuem alto valor de log P, enquanto compostos hidrofílicos possuem baixo valor de log P.

Os coeficientes de absorvidade molar (em $\lambda = 271$ nm) dos complexos [Sb(dppz)Cl₃] e [Bi(dppz)Cl₃] no sistema n-octanol saturado com água foram iguais a 64.200 e 64.350 L mol⁻¹cm⁻¹, respectivamente. A partir desses valores, foi construída uma curva de absorvância em função da concentração para cada complexo. Os gráficos das curvas de absorvância em função da concentração, assim como os espectros das soluções padrão que foram usadas para construir as curvas são apresentados na Figura 24.

A Figura 25 mostra os coeficientes de partição dos complexos de Sb(III) e Bi(III) determinados mediante procedimento descrito na seção 2.6. O cálculo do valor de log P para o ligante dppz foi feito com a ajuda do programa *on line* ALOGPS 2.1.

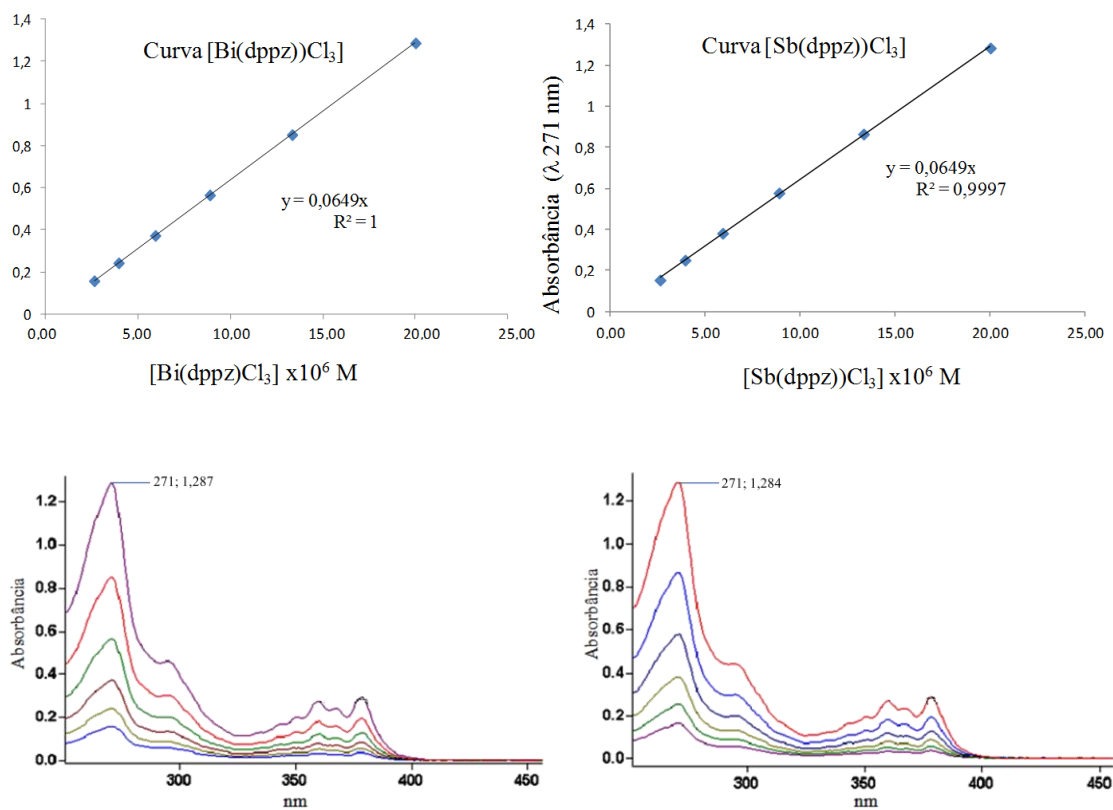


Figura 24– Superior: Curvas de absorvância em função da concentração dos complexos; Inferior: espectros das soluções padrão que foram usadas para construir as curvas.

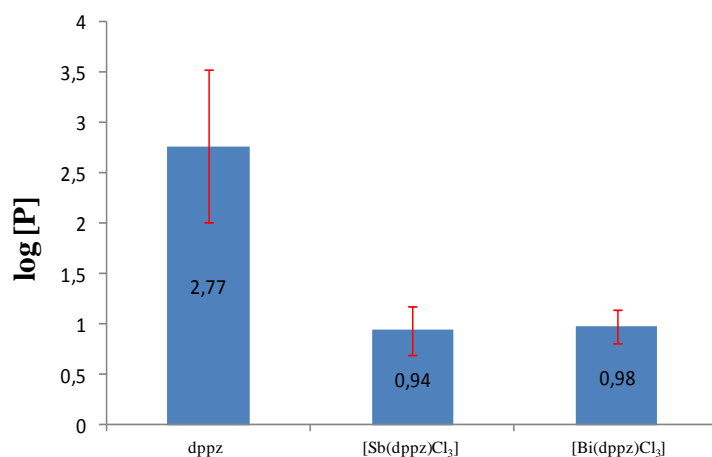


Figura 25–Coeficientes de partição óleo/água dos complexos $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$. Os valores representam as médias \pm desvio padrão (n=6).

Estes resultados permitem concluir que o $\log P$ diminui com a coordenação do metal ao dppz, sugerindo que o aumento da atividade dos complexos em relação ao dppz seja devido ao aumento do caráter hidrofílico nos complexos.

5 COMPLEXOS DE Sb(III) COM Bipy, phen E dpq

Os compostos bipy e phen são amplamente usados na química de coordenação. A estabilidade de seus complexos é devida em parte ao efeito quelante, e no caso de complexos que contem metais com orbitais *d* há um incremento da estabilidade devida ao efeito π -acceptor e σ -doador dos ligantes (Kaes, 2000; Bencini, 2010).

Os complexos formados pelo ligante phen apresentam uma forte banda de absorção de transferência de carga do metal para o ligante (TCML), e pela emissão fluorescente deslocada para o vermelho em relação à emissão da phen (Juris, 1988). Os metais com números de oxidação baixos formam complexos mais estáveis com esse tipo de ligante (Sammes, 1994). Em particular, para os complexos $[M(\text{phen})]^{2+}$, a estabilidade segue a tendência da série de Irvin-Williams, com valores do logaritmo da constante de estabilidade que se estendem de 4,13 para o $[\text{Mn}(\text{phen})]^{2+}$ até 9,25 para $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$ (Anderegg, 1963). Em soluções aquosas, a phen forma facilmente complexos octaédricos do tipo $[\text{M}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[\text{M}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ e $[\text{M}(\text{Phen})_3]^{2+}$. A dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) é um reconhecido intercalador do ADN (Chen, 2010), complexos desse ligante com Ir(III) (Nazif, 2009), Ru(II) (Rajendiran, 2012) e Cu(II) (Jia, 2012) mostraram excelente atividade citotóxica contra células de câncer.

5.1 Complexos da 2,2'-bipiridina (bipy) com Sb(III)

A bipy tem sido amplamente estudada na química de coordenação sendo enorme o número de relatos que envolvem os complexos metálicos desse ligante. O grande interesse nesse ligante surge da facilidade de funcionalização da sua estrutura, da sua elevada estabilidade redox e da estabilidade química de seus complexos vindas dos efeitos gerados pela estrutura eletrônica deslocalizada da sua molécula (Kaes, 2000).

Vários estudos relatam a atividade leishmanicida e anticancerígena de complexos metálicos contendo a bipy (Martínez, 2012; Andrews, 2011; Devereux, 2006; Thota, 2010). Porém, não existem relatos da atividade leishmanicida desse ligante, sendo que, na maioria dos casos, a atividade desses complexos está relacionada apenas ao metal, ou a outro ligante do complexo ternário.

5.1.1 Caracterização físico-química dos complexos da 2,2'-bipiridina (bipy) com Sb(III)

Foram sintetizados dois complexos inéditos de bipy a partir dos sais SbCl_3 e ϕSbCl_2 como descrito no item 2.4 da parte experimental. Esses complexos foram caracterizados através das técnicas de determinação do ponto de fusão, análises elementares, medidas de condutimetria, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , HMQC, COSY e DEPT.

As fórmulas moleculares, as temperaturas de fusão, as massas molares, os rendimentos das reações, os valores de condutividade e os resultados das análises elementares para os complexos da bipy estão apresentados na Tabela 15. Os resultados das análises elementares e condutimétricas sugerem a formação de complexos neutros em ambos os casos, como representado na Figura 26.

Tabela 15– Análises elementar, massa molar, temperatura de fusão e condutividade dos complexos de Sb(III) com a bipy.

Composto	Análise elementar			Fórmula molecular	$(\mu\text{S}/\text{cm})$ DMF (5% DMSO)	MM (gmol^{-1})	PF °C	R.R (%)
	%C	%H	%N					
[Sb(bipy)Cl ₃]	31,24 (31,01)	1,87 (2,10)	7,60 (7,29)	C ₁₀ H ₈ Cl ₃ N ₂ Sb	11,00	384	220	87
[Sb(bipy) ϕ Cl ₂]	44,34 (45,11)	2,69 (3,08)	6,64 (6,58)	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ Sb	9,01	425	217	85

PF: ponto de fusão; R.R: rendimento da reação; (valores teóricos).

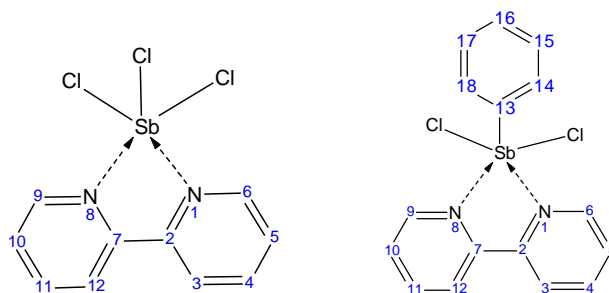


Figura 26– Representação genérica dos complexos $[Sb(bipy)Cl_3]$ e $[Sb(bipy)\phi Cl_2]$.

5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos da bipy com Sb(III)

As principais bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho da bipy são as seguintes: vibrações simétricas e assimétricas dos grupos C-H, situadas na região entre $3052-3084\text{ cm}^{-1}$ (Kline, 1944), vibrações de estiramento do anel polipiridil dos grupos C=C e C=N, situadas na região entre $1600-1400\text{ cm}^{-1}$ (Gerasimova, 2013), deformação simétrica e assimétrica dos grupos C-H, fora do plano do anel, em 758 e 740 cm^{-1} , vibrações de respiração dos anéis piridil em 990 cm^{-1} (Shina, 1963) e deformação angular fora do plano do grupo C-H presentes em 1250 cm^{-1} (Faleschini, 1972).

Nas Figuras 27 e 28 estão ilustrados os espectros no infravermelho dos complexos $[Sb(bipy)Cl_3]$ e $[Sb(bipy)\phi Cl_2]$ e as atribuições das bandas do ligante e dos complexos estão descritos na Tabela 16.

Observam-se mudanças significativas nos espectros no infravermelho dos dois complexos em todas as regiões espectrais em relação ao ligante livre. O espectro no infravermelho do complexo $[Sb(bipy)Cl_3]$ mostra um deslocamento das bandas da bipy em 758 e seu ombro em 740 cm^{-1} , para 772 e 760 cm^{-1} no complexo, correspondentes às deformações simétricas e assimétricas dos grupos C-H fora do plano. É importante observar que esses deslocamentos induzem à separação das bandas que compunham o envelope entre $670-770\text{ cm}^{-1}$ presente inicialmente no espectro da bipy. Uma dessas bandas em 686 cm^{-1} e um ombro em 698 cm^{-1} , que não apareciam no espectro da bipy, foram observadas no espectro do complexo.

Esse fenômeno foi previamente relatado para complexos da bipy com os metais Pr(III), Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Er(III) e Dy(III) (Shina, 1963) e para complexos de Bi(III) (Faleschini, 1972).

Tabela 16– Atribuições das principais bandas de absorção IV para o ligante bipy e os complexos [Sb(bipy)Cl₃] e [Sb(bipy)φCl₂] – suporte KBr.

Composto	Absorção IV, cm ⁻¹ (intensidade)	Atribuições
bipy	3052(m)	ν Csp ² -H
	1578(F), 1558(F), 1452(F), 1416(F)	ν C=C, C=N
	758(F)	γ Csp ² -H
[Sb(bipy)Cl ₃]	3050(m)	ν Csp ² -H
	1616(m), 1600(m), 1584(F), 1526(F)	ν C=C, C=N
	760(F)	γ Csp ² -H
[Sb(bipy)φCl ₂]	3050(m)	ν Csp ² -H
	1592(m), 1472(m), 1438(F),	ν C=C, C=N
	764(m)	γ Csp ² -H

No complexo [Sb(bipy)Cl₃], as regiões de 1432-1470 cm⁻¹ e de 1584-1616 cm⁻¹ correspondentes aos estiramentos ν(C=N) e ν(C=C) dos anéis piridil, são caracterizadas pela formação de envelopes devido ao deslocamento e ao alargamento de algumas bandas. Observou-se que as bandas em 1558 e 1578 cm⁻¹ no espectro do ligante livre deslocam-se para frequências maiores, 1584 e 1600 cm⁻¹, no espectro do complexo [Sb(bipy)Cl₃], formando um envelope com a banda em 1616 cm⁻¹. Esse deslocamento também induziu à separação das bandas do envelope, observado no espectro da bipy, entre 1480-1600 cm⁻¹, sendo a banda em 1526 cm⁻¹ bem resolvida no espectro do complexo.

As vibrações de estiramento dos grupos C-H, situadas na faixa entre 3052-3084 cm⁻¹ no ligante livre, também foram fortemente afetadas. Após a coordenação do metal, observa-se um aumento da intensidade das bandas.

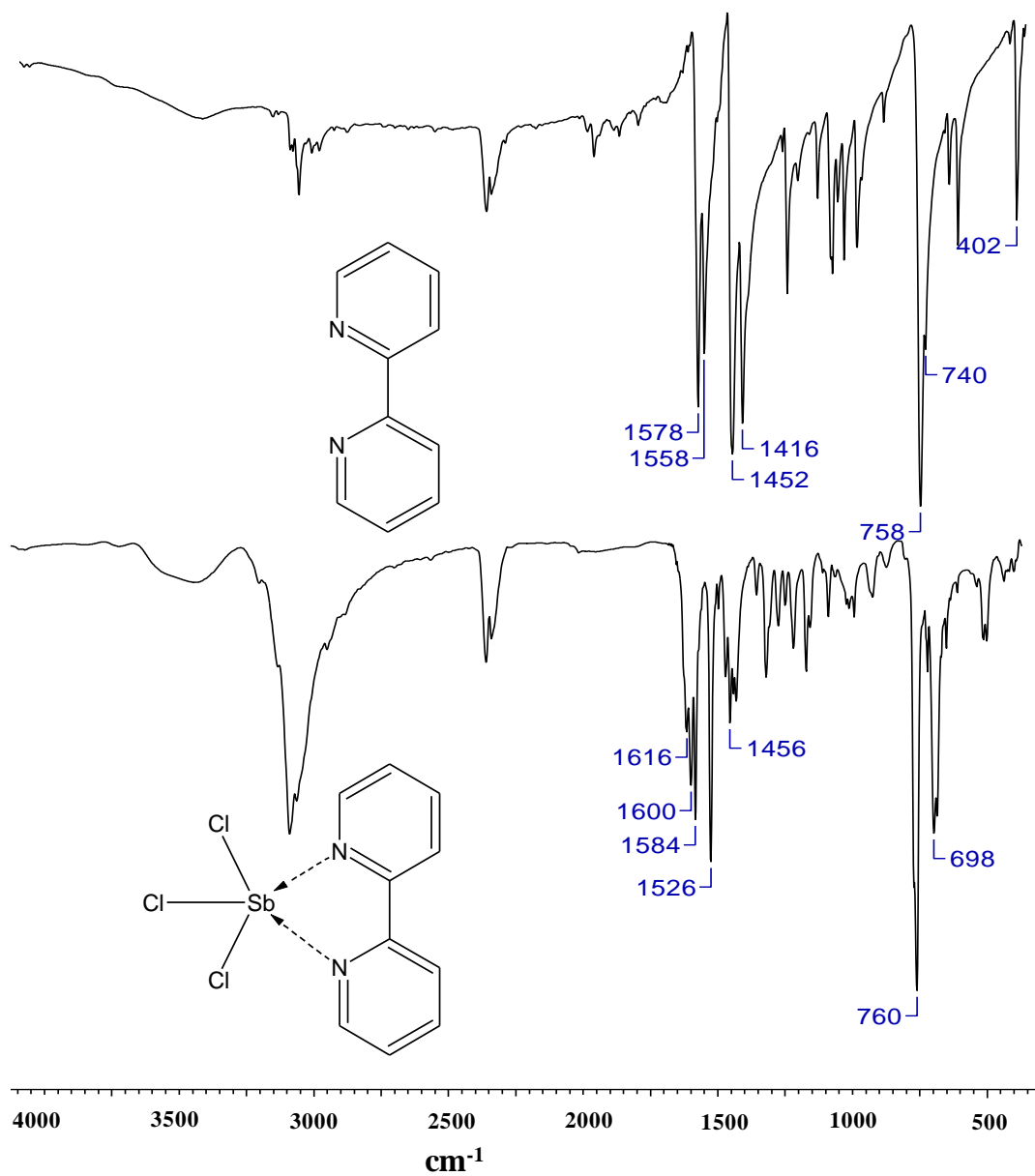


Figura 27– Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$ e do ligante bipy - suporte KBr.

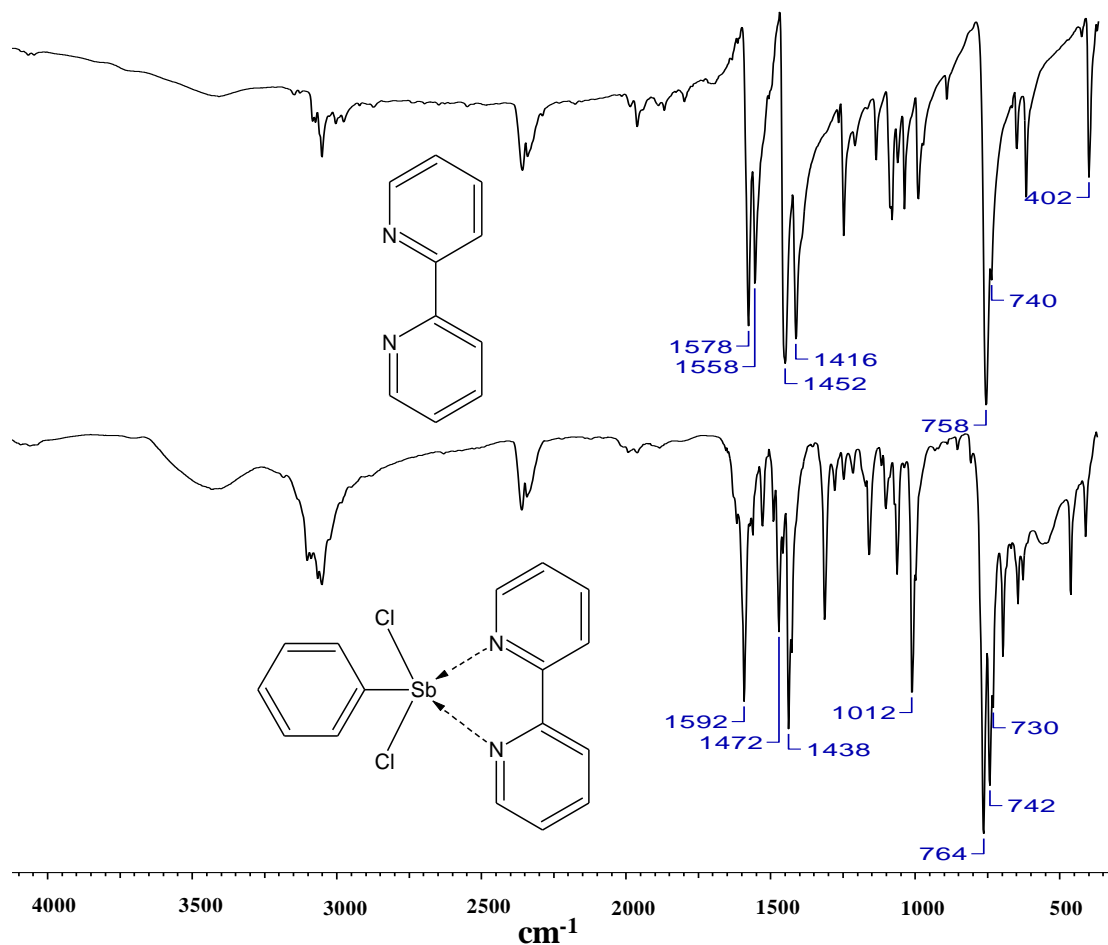


Figura 28– Espectro no IV do complexo [Sb(bipy)φCl₂] e do ligante bipy - suporte KBr.

O espectro no infravermelho do complexo [Sb(bipy)φCl₂], mostra um padrão similar ao do complexo [Sb(bipy)Cl₃]. No entanto, as bandas associadas com o grupo fenila ligado ao antimônio aparecem junto com as bandas dos anéis polipiridínicos, causando o alargamento dessas bandas.

A banda atribuída à deformação angular fora do plano, que se encontra em 402 cm⁻¹ no espectro da bipy livre (Klin, 1944), desloca-se para 418 e 412 cm⁻¹ para os complexos [Sb(bipy)Cl₃] e [Sb(bipy)φCl₂], respectivamente.

5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos da bipy com Sb(III)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do complexo [Sb(bipy)Cl₃] estão apresentados na Figuras 29 e 30 e suas atribuições na Tabela 17.

Tabela 17– Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante bipy e do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)		
	bipy	$[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$	$\Delta\delta$
H(6,9)	8,66(d)	8,72	0,06
H(3,12)	8,39(d)	8,41	0,02
H(4,11)	7,88(t)	7,99	0,11
H(5,10)	7,38(dd)	7,49	0,11
C(2,7)	155,25	154,30	-0,95
C(6,9)	149,17	148,95	-0,22
C(4,11)	137,13	137,98	-0,85
C(5,10)	124,05	124,58	0,53
C(3,12)	120,43	120,83	0,40

As atribuições dos sinais de hidrogênio para o ligante estão de acordo com os dados relatados por Zuber e colaboradores (2006). O espectro do ligante bipy apresenta quatro sinais, sendo dois dupletos correspondentes aos hidrogênios H(6,9; δ 8,66ppm) e H(3,12; δ 8,39 ppm), um tripleto correspondente a H(4,11; δ 7,99 ppm) e um duplo duplete correspondente a H(5,10; δ 7,38 ppm).

No espectro de RMN de ^1H , feito em $\text{DMSO-}d_6$, para o complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$, foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos do ligante bipy na região entre δ 7,49- 8,72 ppm. O espectro desse complexo apresentou variações dos sinais com relação ao espectro da bipy livre. As principais variações nos deslocamentos químicos são observadas para os sinais dos hidrogênios H(4,11; $\Delta\delta= 0,11$) e H(5,10; $\Delta\delta= 0,11$).

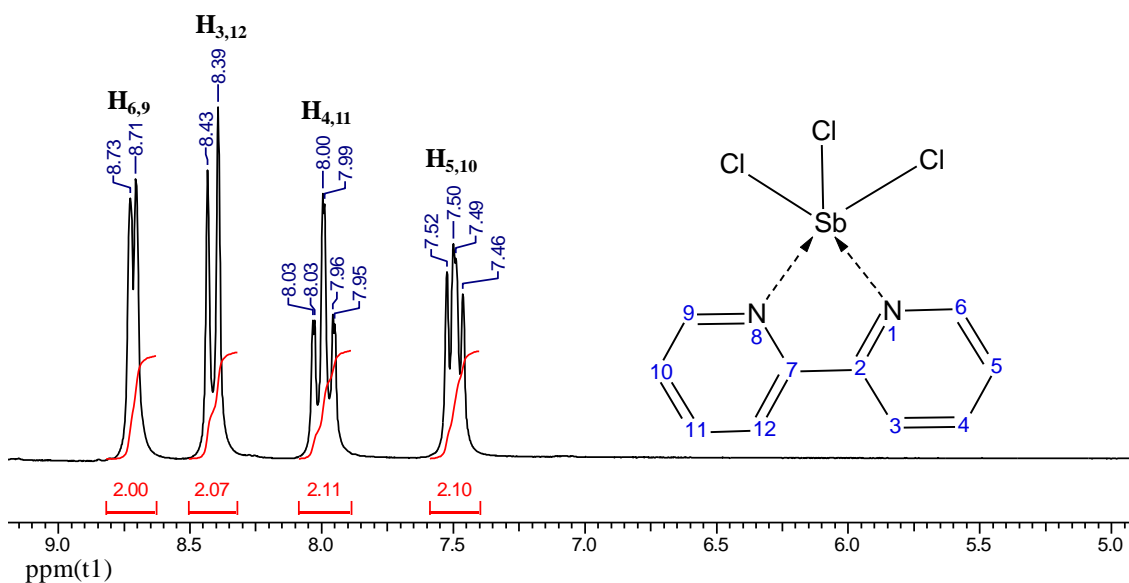


Figura 29- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$.

As atribuições dos sinais de carbono do ligante estão de acordo com os dados relatados por Spellane & Watts (1981). O espectro do ligante bipy apresenta cinco sinais correspondentes aos carbonos C(2,7; 155,25 ppm); C(6,9; 149,17); C(4,11; 137,13); C(5,10; 124,05) e C(3,12; 120,43).

No espectro RMN de ^{13}C , feito em $\text{DMSO-}d_6$, do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$ foram observados os sinais presentes no ligante na região entre δ 120,83-154,30 ppm. As principais variações nos deslocamentos químicos no espectro de carbono para o complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$, são observadas para os sinais dos carbonos C(2,7; $\Delta\delta = -0,95$) e C(4,11; $\Delta\delta = -0,85$), indicando a formação do complexo através da complexação com os nitrogênios.

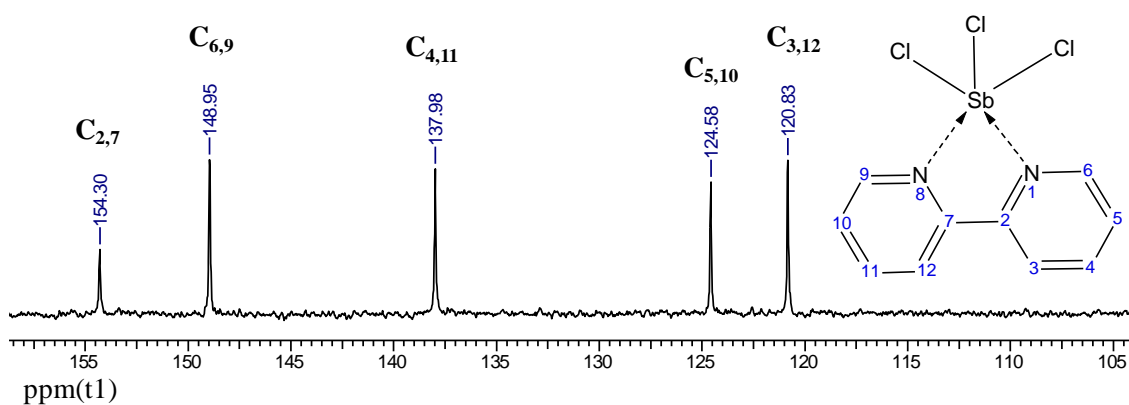


Figura 30- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$ estão apresentados nas Figuras 31 e 32 e suas atribuições estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18– Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto ϕSbCl_2 e do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)		Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)	
	$[\phi\text{SbCl}_2]$			$[\phi\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$	
				$\Delta\delta$	
H(14,18)	8,12		H(6,9)	8,72(d)	0,06
H(15,17)	7,63		H(3,12)	8,42(d)	0,03
H(16)	7,61		H(14,18,4,11)	7,94-8,08(m)	-
C(13)	141,79		H(5,10,15,17,16)	7,51-7,28	-
C(14,18)	133,53		C(2,7)	160,19	4,94
C(16)	131,64		C(13)	154,89	13,1
C(15,17)	129,70		C(6,9)	149,17	0,00
			C(4,11)	137,56	0,43
			C(14,18)	134,57	1,04
			C(16)	128,44	-3,20
			C(15,17)	121,57	-8,13
			C(5,10)	124,35	0,30
			C(3,12)	120,59	0,16

No espectro de RMN de ^1H , feito em $\text{DMSO-}d_6$, para o complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$ foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos correspondentes ao grupo fenila e ao ligante bipy na região entre δ 7,28-8,72 ppm.

O multipeto que aparece na região de deslocamento químico em torno de δ 7,94-8,08 é correspondente aos sinais H(14,18), do grupo fenila e aos H(4,11) da bipy. Trata-se de um dupeto dos H(14,18) e de um tripleto dos

H(4,11), com constantes de acoplamento $J = 6\text{ Hz}$ e $J = 8\text{ Hz}$, respectivamente.

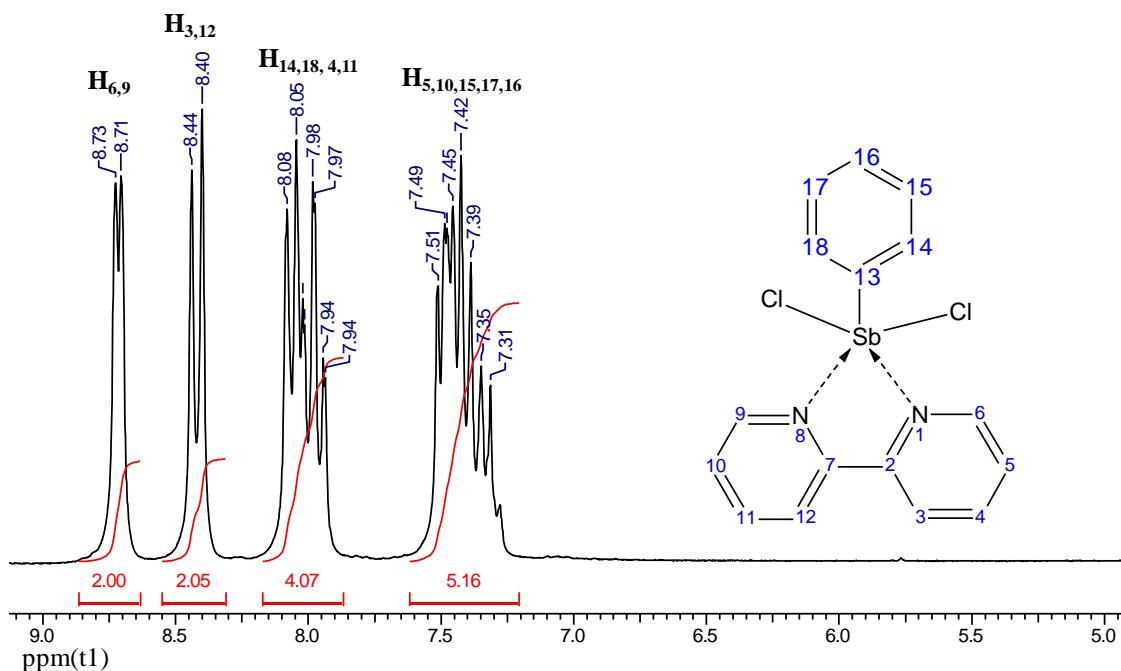


Figura 31- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$.

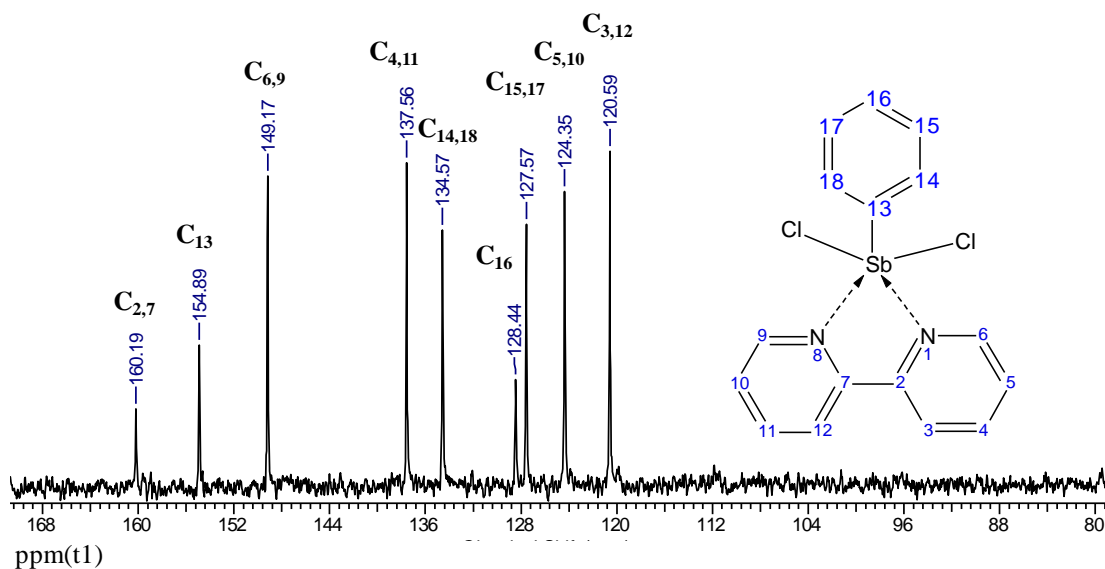


Figura 32- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$.

O multipeto que aparece na região de deslocamento químico entre δ 7,51-7,28 corresponde aos hidrogênios H(15,16,17) do fenila e H(5,10) da bipy.

As principais variações nos deslocamentos químicos são observadas para os sinais dos hidrogênios H(4,11; $\Delta\delta= 0,10$) e H(5,10; $\Delta\delta= 0,11$).

No espectro RMN de ^{13}C , feito em $\text{DMSO-}d_6$, para o complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_3]$ observa-se que os carbonos C(2,7; $\Delta\delta= 4,94$) e C(13; $\Delta\delta= 13,1$) foram os mais afetados com relação aos sinais do ligante livre e do grupo fenila ligado ao antimônio, indicando a formação do complexo através da ligação do antimônio com os nitrogênios do ligante.

5.2 Complexos da 1,10-fenantrolina (phen) com Sb(III)

Existem vários relatos na literatura da atividade anticancerígena (Krishna, 2001; Wheate, 2007; Prashanthi, 2012; Kellet, 2012), antibacteriana (Prashanthi, 2012; Mengjun, 2012), antifúngica (Coyle, 2003; Mengjun, 2012) e leishmanicida (Boutaleb-Charki, 2009) da phen e de seus complexos metálicos.

5.2.1 Caracterização físico-química dos complexos da phen com Sb(III)

Foram sintetizados dois complexos inéditos da phen a partir dos sais SbCl_3 e ϕSbCl_2 como descrito no item 2.4 da parte experimental. Esses complexos foram caracterizados através das técnicas de determinação do ponto de fusão, análises elementar, medidas de condutimetria, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , HMQC, COSY e DEPT. As estruturas cristalográficas dos complexos foram determinadas por difração de raios X dos monocristais.

As fórmulas moleculares, temperaturas de fusão, massas molares, rendimentos das reações, condutividade e análises elementares para os complexos da fenantrolina estão apresentados na Tabela 19. Os resultados das análises elementares e condutimétricas sugerem a formação de complexos neutros em ambos os casos, como representado na Figura 33.

Tabela 19– Análises elementares, massa molar, temperatura de fusão e condutividade dos complexos de Sb(III) com a phen.

Composto	Análise elementar			Fórmula molecular	$(\mu\text{S}/\text{cm})$ DMF (5% DMSO)	MM ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	PF °C	R.R (%)
	%C	%H	%N					
[Sb(phen)Cl ₃]	45,41 (47,10)	2,34 (2,91)	6,60 (6,23)	C ₁₂ H ₈ Cl ₃ N ₂ Sb	13,48	408	215	88
[Sb(phen)φCl ₂]	45,56 (47,08)	3,18 (3,33)	5,42 (5,49)	C ₂₀ H ₁₇ Cl ₂ N ₂ O ₂ Sb	14,00	449	201	86

PF: ponto de fusão; R.R: rendimento da reação; (valores teóricos).

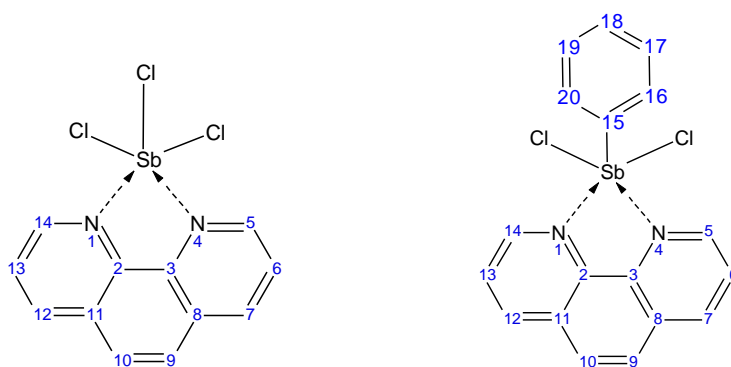


Figura 33– Representação genérica dos complexos [Sb(phen)Cl₃] e [Sb(phen)φCl₂].

5.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos complexos da phen com Sb(III)

As principais bandas observadas no espectro no infravermelho da fenantrolina são as seguintes: deformação angular fora do plano da ligação C-H na região de 700-900 cm^{-1} , vibrações de estiramento dos grupos C=N e C=C dos anéis heteroaromáticos, situadas na região de 1600-1400 cm^{-1} (Faleschini, 1972; Gerasimova, 2012; Kharadi, 2012). A phen utilizada nas sínteses dos complexos apresenta a banda característica do estiramento O-H entre 3600-3200 cm^{-1} , correspondente às moléculas de água de cristalização do produto comercial.

Nas Figuras 34 e 35 estão ilustrados os espectros no infravermelho da phen e dos complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ e as atribuições das bandas do ligante e dos complexos estão descritos na Tabela 20.

O espectro no infravermelho do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ mostrou mudanças na região de $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ com relação ao espectro da phen. As bandas atribuídas á $\nu(\text{C}=\text{N})$, que encontram-se em 1644 e 1588 cm^{-1} no espectro da phen livre, deslocam-se para 1600 e 1574 cm^{-1} no espectro do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$, indicando a coordenação do antimônio aos nitrogênios (Kharadi, 2012). A coordenação do metal aos nitrogênios da fenantrolina também pode ser confirmada pelo deslocamento para maiores frequências das bandas dessa região, como mostrado previamente para complexos de Bi(III) (Faleschini, 1972).

Tabela 20– Atribuições das principais bandas de absorção nos espectros no IV para o ligante phen e os complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ – suporte KBr.

Composto	Número de Onda, cm^{-1} (intensidade)	Atribuições
Fenantrolina	3058(m)	$\nu\text{ Csp}^2\text{-H}$
	1620(m), 1588(m), 1506(m), 1422(F)	$\nu\text{ C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$
	738(F)	$\gamma\text{ Csp}^2\text{-H}$
$[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$	3054(m)	$\nu\text{ Csp}^2\text{-H}$
	1574(m), 1516(m), 1424(F)	$\nu\text{ C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$
	716(F)	$\gamma\text{ Csp}^2\text{-H}$
$[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$	3046(m)	$\nu\text{ Csp}^2\text{-H}$
	1576(m), 1518(m), 1428(F)	$\nu\text{ C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$
	724(F)	$\gamma\text{ Csp}^2\text{-H}$

A banda em 1506 e o ombro em 1492 cm^{-1} , atribuídas á $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$, foram separadas após a coordenação da phen ao antimônio e deslocaram-se para 1516 e 1488 cm^{-1} no espectro do $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$. Essa separação da banda e do ombro tem sido relatada como evidência da coordenação da

fenantrolina pelos íons Pt(II) e Pd(II) (Jin, 2000) e Fe(II), Ni(II) e Co(II) (Gerasimova, 2013). Também tem sido relatado que a separação dessas bandas está relacionada com a variação do raio iônico do metal coordenado à fenantrolina, a separação diminuiu com o aumento do raio iônico dos metais (Schilt, 1959).

A banda atribuída à vibração de deformação angular fora do plano, correspondente aos seis hidrogênios dos anéis heteroaromáticos da phen, situados em 730 cm^{-1} no ligante livre, desloca-se para 716 cm^{-1} no complexo. Em contraste, a vibração atribuída à deformação angular fora do plano, correspondente aos dois hidrogênios do anel central que se encontra em 854 cm^{-1} no ligante livre, não mudou após a formação do complexo, entretanto esse fenômeno já foi observado para um grande número de complexos metálicos da fenantrolina (Schilt, 1958).

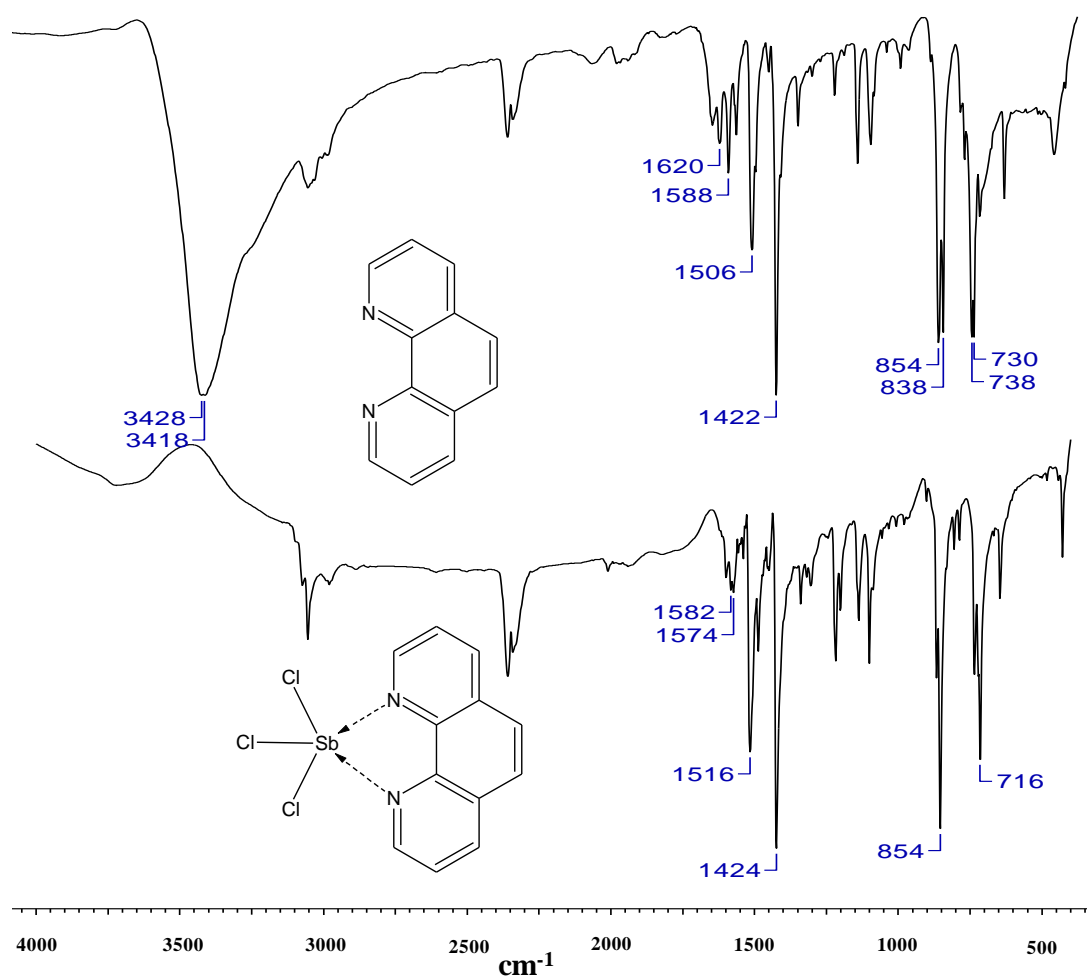


Figura 34– Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e do ligante phen – suporte KBr.

O espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$ apresentou um perfil similar ao espectro do $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$. As vibrações atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$ que se encontram em 1644 e 1588 cm^{-1} no espectro da phen livre, deslocam-se para 1622 e 1576 cm^{-1} no espectro do complexo $[\text{Sb}(\text{bipy})\phi\text{Cl}_2]$, indicando a coordenação do nitrogênio (Kharadi, 2012). Foram observadas leves variações nas frequências das bandas de vibração $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$ e das bandas de deformação angular fora do plano dos grupos C-H dos anéis heteroaromáticos.

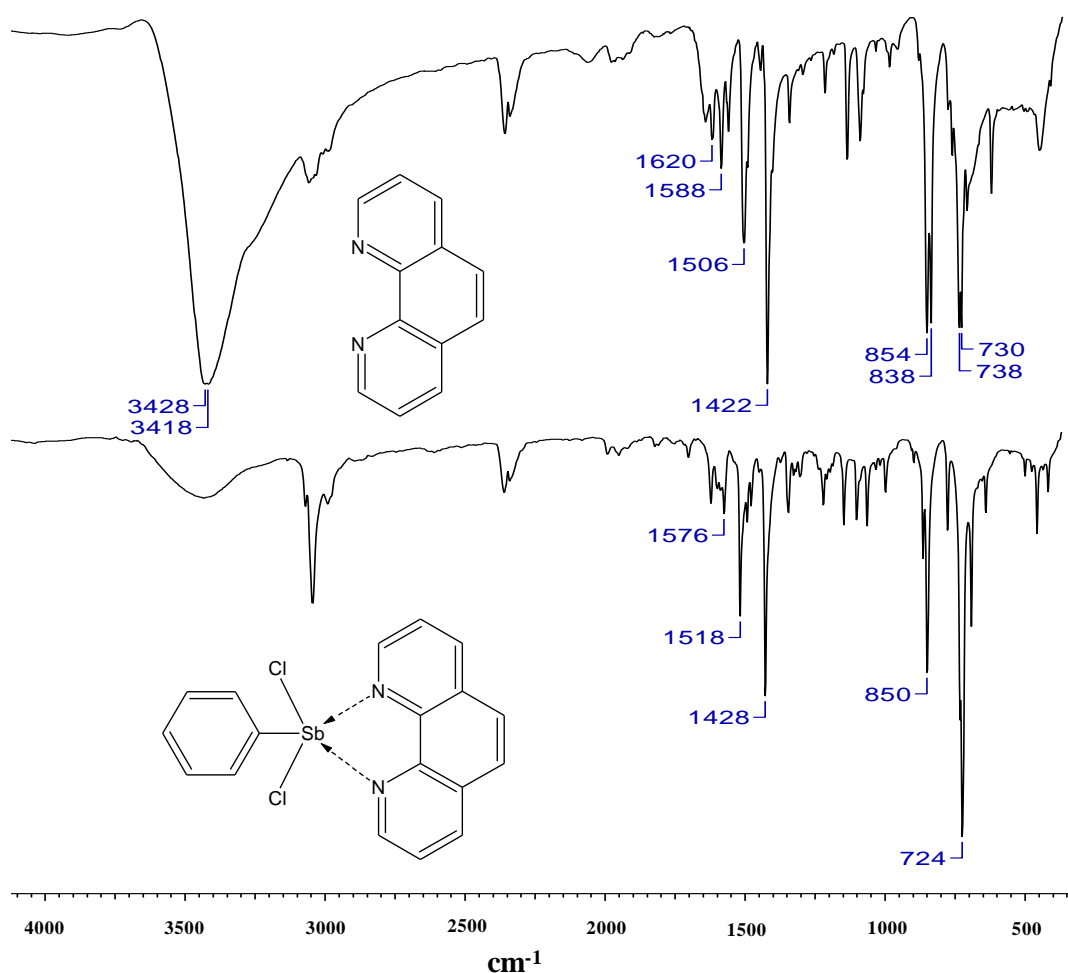


Figura 35– Espectro no IV do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ e do ligante phen – suporte KBr.

5.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos complexos da phen com Sb(III)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ são apresentados nas Figuras 36 e 37 e suas atribuições estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21– Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante phen e do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)		Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)	
	Phen			$[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$	$\Delta\delta$
H(5,14)	9,07		H(5,14)	9,60	0,53
H(7,12)	8,37		H(7,12)	8,96	0,59
H(9,10)	7,84		H(9,10)	8,29	0,45
H(6,13)	7,67		H(6,13)	8,18	0,51
C(5,14)	150,23		C(5,14)	147,75	-2,48
C(2,3)	145,83		C(7,12)	141,32	4,85
C(7,12)	136,47		C(2,3)	138,60	-7,23
C(8,11)	128,73		C(8,11)	129,72	0,99
C(9,10)	126,92		C(9,10)	127,62	0,7
C(6,13)	123,54		C(6,13)	125,72	2,18

As atribuições dos sinais de hidrogênio para o ligante estão de acordo com os dados relatados na literatura (Dimitrov, 2003; Pazderski, 2006). O espectro do ligante phen apresenta quatro sinais, sendo dois dupletos correspondentes aos hidrogênios H(5,14; δ 9,07 ppm) e H(7,12; δ 8,37 ppm), um singlete correspondente ao H(9,10; δ 7,48 ppm) e um tripleto correspondente ao H(6,13; δ 7,67 ppm). As principais variações nos deslocamentos químicos para o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ em relação ao ligante livre são observadas para os sinais dos hidrogênios H(5,14; $\Delta\delta=0,53$) e H(7,12; $\Delta\delta=0,59$). As atribuições dos sinais de carbono para o ligante também estão de acordo com os dados relatados na literatura

(Fréchet, 1992; Pazderski, 2006). O espectro do ligante phen apresenta seis sinais correspondentes aos carbonos C(5,14; 150,23 ppm); C(2,3; 145,83); C(7,12; 136,47); C(8,11; 128,73); C(9,10; 126,92) e C(6,13; 123,54). As principais variações nos deslocamentos químicos do espectro de carbono do complexo [Sb(phen)Cl₃], são observadas para os sinais C(5,14; $\Delta\delta = -2,48$); C(7,12; $\Delta\delta = 4,85$) e C(2,3; $\Delta\delta = -7,23$), indicando a formação do complexo através da complexação do antimônio com os nitrogênios da phen.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do complexo [Sb(phen)φCl₂] estão apresentados nas Figuras 38 e 39. As atribuições dos sinais de ¹H e de ¹³C do complexo [Sb(phen)φCl₂] e do sal φSbCl₂ são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22– Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H e ¹³C do sal φSbCl₂ e do complexo [Sb(phen)φCl₂] em DMSO-*d*₆.

Atribuição	RMN de ¹ H e ¹³ C (δ ppm)		Atribuição	RMN de ¹ H e ¹³ C (δ ppm)	
	φSbCl ₂			[φSb(phen)Cl ₂]	Δδ
H(16,20)	8,12		H(5,14)	9,38	0,31
H(17,19)	7,63		H(7,12)	8,81	0,44
H(18)	7,61		H(9,10)	8,18	0,34
C(15)	141,79		H(6,13,16,20)	8,09-8,02	-
C(16,20)	133,53		H(17,19,18)	7,33-7,16	-
C(18)	131,64		C(15)	161,13	19,34
C(17,19)	129,70		C(5,14)	148,54	-1,69
			C(7,12)	140,54	5,29
			C(2,3)	139,93	3,46
			C(16,20)	135,10	1,57
			C(8,11)	129,34	0,67
			C(18)	127,84	-3,8
			C(9,10)	127,35	0,43
			C(17,19)	127,22	-2,48
			C(6,13)	125,01	1,47

No espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$, feito em $\text{DMSO-}d_6$, foram observados todos os sinais na região dos aromáticos entre δ 123,54-150,23 ppm.

No espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ foram observados todos os sinais dos hidrogênios aromáticos correspondentes ao grupo fenila e ao ligante phen, entre δ 7,16-9,38 ppm.

O multipeto que aparece na região de deslocamento químico δ 8,09-8,02 é atribuído aos sinais dos H(6,13) da phen e aos sinais dos hidrogênios H(16,20) do grupo fenila e aqueles que aparecem na região de deslocamento químico entre δ 7,33-7,16, correspondem aos sinais H(17,19,18) do grupo fenila.

Foram observadas variações nos deslocamentos químicos para todos os sinais de hidrogênios em relação ao ligante livre H(5,14; $\Delta\delta= 0,31$); H(7,12; $\Delta\delta= 0,44$) e H(9,10; $\Delta\delta=0,34$).

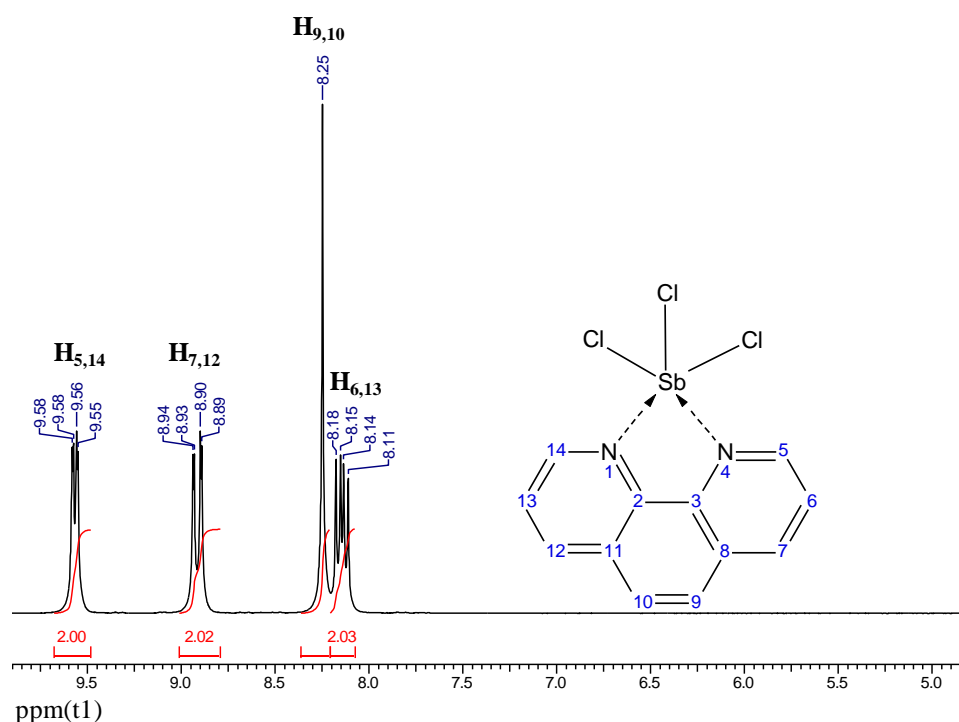


Figura 36- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$.

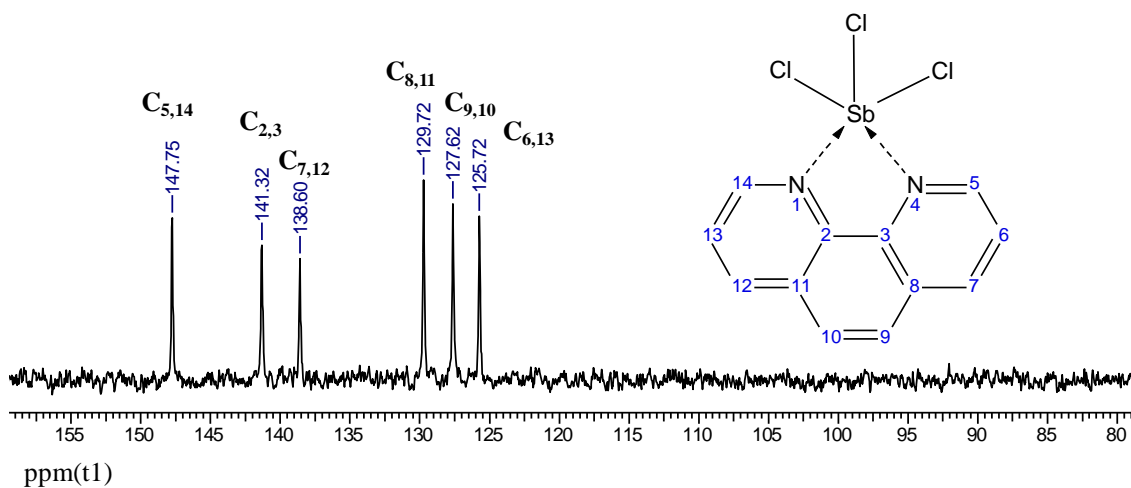


Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$.

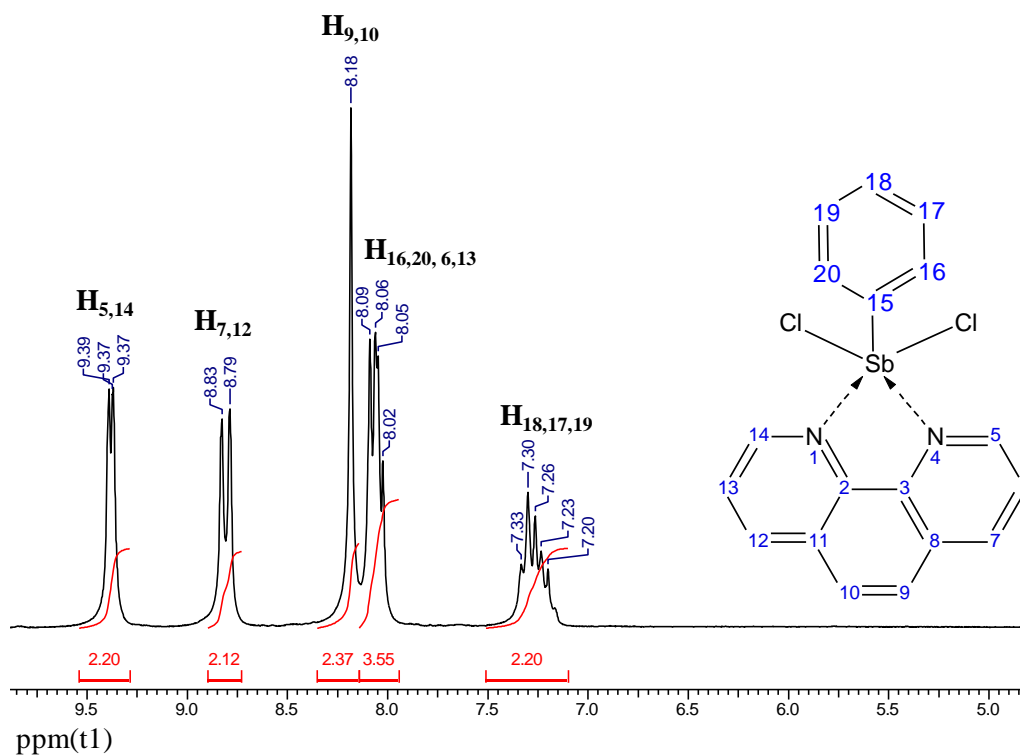


Figura 38- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_2]$

A Figura 39 mostra o espectro RMN de ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ para o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$. Comparativamente ao ligante livre (Tabela 21), os carbonos C(2,3; $\Delta\delta = 5,29$), C(5,14; $\Delta\delta = -1,69$) e C(7,12; $\Delta\delta = 3,46$) foram os mais afetados, indicando a formação do complexo através da ligação do antimônio com os nitrogênios do ligante.

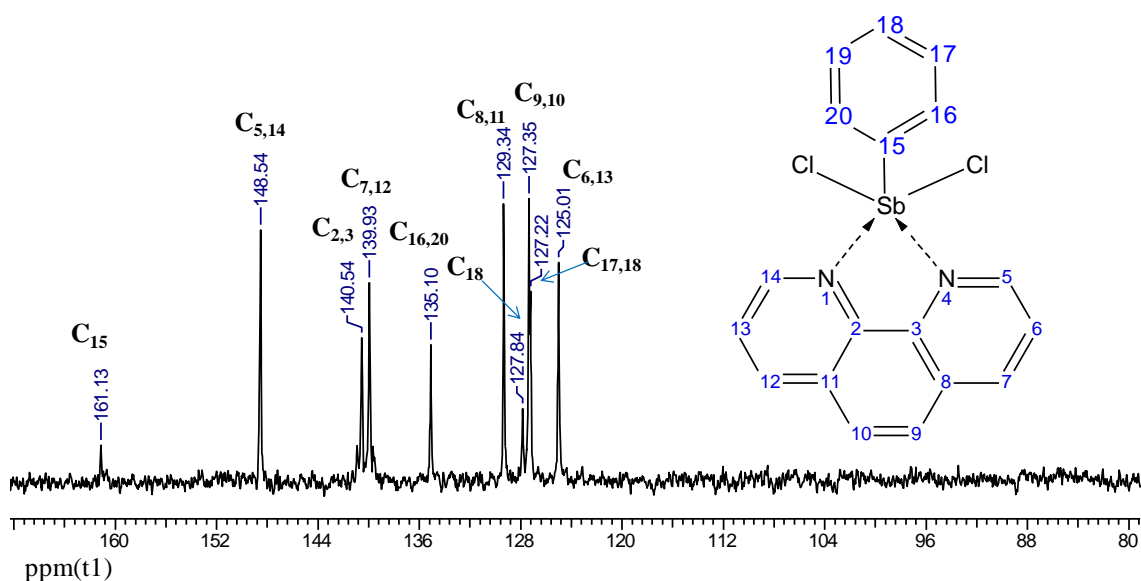


Figura 39- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$

5.2.4 Análise por difração de raios X de monocristal dos complexos da phen com Sb(III)

Os cristais dos complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ foram obtidos por evaporação lenta de uma solução saturada do complexo em DMSO.

As estruturas foram resolvidas utilizando o programa SHELXS-97 e refinadas pelo método de mínimos de métodos usando o programa SHELXL-97.

Os dados cristalográficos e os detalhes da coleta dos dados e do refinamento da estrutura são apresentados na Tabela 23.

As estruturas obtidas da análise por difração de raios X para monocristais dos complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ são apresentadas nas Figuras 40 e 41.

O cristal do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ pertence ao grupo espacial triclinico P-1, enquanto que o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ cristaliza-se no grupo espacial monoclinico C2/c. A unidade assimétrica do cristal do complexo

[Sb(phen)φCl₂] contém uma molécula de ácido acético, procedente do solvente usado na purificação por cristalização do [SbφCl₂].

Tabela 23– Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento para as estruturas [Sb(phen)Cl₃] e [Sb(phen)φCl₂]

	[Sb(phen)Cl ₃]	[Sb(phen)φCl ₂]CH ₃ COOH
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₈ Cl ₃ N ₂ Sb	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ N ₂ O ₂ Sb
Massa molecular (g mol ⁻¹)	408,30	510,03
Temperatura (K)	293(2)	150(2)
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	C2/c
a (Å)	8,429	19,4337(17)
b (Å)	8,592	13,8280(4)
c (Å)	9,900	18,9136(13)
α (°)	82,35	90
β (°)	72,90	129,481(12)
γ (°)	76,77	90
V (Å ³)	665,4	3922,9(4)
Z	2	4
F (000)	392	2008
Densidade calculada (mg/m ³)	2,038	1,724
Dimensões do cristal mm ³	0,38 x 0,38 x 0,15	0,30 x 0,29 x 0,09
Intervalo de θ (°)	2,16-32,82	2,00-29,56
Reflexões coletadas	25514	10400
Reflexões independentes	4680	4686
Rint	0,0344	0,0250
Transmissão máxima/mínima	1,000/0,706	1,000/0,742
Dados/restrrição/parâmetros	4680/ 0 / 163	4680/ 0 / 245
S(Goodness-of-fit on F ²)	1,131	1,190
Índices final R [I > 2σ(I)]	RI = 0,0254, wR2 = 0,057	RI = 0,0335, wR2 = 0,0935
Índices R (Todos os dados)	RI = 0,0354, wR2 =	RI = 0,0458, wR2 = 0,1085
Δρ Max/min (Å ⁻³)	0,496 / -0,788	1,517 / -0,881

A geometria ao redor do Sb(III) no complexo [Sb(phen)Cl₃] corresponde a uma pirâmide distorcida de base quadrada, com o N(2) como vértice, e os átomos Cl(1), Cl(2), Cl(3) e N(1) ocupando o plano equatorial (Figura 40). A distância da ligação Sb(1)-N(1) de 2,3948(17) Å foi maior que a ligação Sb(1)-N(2) de 2,2400(16) Å, indicando uma leve influência *trans* do Cl(1). A somatória dos ângulos formados pelo metal e os átomos do plano equatorial é de 370,87° (Cl(3)-Sb-Cl(2) 95,61(3)°, Cl(3)-Sb-N(1) 89,79(5)°, N(1)-Sb-Cl(1) 80,68(4)°, Cl(1)-Sb-Cl(2) 104,79(3)°), esses dados sugerem uma distorção da pirâmide de base quadrada ideal (Yin; 2009).

As distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) representativos para os complexos $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_2]$ são apresentados nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 24– Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$.

Ligação	Distância (Å)	Ângulo	(°)
Sb(1)-Cl(1)	2,5811(6)	Cl(3)-Sb(1)-Cl(1)	161,39(2)
Sb(1)-Cl(2)	2,4991(6)	Cl(2)-Sb(1)-Cl(1)	104,79(3)
Sb(1)-Cl(3)	2,5499(7)	Cl(2)-Sb(1)-Cl(3)	95,61(3)
Sb(1)-N(1)	2,3948(17)	N(1)-Sb(1)-Cl(3)	89,79(5)
N(1)-C(1)	1,331(3)	N(2)-Sb(1)-Cl(3)	80,01(5)
N(1)-C(12)	1,354(2)	N(1)-Sb(1)-Cl(2)	155,12(4)
Sb(1)-N(2)	2,2400(16)	N(2)-Sb(1)-Cl(2)	85,99(4)
N(2)-C(10)	1,333(2)	N(1)-Sb(1)-Cl(1)	80,68(4)
C(11)-N(2)	1,364(2)	N(2)-Sb(1)-Cl(1)	81,77(5)
		N(2)-Sb(1)-N(1)	71,02(6)

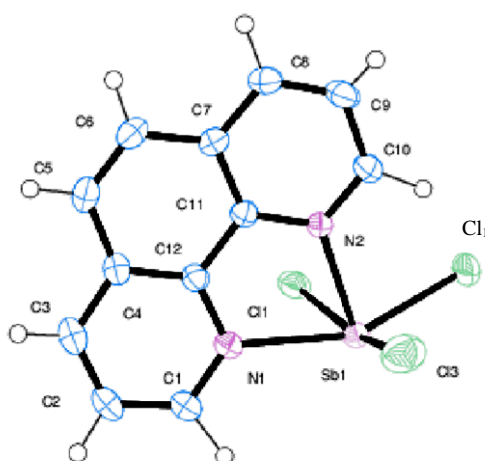


Figura 40– Representação da unidade assimétrica do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_3]$.

Tabela 25– Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados para o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_2]$.

Ligação	Distância (Å)	Ângulo	(°)
Sb(1)-Cl(1)	2,6165(9)	C(21)-Sb(1)-Cl(1)	87,39(9)
Sb(1)-Cl(2)	2,5724(10)	Cl(2)-Sb(1)-Cl(1)	104,79(3)
Sb(1)-N(1)	2,418(3)	N(1)-Sb(1)-Cl(1)	162,33(7)
Sb(1)-N(2)	2,377(3)	N(2)-Sb(1)-Cl(1)	94,39(7)
Sb(1)-C(21)	2,178(4)	C(21)-Sb(1)-Cl(2)	88,52(10)
N(1)-C(1)	1,323(4)	N(1)-Sb(1)-Cl(2)	90,48(7)
N(1)-C(5)	1,367(4)	N(2)-Sb(1)-Cl(2)	158,65(8)
N(2)-C(9)	1,371(4)	C(21)-Sb(1)-N(1)	84,10(11)
N(2)-C(12)	1,327(4)	N(2)-Sb(1)-N(1)	69,24(9)

A geometria em torno do Sb(III) no complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_2]$ corresponde a uma pirâmide distorcida de base quadrada, com o C(2) como vértice, e os Cl(1), Cl(2), N(1) e N(2) ocupando o plano equatorial. As ligações Sb(1)-Cl apresentam em média uma distância de ligação de $2,594 \pm 0,031 \text{ \AA}$ e a média das ligações Sb(1)-N foi de $2,397 \pm 0,029 \text{ \AA}$, enquanto que a distância da ligação Sb(1)-C(21) foi de $2,178(4) \text{ \AA}$. A somatória dos ângulos formados pelo metal e os átomos do plano equatorial é de $358,9^\circ$ (N(1)-Sb(1)-Cl(2) $90,48(7)^\circ$, Cl(2)-Sb(1)-Cl(1) $104,79(3)^\circ$, N(2)-Sb(1)-Cl(1) $94,39(7)^\circ$, N(2)-Sb(1)-N(1) $69,24(9)^\circ$), esses dados sugerem uma leve distorção da pirâmide de base quadrada ideal (Yin; 2009).

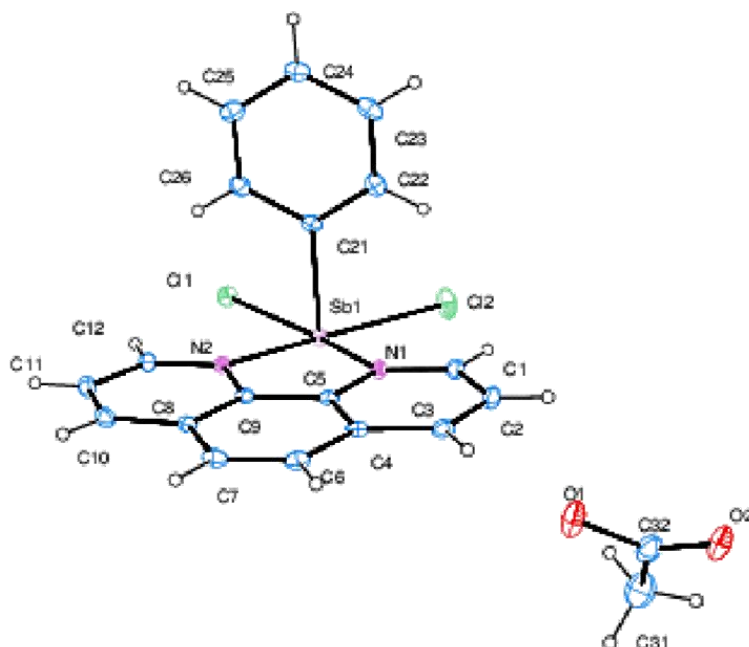


Figura 41– Representação da unidade assimétrica do complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{CH}_3\text{COOH}$.

5.3 Complexo da dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) com Sb(III)

Complexos metálicos do ligante dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) apresentam elevada afinidade pelo ADN. A geometria planar desse ligante com o sistema aromático expandido serve de âncora para a interação dos complexos entre os pares de bases do ADN. Esta interação é proposta para

o mecanismo de ação da atividade leishmanicida de complexos de Cu(II) do dpq (Navarro, 2003). Nós estudamos e caracterizamos o complexo de SbCl₃ com dpq.

5.3.1 Caracterização físico-química do complexo de dpq com Sb(III)

Foi sintetizado um complexo inédito de dpq a partir do sal SbCl₃ como descrito no item 2.4 da parte experimental. O complexo foi caracterizado através das técnicas de determinação do ponto de fusão, análise elementar, medida de condutimetria, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C, HMQC, COSY e DEPT.

A fórmula molecular, a temperatura de fusão, a massa molar, o rendimento da reação, a condutividade e o resultado das análises elementares estão apresentados na Tabela 26. Os resultados das análises elementares e condutimétrica sugerem a formação de um complexo neutro, como representado na Figura 42.

Tabela 26– Percentuais dos elementos C,H,N (valor teórico), massa molar e temperatura de fusão e condutividade molar do complexo de Sb(III) com dpq.

Composto	Análise elementar			Fórmula molecular	(μS/cm) DMF (5% DMSO)	MM (g mol ⁻¹)	PF °C	R.R (%)
	%C	%H	%N					
[Sb(dpq)Cl ₃]	36,10 (36,37)	2,00 (2,18)	12,10 (12,12)	C ₁₄ H ₈ Cl ₃ N ₄ Sb	12,60	460	146	77

PF: ponto de fusão; R.R: rendimento da reação; (valores teóricos).

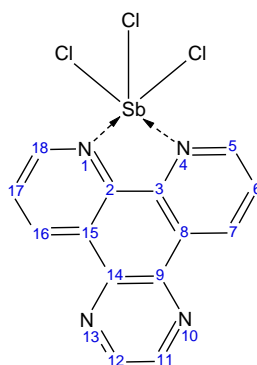


Figura 42– Representação genérica do complexo [Sb(dpq)Cl₃].

5.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do complexo de dpq com Sb(III)

As principais bandas na região do infravermelho, características do dpq correspondem às vibrações dos grupos C=C e C=N, situadas em 1630, 1582 e 1572 cm^{-1} assim como as deformações C-H situadas em 1118, 812 e 740 cm^{-1} (Navarro, 2003).

A Figura 43 mostra o espectro no infravermelho do dpq e do complexo [Sb(dpq)Cl₃]. As atribuições das bandas do ligante e do complexo estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27– Atribuições dos sinais da absorção no infravermelho do ligante dpq e do complexo [Sb(dpq)Cl₃] – suporte KBr.

Composto	Número de Onda, cm^{-1} (intensidade)	Atribuições
dpq	3036(m), 3008 (m)	ν Csp ² -H
	1582(m), 1572(m), 1466(m), 1390(m)	ν C=C, C=N
	1118(m)	ν C-N
	1117(F), 804(m), 740(F)	γ Csp ² -H
[Sb(dpq)Cl ₃]	3052(m)	ν Csp ² -H
	1620(F), 1582(F), 1536(F), 1510(F), 1486(m)	ν C=C, C=N
	1124(m)	ν C-N
	818(m), 726(m)	γ Csp ² -H

O espectro no infravermelho do complexo [Sb(dpq)Cl₃] mostra o deslocamento para menor frequência, assim como um alargamento da banda correspondente às vibrações de estiramento dos grupos C=C e C=N de 1630 cm^{-1} para 1620 cm^{-1} .

As vibrações atribuídas às deformações fora do plano, correspondentes aos hidrogênios dos anéis heteroaromáticos do dpq, situadas em 740 e 812 cm^{-1} deslocam-se para 726 e 818 cm^{-1} no complexo.

O forte deslocamento da banda em 740 cm^{-1} no dpq para 726 cm^{-1} no complexo, correspondente à absorção de deformação angular das ligações C-H dos anéis piridil, mostra que esses anéis heteroaromáticos estão diretamente envolvidos com a ligação ao antimônio, como relatado para complexos formados pelo análogo polipiridínico phen (Schilt, 1958).

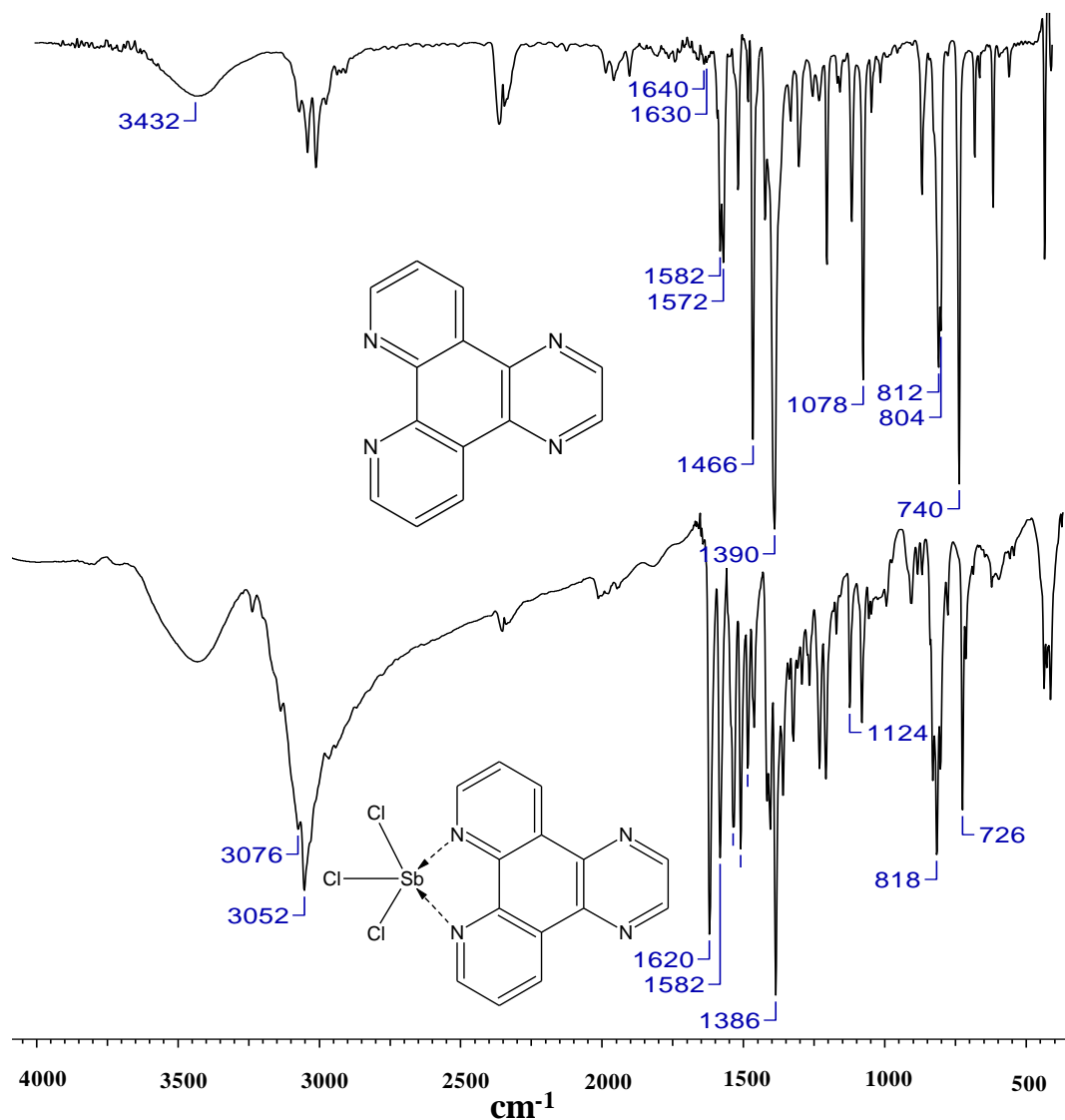


Figura 43– Espectro no IV do complexo [Sb(dpq)Cl₃] e do ligante dpq – suporte KBr.

5.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do complexo de dpq com Sb(III)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C e HMQC do complexo [Sb(dpq)Cl₃] estão apresentados nas Figuras 44, 45 e 46, respectivamente. As

atribuições dos sinais de ^1H e de ^{13}C do complexo e do ligante estão apresentados na Tabela 28.

Os deslocamentos dos sinais de hidrogênio para o ligante estão de acordo com os dados relatados na literatura (Navarro, 2003). O espectro do ligante dpq apresenta quatro sinais, sendo dois dupletos correspondentes aos hidrogênios H(7,16; δ 9,46 ppm) e H(5,18; δ 9,24 ppm), um singlete correspondente aos H(11,12; δ 9,28 ppm) e um tripleto correspondente a H(6,17; δ 7,97 ppm).

As principais variações nos deslocamentos químicos para o complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$ com relação ao ligante livre são observadas para os sinais dos hidrogênios H(5,8; $\Delta\delta=0,13$), H(7,16; $\Delta\delta= 0,26$) e H(6,17; $\Delta\delta= 0,32$), indicando a formação do complexo através da ligação do antimônio aos nitrogênios N(1) e N(4) do ligante.

Tabela 28– Atribuições dos sinais e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante dpq e o complexo de Sb(III) em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuição	RMN de ^1H e ^{13}C (δ ppm)		
	dpq	$[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$	$\Delta\delta$
H7,16	9,46 (9,43)	9,72	0,26
H5,18	9,24 (9,24)	9,37	0,13
H11,12	9,18 (9,18)	9,30	0,12
H6,17	7,97 (7,96)	8,29	0,32
C5,18		149,42	
C11,12		146,61	
C2,3		140,66	
C9,14		138,75	
C7,16		136,92	
C8,15		127,98	
C6,17		126,54	

Os valores entre parênteses para o dpq correspondem aos sinais de RMN ^1H obtidos em CDCl_3 .

O espectro do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$ apresenta sete sinais correspondentes aos carbonos C(5,18; 149,42 ppm); C(11,12; 146,61); C(2,3; 140,66); C(9,14; 138,75); C(7,16; 136,92); C(8,15; 127,98) e C(6,17; 126,54).

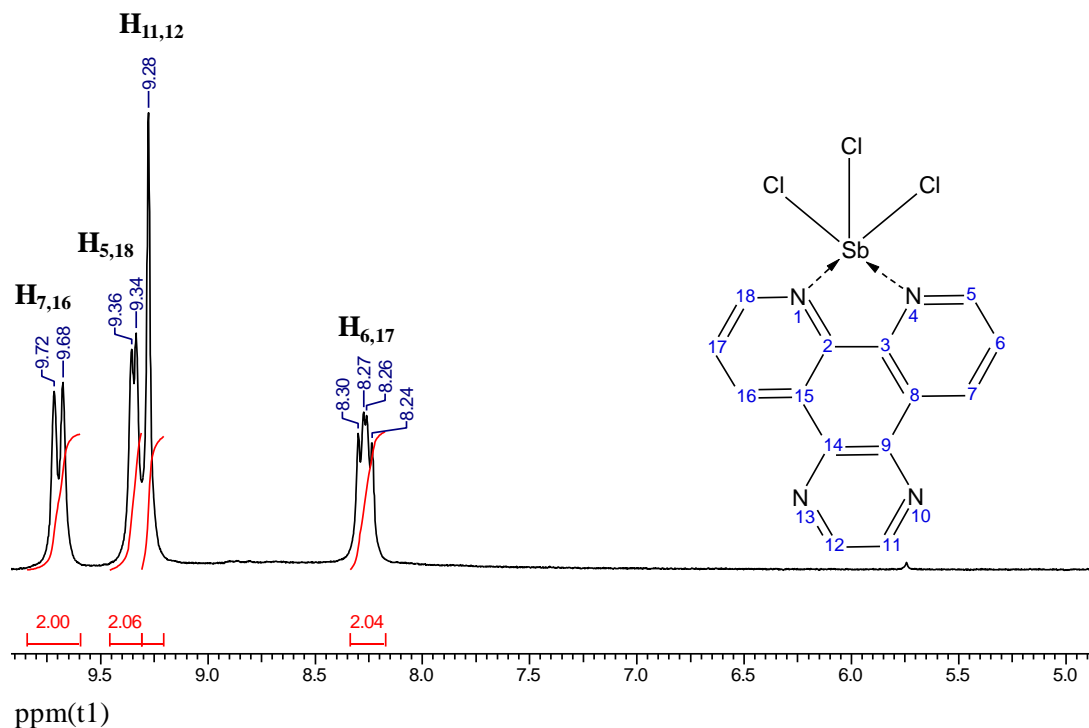


Figura 44- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$.

A identificação dos sinais de hidrogênio permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos verificados no mapa de contorno HMQC (Figura 46). As correlações verificadas foram: H7,16/C7,16; H5,18/C5,18; H11,12/C11,12 e H6,17/C6,17.

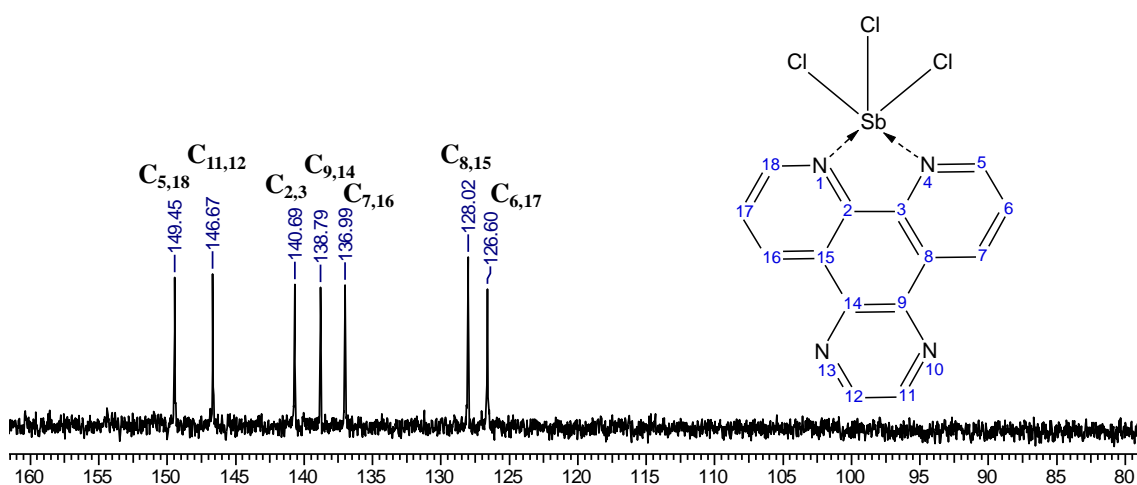


Figura 45- Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo $[\text{Sb}(\text{dpq})\text{Cl}_3]$.

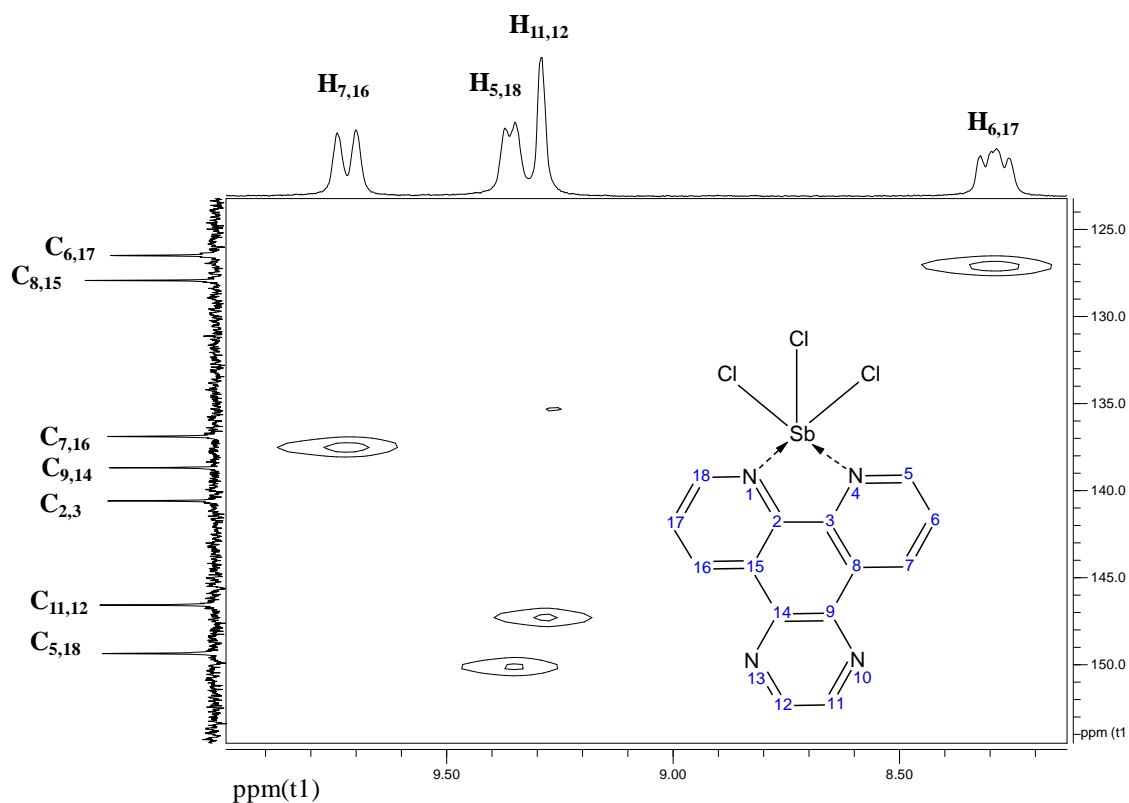


Figura 46- Espectro HMQC (200 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[Sb(dpq)Cl_3]$.

5.3.4 Avaliação da atividade leishmanicida

A atividade antileishmaniana foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), mediante a determinação da concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas (CI_{50}), realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.5.1.

Todos os complexos de Sb(III) com os ligantes polipiridínicos bipy, phen e dpq mostraram-se fortemente ativos contra as formas promastigotas de *Leishmania*, como mostrado na Tabela 29. Esses complexos apresentaram valores da concentração inibitória CI_{50} da ordem de $nmol L^{-1}$, muito menores do que aqueles obtidos para o fármaco de controle, tartarato de antimônio(III) e potássio (da ordem de $\mu mol L^{-1}$).

Tabela 29– Concentrações inibitórias (CI₅₀) dos complexos de Sb(III) contra promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb(III).

Cepa	CI ₅₀ (nmol·L ⁻¹)±MEP							
	[Sb(bipy)Cl ₃]	[Sb(bipy)φCl ₂]	[Sb(phen)Cl ₃]	[Sb(phen)φCl ₂]	[Sb(dpq)Cl ₃]	SbCl ₃ μmol·L ⁻¹	TA μmol·L ⁻¹	SbφCl ₂
<i>L. infantum chagasi</i> SSb	1,34±0,23	2,21±0,28	1,66±0,36	0,26±0,12	0,43±0,10	341±2	100±3	1,79±0,56
<i>L. infantum chagasi</i> RSb	1,87±0,14	2,54±0,13	1,93±0,28	1,26±0,32	1,15±0,22	462±3	>2700	1,48±0,08
<i>L. amazonensis</i> SSb	18,88±1,98	1,69±0,14	0,78±0,18	0,47±0,08	2,28±0,19	362±2	83±1	0,97±0,07
<i>L. amazonensis</i> RSb	9,13±2,37	1,65±0,30	0,47±0,22	0,28±0,04	1,62±0,28	1502±2	>2700	0,74±0,07

TA tartarato de antimônio(III) e potássio , fármaco de controle; MEP média do erro padrão; SSb e RSb sensível e resistente ao Sb(III) respectivamente

Os complexos obtidos a partir de SbCl_3 apresentaram valores da concentração inibitória CI_{50} entre 0,43 e 18,88 nmolL^{-1} , muito menores do que o sal precursor, o qual esteve entre 341-1502 μmolL^{-1} . Na maioria dos casos, os complexos se mostraram mais ativos contra as cepas de *L. infantum chagasi* que seus respectivos ligantes. Em contraste, a atividade desses complexos contra as cepas de *L. amazonensis* foram similares e em alguns casos menores do que a atividade dos respectivos ligantes. A maior diferença entre a atividade do ligante e a do complexo foi observada para o $[\text{Sb}(\text{bipy})\text{Cl}_3]$, que mostrou um valor de CI_{50} 12 vezes menor do que para o ligante bipy.

Os complexos obtidos a partir do $\text{Sb}\phi\text{Cl}_2$ apresentaram valores da concentração inibitória CI_{50} entre 0,26 e 2,54 nmolL^{-1} , enquanto que os valores CI_{50} do sal precursor estiveram entre 0,74- 1,79 nmolL^{-1} .

É interessante resaltar que as formas promastigotas mutantes de *Leishmania*, cepas resistentes ao $\text{Sb}(\text{III})$, obtidas de acordo com protocolo relatado na seção 2.5.1, mostraram-se muito sensíveis ao $\text{Sb}\phi\text{Cl}_2$, sugerindo que o grupo fenila ligado ao $\text{Sb}(\text{III})$ está envolvido na capacidade do complexo para escapar dos mecanismos de resistência ao $\text{Sb}(\text{III})$ desenvolvidos pelos parasitas. Apesar da elevada atividade do $\text{Sb}\phi\text{Cl}_2$ em relação ao fármaco de referência (TA) e ao SbCl_3 , o complexo $[\text{Sb}(\text{phen})\phi\text{Cl}_2]$ mostrou-se ainda mais ativo que o sal precursor em todas as cepas de *Leishmania*, com valores de IC_{50} entre 1,3 e 6,9 vezes menores do que os obtidos para o sal precursor.

Em *L. infantum chagasi*, os complexos da bipy não mostraram diferenças significativas da atividade entre as cepas sensíveis e resistentes ao $\text{Sb}(\text{III})$, quando comparadas com o ligante livre, sugerindo que a coordenação do $\text{Sb}(\text{III})$ não promoveu a melhora da atividade dos complexos contra esses parasitas de *Leishmania*. Em contraste, pode-se observar que para os complexos da phen e do dpq a coordenação do $\text{Sb}(\text{III})$ incrementou significativamente a atividade desses complexos contra parasitas de *L. infantum chagasi*.

Em *L. amazonensis*, os complexos da bipy foram os únicos que mostraram diferenças significativas da atividade entre as cepas sensíveis e resistentes ao $\text{Sb}(\text{III})$, quando comparadas com o ligante livre, sugerindo que a

coordenação ao Sb(III) incrementou significativamente a atividade dos complexos contra esses parasitas de *Leishmania*. Ressaltamos que para os complexos da phen e do dpq a coordenação ao Sb(III) não promoveu melhora significativa da atividade desses complexos contra parasitas de *L. amazonensis*.

O potencial dos complexos como drogas leishmanicidas tem sido explorado há várias décadas. O trabalho desenvolvido nesta tese soma-se aos relatos recentes da atividade contra formas promastigotas de *Leishmania* de complexos de Ru(II), Ru(III)-clotrimazol (Martínez, 2012), de Ni(II) e Cu(II) com derivados da triazolopirimidina (Ramírez-Macías, 2012; Boutaleb-Charki, 2009), de Bi(III) com derivados do ácido benzoico (Andrews, 2011). Na maioria dos casos esses complexos apresentaram toxicidade relativamente baixa contra células humanas e foram mais ativos contra a *Leishmania* que as drogas de controle, com valores da CI_{50} na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nesse trabalho, os complexos de Sb(III) e os ligantes polipiridínicos bipy, phen e dpq mostraram-se fortemente ativos contra as formas promastigotas de *Leishmania* sensíveis e resistentes ao Sb(III). Esses complexos apresentaram valores da concentração inibitória CI_{50} na ordem de nmol L^{-1} , muito menores do que aqueles obtidos para o fármaco de controle, o tartarato de antimônio(III) e potássio (na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$) e aos relatados em trabalhos relacionados na literatura. Por isso, acreditamos que os compostos estudados possuem um excelente potencial como novos fármacos leishmanicidas.

6 MECANISMO DE AÇÃO

Com o intuito de estabelecer um possível mecanismo de ação citotóxica para os complexos de Sb(III) com os ligantes bipy e a phen, foi avaliada a capacidade destes compostos de modificar a conformação estrutural de um modelo peptídico da proteína nucleocapsídica NCp7 do vírus HIV-1, mediante análises por dicroísmo circular (DC).

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica amplamente usada na determinação estrutural de proteínas e peptídeos, especialmente na determinação de estruturas secundárias (Greenfield, 1996). Nas proteínas e peptídeos os principais grupos opticamente ativos em DC são as ligações amida e os grupos aromáticos, que aparecem separados em duas regiões espectrais do ultravioleta. A região do UV distante (178-250 nm) corresponde principalmente aos cromóforos dos grupos amida e a região do UV próximo (250-340 nm) está relacionada com os resíduos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina (Cai, 2003).

6.1 Motivos dedos de zinco como alvos na quimioterapia

Nas últimas décadas, as proteínas dedos de zinco têm sido intensamente estudadas como possíveis alvos para compostos metálicos, principalmente porque essas biomoléculas são responsáveis por diversas funções vitais no desenvolvimento de células e de alguns vírus. Dentre as diversas funções que desempenham as proteínas com motivos do tipo dedos de zinco podem-se destacar: os processos regulatórios da expressão gênica, a reparação do ADN e o controle pós-transcricional (Blackshear, 2002). Nesses estudos, geralmente é analisada a interação de íons metálicos ou metalocompostos com modelos peptídicos, especificamente, sequências peptídicas contendo motivos dedos de zinco de proteínas que cumprem funções vitais no desenvolvimento de diversas doenças, tais como a artrite (Larabee, 2005), as leishmanioses (Frezárd, 2012), o câncer (Hurtado, 2012) e a AIDS (Quintal, 2012). Existem diferentes modos de interação de metais com motivos dedos de zinco, geralmente, nesse tipo de interação o

íon de zinco é substituído parcial ou totalmente por outro metal, com perda das funções do peptídeo na maioria dos casos relatados. No entanto, pode acontecer a ejeção do zinco sem substituição e a consequente redução dos resíduos de cisteínas (Hartwig, 2001).

Recentemente, foi demonstrado, mediante estudos de interação com peptídeos dedos de zinco, que um dos possíveis mecanismos de ação do aurotiomalato, uma droga à base de ouro usada contra a artrite, envolve a interação do íon Au(I) com proteínas que contem motivos dedos de zinco (Larabee, 2005; Franzman, 2008). Também foi sugerido que a interação do Sb(III) com proteínas dedos de zinco do tipo CCCH poderia ser a responsável pela ação farmacológica das drogas antimoniais (Frezárd, 2012; Demicheli, 2008). Estudar a interação de compostos que mostraram ter alta atividade leishmanicida como modelos dedos de zinco poderia levar a um melhor entendimento dos mecanismos de ação de agentes antiparasitários e um avanço no campo do desenho racional de drogas mais seletivas e menos tóxicas.

6.2 Mecanismo de ação da 1,10-Fenantrolina (phen)

A 1,10-fenantrolina é um composto com atividade bioquímica, inibidora de enzimas metalopeptidases (Demidov; 2012). Existem relatos na literatura que mostram que a quelação do íon zinco (II) presente nessas enzimas é seletiva pela a phen quando comparado com outros quelantes como o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Messersmidt, 2004). Por tais razões, a phen é utilizada em estudos de caracterização de enzimas metalopeptidases contendo zinco na estrutura (Addepalli, 2008; Lee, 1996).

Existem vários relatos na literatura envolvendo a phen na caracterização de metalopeptidases intracelulares (Choudhury; 2010) e de superfície em parasitas de *Leishmania* (Schneider;1993; Alves; 2004). Esses estudos permitem estabelecer a hipótese de que a presença do íon zinco é fundamental na atividade dessas enzimas. As metalopeptidases, são as principais proteínas da superfície da membrana extracelular de todas as

espécies da forma promastigota de *Leishmania* sp e estão envolvidas nos mecanismos de infecção e desenvolvimento do parasita, em algumas espécies da forma amastigota (Russell, 1986). A phen também possui a capacidade de inativar a Leishmanolisina, a maior glicoproteína na superfície celular de promastigotos de *Leishmania major* (Messerschmidt, 2004).

Embora, o ligante phen apresente alta seletividade para inibir a atividade desse tipo de enzimas, não existem relatos relacionando a atividade desse ligante, seus derivados ou complexos metálicos em parasitas de leishmania.

6.3 Interação com o modelo peptídico

Na Figura 47 estão ilustrados os espectros de dicroísmo circular para uma solução do peptídeo KGC e de soluções dos complexos $[Sb(bipy)Cl_3]$ e $[Sb(bipy)\phi Cl_2]$ com o peptídeo KGC na relação molar (1:1).

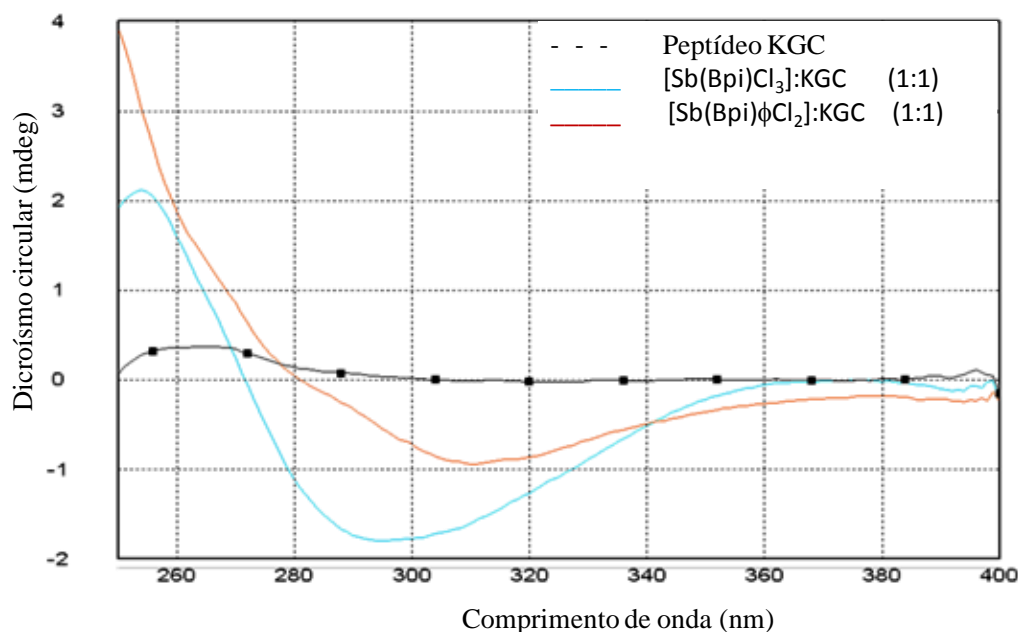


Figura 47- Espectro de dicroísmo circular do peptídeo $[KGC]= 50,0 \mu M$ em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre e em presença de concentrações equimolares dos complexos da bipy.

É importante observar que esses complexos não apresentam sinal no DC.

Observa-se que o espectro da solução do peptídeo KGC livre não apresenta sinal dicroico significativo na região espectral analisada. Em contraste, as

soluções do peptídeo com os complexos $[Sb(bipy)Cl_3]$ e $[Sb(bipy)\phi Cl_2]$ apresentaram uma banda negativa com máximos em 290 e 310 nm, respectivamente. Também foi observada uma banda positiva para as soluções do peptídeo com os complexos, sendo que para o complexo $[Sb(bipy)\phi Cl_2]$ essa banda é mais intensa e o máximo não aparece na região espectral analisada. Para a solução do complexo $[Sb(bipy)Cl_3]$ e o peptídeo a banda positiva aparece com um máximo em 250 nm.

Na Figura 48 estão ilustrados os espectros de dicroísmo circular para uma solução do peptídeo KGC e de soluções dos complexos $[Sb(phen)Cl_3]$ e $[Sb(phen)\phi Cl_2]$ com o peptídeo KGC na relação molar (1:1).

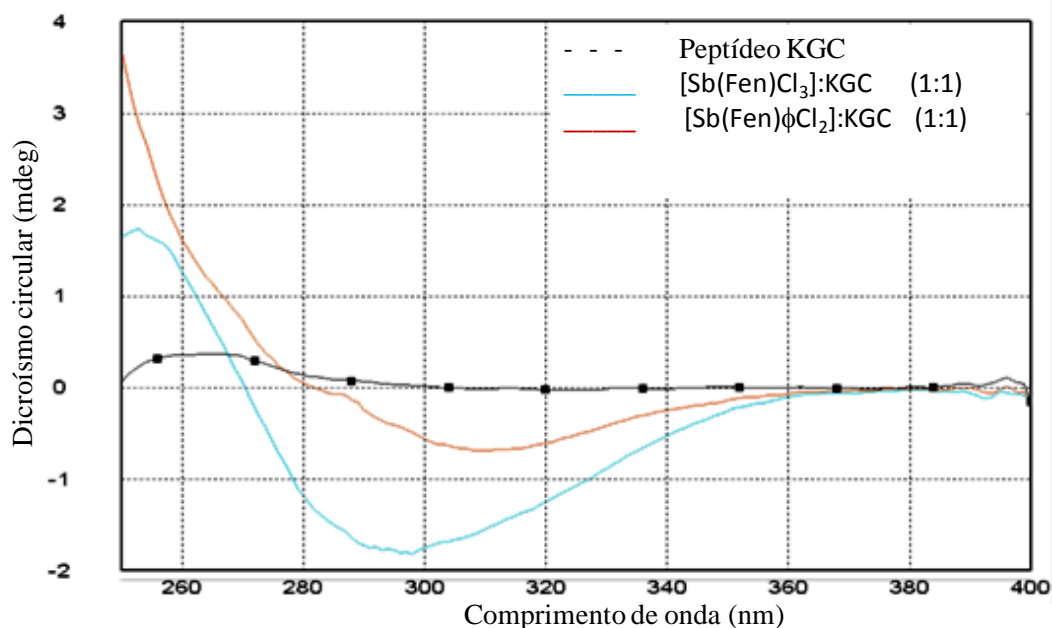


Figura 48- Espectro de dicroísmo circular do peptídeo $[KGC]= 50,0 \mu M$ em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre e em presença de concentrações equimolares dos complexos da bipy.

6.4 Estudos do deslocamento do átomo de zinco

Em vários relatos da literatura é sugerido que as enzimas ADN polimerase e a ribonucleotídeo redutase, metaloenzimas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos, poderiam ser os alvos principais da phen (Chang, 1970; Chang,

1978). Diferentes aspectos suportam a hipótese do mecanismo de ação da phen envolvendo a inativação de metaloenzimas por coordenação do centro metálico. Especificamente para o íon de zinco, a elevada constante de equilíbrio do sistema Zn^{2+} -phen $\sim 1,5 \times 10^6$ (Eatough, 1970) indica que o complexo poderia ser formado com relativa facilidade nos meios biológicos. Como já citado, o zinco que é considerado um dos principais íons reguladores do metabolismo nas células (Walkup, 2000), encontra-se presente em diversos tipos de enzimas, entre elas as proteínas com motivos dedos de zinco que cumprem funções vitais para as células (Laity, 2001). Os estudos da ejeção do Zn(II) do sistema KGC:Zn pela fenantrolina, é motivada pelos resultados obtidos neste trabalho com relação à elevada sensibilidade dos parasitas de Leishmania aos ligantes polipiridínicos e aos complexos de Sb(III). Sabe-se que a phen possui a capacidade de inativar as funções de diversas proteínas dedos de zinco por quelação do íon Zn(II), dentre essas proteínas o conhecido fator de transcrição IIIA (Makowski, 1992) e a proteína do vírus de imunodeficiência humana HIV-1 (Lee, 1996). Esses resultados permitem levantar a hipótese de que a elevada suscetibilidade dos parasitas de Leishmania aos ligantes polipiridínicos, estaria relacionada com a inativação de metaloenzimas essenciais para o parasita, ou mesmo a inativação de proteínas dedos de zinco vitais para o parasita, como já discutido anteriormente. Esse tipo de mecanismo em parasitas de Leishmania envolvendo proteínas com motivos dedos de zinco já foi sugerido por Demicheli e colaboradores (Demicheli, 2008).

Na Figura 49 estão ilustrados os espectros de dicroísmo circular para a solução do peptídeo KGC livre, do dedo de zinco Zn:KGC e da solução após 10 min de incubação do peptídeo dedo de zinco com a fenantrolina na relação molar (1: 0,5).

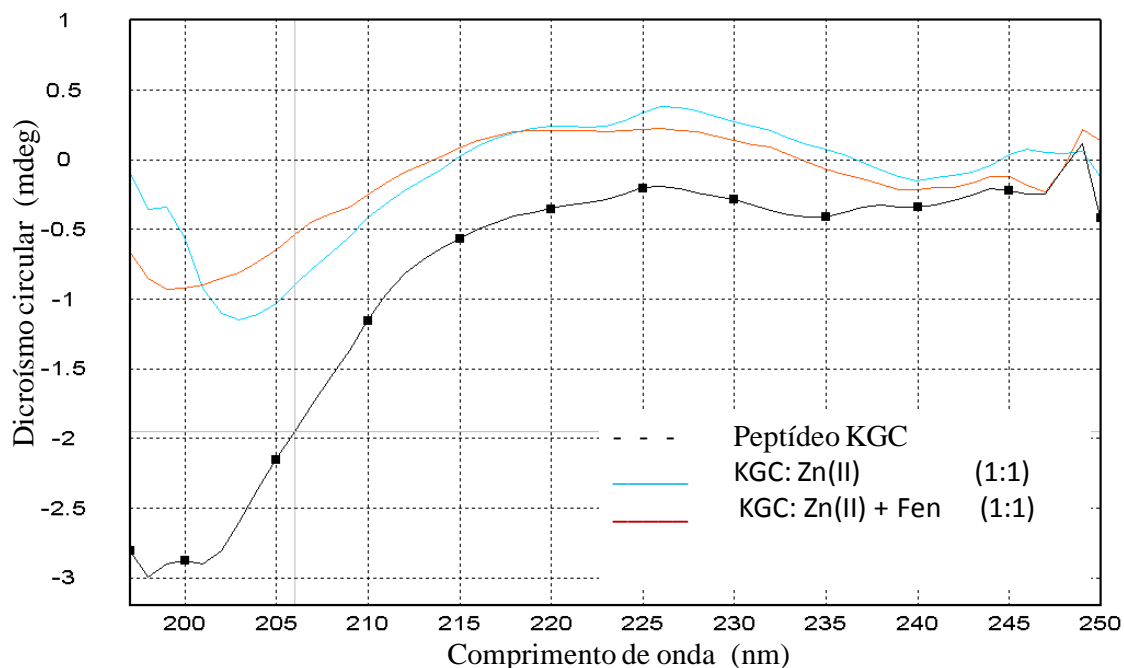


Figura 49- Espectro de dicroísmo circular do peptídeo [KGC]= 50,0 μ M em solução tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, livre, do peptídeo dedo de zinco KGC:Zn e na presença de phen..

A adição da fenantrolina induz mudanças significativas no espectro do peptídeo dedo de zinco. Observa-se o deslocamento da banda negativa para comprimentos de onda menores, possivelmente devida à coordenação do Zn pelo ligante phen. O resultado sugere que a phen possa induzir mudanças estruturais significativas no complexo KGC:Zn, possivelmente devido à quelatação do íon Zn(II). Também permite considerar as proteínas dedo de zinco, como um possível alvo para fármacos antiparasitários. A ação dos complexos estudados poderia ser favorecida pela ação sinérgica do ligante, quelando o Zn(II) e pela ação do metal substituindo o Zn(II) no peptídeo.

7 CONCLUSÕES.

No presente trabalho foi avaliada a atividade leishmanicida da série de compostos polipiridínicos 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenantrolina (phen), dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz). A atividade leishmanicida foi determinada em formas promastigotas, sensíveis e resistentes ao Sb(III), em cepas de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*

Os compostos 2,2'-bipiridina (bipy), 1,10-fenatrolina (phen) e o dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) apresentaram a maior atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), com valores de concentração inibitória CI_{50} na ordem de nmol L^{-1} . O composto com maior sistema aromático da série o dipirido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (dppz) mostrou ser muito mais ativo que a droga controle, porém sua atividade foi até 1000 vezes menor que a bipy, fen e o dpq.

Dos experimentos de interação da phen com modelos de proteínas dedos de zinco, foi demonstrado que a phen pode deslocar os ions Zn(II) desse modelo peptídico, sugerindo que o mecanismo de ação da phen contra os parasitas leishmania poderia envolver a inativação de proteínas dedos de zinco essenciais para a sobrevivência do parasita. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os parasitas podem ser sensíveis à inativação de metaloproteínas.

Complexos inéditos do dppz foram obtidos a parti dos sais SbCl_3 e BiCl_3 ($[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ e $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$). As estruturas cristalográficas desses complexos foram determinadas por difração de raios X. Esses complexos mostraram elevada atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III).

A atividade em *Leishmania infantum chagasi* do complexo $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$, quando comparada com a droga controle, o tartarato de antimônio e potássio, foi 87 vezes maior nas cepas sensíveis e 2930 vezes maior nas

cepas resistentes ao Sb(III). Não foram observadas diferenças significativas da atividade leishmanicida entre os complexos $[Sb(dppz)Cl_3]$ e $[Bi(dppz)Cl_3]$.

Estudos do coeficiente de partição dos complexos mostraram que a coordenação do metal ao ligante aumenta a solubilidade do complexo em relação ao dppz, sugerindo um aumento da biodisponibilidade e o consequente aumento da atividade.

Foram preparados complexos inéditos da bipy, phen e dpq a partir dos sais $SbCl_3$ e $SbCl_2$. As estruturas cristalinas dos complexos de phen foram determinadas por difração de raios X.

Esses complexos mostraram elevada atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III).

Para os complexos da phen, a coordenação ao Sb(III) promoveu um aumento na atividade leishmanicida, especificamente para o complexo $[Sb(phen)Cl_2]$, que foi 30 vezes mais ativo do que o ligante livre e 7 vezes mais ativo do que o sal precursor.

A combinação de inibidores de metaloproteínas com o antimônio, metaloide usado tradicionalmente contra as leishmanioses, gerou complexos com forte atividade leishmanicida. Os resultados obtidos indicam que os ligantes e os complexos estudados nesse trabalho possuem grande potencial como fármacos leishmanicidas, especialmente os complexos do antimônio com a fenantrolina que mostraram maior atividade.

Todos os complexos de antimônio, obtidos neste trabalho, apresentaram elevada atividade contra as cepas resistentes ao Sb(III), sugerindo que a coordenação desse metal a ligantes polipiridínicos é uma excelente estratégia na abordagem de um dos principais problemas do uso dos antimoniais no tratamento das leishmanioses, a resistência.

BIBLIOGRAFIA

Addepalli, B., Hunt, A. G., Redox and heavy metal effects on the biochemical activities of an Arabidopsis polyadenylation factor subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 473: 88–95.

Alves J. L., Mendonça-Lima, F. W, Alves, C. R. The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases. *Vet. Parasitol.* **2004**, 119: 137–145.

Amato, V.S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Tópicos em terapêutica. *Rev. Bras. Med.* **1998**, 53: 202-212.

Anderegg, G. Pyridine derivatives as complex formers. V. The metal complexes of 1,10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine. *Helv. Chim. Acta.* **1963**, 46: 2397-2410.

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.

Behrouzi-Fardmoghadam, M., Poorrajab, F., Ardestani, S. K., Emami, S., Shafieea, A., Foroumadi, A. Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2008**, 16: 4509–4515.

Bencini, A. Lippolis, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordin. Chem. Rev.* **2010**, 254: 2096–2180.

Benítez, J., Guggeri, L., Tomaz, I., Pessoa, J. C., Moreno, V., Lorenzo, J., Avilés, F. X.; Garat, B., Gambino, D. A novel vanadyl complex with a polypyridyl ADN intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103: 1386–1387.

Berg, J. M.; Shi, Y.. The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc. *Science.* **1996**, 271: 1081-1085.

Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* **1998**, *10*(3): 560-586.

Berman, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*: 684-70.

Bilbao-Ramos, P., Galiana-Roselló, C., Dea-Ayuela, M.A., González-Alvarez, M., Vega, C., Rolón, M., Pérez-Serrano, J., Bolás-Fernández, F., González-Rosende, M. G. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. *Parasitol. Int.* **2012**, *61*: 604-613.

Blackman, M. J. Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10*: 1925-1934.

Blackshear, P. J. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*: 945-952.

Boogaard, P. J., Slikkerveer, A., Nagelkerke, J. F., Mulder, G. J. The role of metallothionein in the reduction of cisplatin induced nephrotoxicity by Bi³⁺ pretreatment in the rat *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*: 369-375.

Borst, P., Ouellette, M. New Mechanisms of Drug Resistance in Parasitic Protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*: 427-460.

Boutaleb-Charki, S., Marín, C., Maldonado, C. R., Rosales, M. J., Urbano, J., Guitierrez-Sánchez, R., Quirós, M., Salas, J. M., Sánchez-Moreno, M. Copper (II) Complexes of [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents. *Drug Met. Let.* **2009**, *3*: 35-44.

Brandt, W. W., Dwyer, F. P., Gyarfas, E. C. Chelate complexes of 1,10-phenanthroline and related compounds. *Chem. Rev.* **1954**, *54*, 959-1017.

Brayer, K. J., Segal, D. J. Keep Your Fingers Off My DNA: Protein-Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains. *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *50*:111-131.

Burguera, J. L., Burguera, M., Petit de pena, Y., Lugo, A., Anez, N. Selective determination of antimony (III) and antimony (V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimonate. *Trace Elem. Med.* **1993**, 10: 66-70.

Butsch, K., Gust, R., Klein, A., Ott, I., Romanska, M. Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium(II) Complexes. *Dalton Trans.* **2010**, 39: 4331-4340.

Cai, X., Dass, C. Conformational Analysis of Proteins and Peptides. *Current. Organic. Chemistry.* **2003**, 7: 1841-1854.

Carroll, P. J., Brus, L. E. Picosecond Raman Scattering Study of Electron Localization in the Charge-Transfer Excited State of Tris(bipyridine)ruthenium(II). *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109: 7613-7616.

Carter, N. S., Drew, M.E., Sanchez, M., Vasudevan, G., Landfear, S.M., Ullman, B. Isolation and functional characterization of the PfNT1 nucleoside transporter gene from Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275: 10683-10691.

Chang, C. H., Yarbrow, J. W., Mann, jr. D. E., Gautieri, R. F. Effects of 1,10-phenanthroline and a zinc complex of 1,10-phenanthroline on nucleic acid synthesis in mouse liver and spleen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, 205(1):27-32.

Chang, L. M. S., Bollum, F. J. Deoxynucleotide- polymerizing enzymes of calf thymus gland. IV. Inhibition of terminal deoxynucleotidyl transferase by metal ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1970**, 65: 1041-1048.

Che, G., Li, W., Kong, Z., Su, Z., Chu, B., Li, B., Zhang, Z., Hu, Z., Chi, H. Hydrothermal Syntheses of Some Derivatives of Tetraazatriphenylene. *Synth. Commun.* **2006**, 36 (17): 2519-2524.

Chen, H., Gao, W., Zhang, F., Dou, C., Yang, P. The ligand-structure-selective binding of oligonucleotide by cobalt complexes. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, 13: 310-313.

Chen, W., Turro, C., Friedman, L. A., Barton, J. K., Turro, N. J. Resonance Raman Investigation of Ru(phen)₂(dppz)²⁺ and Related Complexes in Water and in the Presence of DNA. *J. Phys. Chem. B.* **1997**, *101*: 6995-7000.

Choudhury, R., Das, P., De, T., Chakraborti T. Immunolocalization and characterization of two novel proteases in *Leishmania donovani*: Putative roles in host invasion and parasite development. *Biochimie.* **2010**, *92*: 1274-1286.

Coyle, B., Kavanagh, K., McCann, M., Devereux, M Geraghty, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. *BioMetals.* **2003**, *16*: 321-329.

Croft, S. L., Barrett, M. P., Urbina, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends. Parasitol.* **2005**, *21*: 508-512.

Croft, S. L., Seifert, K., Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian. J. Med. Res.* **2006**, *123*(3):399-410.

CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.

Cunningham, M. L., Zvelebil, M. J. J. M., Fairlamb, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*:285-295.

Decuypere, S., Rijal, S., Yardley, V., De Doncker, S., Laurent, T., Khanal, B., Chappuis, F. & Dujardin, J. C. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2005**, *49*: 4616-4621.

Delgadillo, A.; Romo, P.; Leiva, A. M.; Loeb, B. Synthesis and Characterization of Ruthenium Complexes with Substituted Pyrazino[2,3-*f*][1,10]-phenanthroline (=Rppl; R=Me, COOH, COOMe). *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86* (6): 2110-2120.

Demicheli, C., Frézard, F., Mangrum, J.B., Farrell, N. P. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. *Chem. Commun.* **2008**, *39*: 4828-4830.

Demicheli, C., Santos, L. S., Ferreira, C. S., Bouchemal, N., Hantz, E., Eberlin, M. N., Frézard, F. Synthesis and characterization of Sb(V)-adenosine and Sb(V)-guanosine complexes in aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta.* **2006**, 359:159.

Demicheli, C., Frézard, F., Lecouvey, M., Garnier-suillerot, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Acta.* **2002**, 1570: 192-198.

Demidov, V. N., Kasyanenko, N. A., Antonov, V. S., Volkov, I. L., Sokolov, P. A., Pakhomova, T. B., Simanova, S. A. Reaction with DNA and Pharmacologic Activity of 1,10-Phenanthroline and Electron-Rich 1,10-Phenanthrocyanine Complexes of *d*-Elements. *Russ. J. Gen. Chem.* **2012**, 82 (3): 602-620.

Desjeux, P. Leishmania and HIV Co-infection in Southwestern Europe, 1990-1998, Retrospective Analysis of 965 Cases. Geneva: World Health Organization. **2000**.

Devereux, M., McCann, M., O'Shea, D., O'Connor, M., Kiely, E., McKee, V., Naughton, D., Fisher, A., Kellett, A., Walsh, M., Egan, D., Deegan, D. Synthesis, Superoxide Dismutase Mimetic and Anticancer Activities of Metal Complexes of 2,2-Dimethylpentanedioic Acid (2dmepdaH₂) and 3,3-Dimethylpentanedioic acid (3dmepdaH₂): X-Ray Crystal Structures of [Cu(3dmepda)(bipy)]₂ · 6H₂O and [Cu(2dmepda)(bipy)(EtOH)]₂ · 4EtOH (bipy = 2,2'-Bipyridine). *Bioinorg. Chem. Appl.* **2006**, 10: 1-6.

Dickenson, J. E.; Summer, L. A. Derivatives of 1,10-Phenanthroline-5,6-quinone. *Aust. J. Chem.*, **1970**, 23 (5):1023-1027.

Eatough, D. J. Calorimetric Determination of Equilibrium Constants for Very Stable Metal-Ligand Complexes. *Anal. Chem.* **1970**, 42(6): 635-639.

Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, K. J. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chem. Rev.* **1999**, 99: 2777-2795.

Essodaigui, M., Frézard, F., Moreira, E. S. A., Dagger, F., et al. Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, 100: 73-84.

Faleschini, S., Zanella, P., Doreiti, L., Faraglia, G. Complexes of phenyldihalobismuthines with ,o-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *J. Organomet.Chem.* **1972**, 44: 317-323.

Farrell, N. P, Williamson, J., McLaren, J. M. Trypanocidal and antitumor activity of platinum metal and platinummetal- drug dual function complexes. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33: 961-971.

Franzman, M. A., Barrios, A. M. Spectroscopic Evidence for the Formation of Goldfingers. *Inorg. Chem.* **2008**, 47: 3928-3930.

Fréchette, M., Butler, I. R., Hynes, R., Detellier, C. Structures in Solution and in the Solid State of the Complexes of Lanthanum(III) with 1,10-Phenanthroline. X-ray Crystallographic and ¹H, ¹³C, ¹⁷O, and ¹³⁹La Solution NMR Studies. *Inorg. Chem.* **1992**, 31: 1650-1656.

Frézard, F., Demicheli, C., Ferreira, C. S., Costa, M. A. Glutathione Induced Conversion of Pentavalent Antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimonate. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **2001**, 45(3): 913-916.

Gasser, J. R. R. A., Magill, A. J., Oster, N., Franke, E. D., Grögl, M., Berman, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **1994**, 18: 83-90.

Ge, R., Watt, R. M., Sun, X., Tanner, J. A., He, Q. Y., Huang, J. D., Sun, H. Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in Helicobacter pylori. *Biochem J.* **2006**, 393:285-293.

Gebel, T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem. Biol. Interact.* **1997**, 107: 131-144.

Genaro, O. *et al.* Leishmaniose Tegumentar Americana. em: Neves, D., *et al.* Parasitologia Humana, 10ed Ed.Atheneu, São Paulo, 36-53.

Gerasimova, T. P, Katsyuba, S. A. Bipyridine and phenanthroline IR-spectral bands as indicators of metal spin state in hexacoordinated complexes of Fe(II), Ni(II) and Co(II). *Dalton Trans.* **2013**, 42: 1787-1797.

Girolami, G. S. Origin of the Terms *Pnictogen* and *Pnictide*. *J. Chem.Educ.* **2009**, *86*(10): 1200- 1201.

Gontijo, C. M. F., Melo, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* **2004**, *7* (3): 338–349.

Goowin, L., C., Page, J. E. A Study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* **1943**, *22*: 236-240.

Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Légaré, D., et al. Drug uptake and modulation of drug resistance by *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*: 31010-31017.

Greenfield, N. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *J. Anal. Biochem.*, **1996**, *235*, 1-10.

Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., Bryceson, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet. Infect. Dis.* **2002**, *2*: 494-501.

Habtemariam, S. In vitro antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. chimperi* and *P. oligotricha*. *BMC Pharmacol.* **2003**, *3*: 1–6.

Hadighi, R., Mohebali, M., Boucher, P., Hajjarian, H., Khamesipour, A., Oullette, M. Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug- Resistant *Leishmania tropica* Parasites. *PLoS Medicine*, **2006**, *3*(5): 659-667.

Hadjikakou, S. K.; Ozturk, I. I.; Xanthopoulou, M. N.; Zachariadis, P. C.; Zartilas, S.; Karkabounas, S.; Hadjiliadis, N. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*: 1007-1015.

Hancock, R.D., Cukrowski, I., Baloyi, J., Mashishi, J. The affinity of bismuth(III) for nitrogen-donor ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, *19*: 2895- 2899.

Harlos, M., Ott, I., Gust, R., Alborzina, H., Wöfl, S., Kromm, A., Sheldrick, W. S. Synthesis, Biological Activity, and Structure-Activity Relationships for Potent Cytotoxic Rhodium(III) Polypyridyl Complexes. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*: 3924–3933.

Hartwig, A. Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function. *Antioxid. Redox Signaling.* **2001**, *3*(4): 625-634.

Herwaldt, B. Leishmaniasis. *Lancet*, London. **1999**, *354*: 1191-1199.

Howe-Grant, M., Lippard, S. J. Binding of Platinum(II) Intercalation Reagents to Deoxyribonucleic Acid. Dependence on Base-Pair Composition, Nature of the Intercalator, and Ionic Strength. *Am. Chem. Soc.* **1979**, *18*(26): 5762-5769.

Hurtado, R. R., Harney, A. S., Heffern, M. C., Holbrook, R. J., Holmgren, R. A., Meade, T A. Specific Inhibition of the Transcription Factor Ci by a Cobalt(III) Schiff Base–DNA Conjugate. *Mol. Pharmaceutics.* **2012**, *9*: 325–333.

Ivens, A. C., Peacock, C. S. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science.* **2005**, *309*(5733): 436–442.

Jamieson, E. R., Lippard, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*: 2467– 2498.

Jennette, K. W. Lippard, S. J., Vassiliades, G. A., Bauer, W. R. Metallointercalation Reagents. 2-Hydroxyethanethiolato(2,2',2"-terpyridine)-platinum(II) Monocation Binds Strongly to DNA By Intercalation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*(10): 3839-3843.

Jin, V. X., Ranford, J. D. Complexes of platinum(II) or palladium(II) with 1,10-phenanthroline and amino acids. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, *304*: 38–44.

Juris, A., Balzani, V., Barigelletti, F., Campagna, S., Belser, P. Von Zelewsky, A. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*: 85-277.

Kaes, C., Katz, A., Hosseini, M.W. Bipyridine: the most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2,2'-bipyridine units. *Chem. Rev.* **2000**, *100*(10): 3553-3590.

Kellett, A., Howe, O., O'Connor, M., McCann, M., Creaven, B. S., McClean, S., Kia, A. F. A., AlanCasey Devereux, M. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. *Free Radical Biol. Med.* **2012**, *53*: 564-576.

Keppler, B. K., Silvestru, C., Haiduc, I. antitumour organometallics. III. In vivo activity of diphenylantimony(III) and diorganotin(IV) dithiophosphorus derivatives against p388 leukemia. *Metal Based Drugs.* **1993**, *1*(1): 73- 77.

Kharad, G. J. Thermal decomposition and mass spectra of mixed ligand copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline and coumarin derivatives. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *107*:651-659.

Kinnamon, K. E., Steck, E. A., Rane, D. S.. Activity of antitumor drugs against African trypanosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*: 157-160.

Klapötke, T. Biological activity of organometallic bismuth compounds. *Biol. Metals.* **1988**, *1*: 69-76.

Kline, C. H., Turkevich, J. The Vibrational Spectrum of Pyridine and the Thermodynamic Properties of Pyridine Vapors. *J. Chem. Phys.* **1944**, *12*(7): 300-309.

Klug, A.; Rhodes D. A Novel Protein Motif for Nucleic Acid Recognition Trends Biochem. Sci. **1987**, *12*, 464-469.

Kozak, R. W., Atcher, R. W., Gansow, O. A., Friedman, A. M., Hines, J. J., Waldman, T. Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: α -particle emitting radionuclides for radioimmunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, *83*: 474.

Kramer, S., Kimblin, N. C., Carrington, M. Genome -wide *in silico* screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics.* **2010**, *11*:283-296.

Krishna, S. S., Majumdar, I., Grishin, N. V. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary. *Nucleic Acids Research*. **2003**, 31: 532–550.

Lainson, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hy.* **1983**, 77: 569-596.

Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional Diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11:39–46.

Lambert, J. R. Pharmacology of bismuth containing compounds. *Rev. Infect. Dis.* **1991**; 13(8): 691–695.

Larabee, J. L., Hocker, J. R., Hanas, J. S. Mechanisms of Aurothiomalate-Cys₂His₂ Zinc Finger Interactions. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18: 1943-1954.

Lecureur V, Le Thiec A, Le Meur A, Amiot L, Drenou B, Bernard M, et al. Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. *J. Haematol.* **2002**;119:608–15.

Lee, S. P., Han, M. K. Zinc Stimulates Mg²⁺-Dependent 3'-Processing Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase *in Vitro*. *Biochemistry*. **1996**, 35, 3837-3844.

Lei, J., Shi, J., Zhi-hong, S., Fei-fei, L., Yuan, W., Wei-na, W., Qin, W. Synthesis, crystal structure, DNA-binding properties, cytotoxic and antioxidation activities of several ternary copper(II) complexes with a new reduced Schiff base ligand. *Inorg. Chim. Acta.* **2012**, 391: 121–129.

Leishmaniasis. in: undp/World bank/who special programme for research & training in tropical diseases (TDR). Tropical Disease Research Programme Report, 11; progress 1991-92. Geneva: World Health Organization. **1993**,77.

Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3(1): 18-30.

Li, H., Sadler, P. J., Sun, H. Unexpectedly strong binding of a large metal ion (Bi³⁺) to human serum transferrin. *J Biol Chem.* **1996**, 271:9483-9489.

Liang, B., Zhu, M. X., Zhu W. G. Synthesis and photoluminescence of new europium complex $\text{Eu}(\text{DBM})_3(\text{DPPZ})$ with dipyridophenazine ligand. *Chin. Chem. Lett.* **2003**, 14 (1): 43-46.

Lippard, S. J., Bond, P. J., Wu, K. C., Bauer, W. R. Stereochemical requirements for intercalation of platinum complexes into double-stranded DNA's. *Science.* **1976**, 194 (12), 726- 728.

Lipscomb, W. N., N. Sträter, "Recent advances in zinc enzymology". *Chem. Rev.* **1996**, 96: 2375-2433.

Liu, H. K., Sadler, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. *Account. Chem. Res.* **2011**, 44(5): 349-359.

Liu, W., Chen, X., Ye, Q., Xu, Y., Xie, C., Xie, M., Chang, Q., Lou, L. A novel water-soluble heptaplatin analogue with improved antitumor activity and reduced toxicity. *Inorg. Chem.* **2011**, 50: 5324-5326.

Lopes, M. S., Pietrab, S. C. C., Borgatia, T. F., Romeiroc, C. F. D., Júniord, P. A. S., Romanhad, A. J., Alvesa, R. J., Souza-Fagundes, E. M., Fernandes, A. P., de Oliveiraa, R. B. Synthesis and evaluation of the anti parasitic activity of aromatic nitro compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46: 5443-5447.

Lu, D., Searles, M. A., Klug, A. Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature.* **2003**, 426: 96-100.

Ma, G.Y., Khan, S. I., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Li, Z. Q., Pasco, D. S., Walker, L. A. Khan, L. A. Antimicrobial and antileishmanial activities of hypocrellins A and B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48: 4450-4452.

Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Wysocki, R. Arsenic and Antimony Transporters in Eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13: 3527-3548.

MacLeod, R. A. The toxicity of o-phenanthroline for lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* **1952**, 197: 751-761.

Makowski, G. S., Sunderman Jr. F. W. The Interactions of Zinc, Nickel, and Cadmium with Xenopus Transcription Factor IIIA, Assessed by Equilibrium Dialysis *Journal of Inorganic. Biochem.* **1992**, *48*:107-119.

Mandal, G., Wyllie, S., Singh, N., Sundar, S., Fairlamb, A. H., Chatterjee, M. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology.* **2007**, *134*: 1679-1687.

Mansouri-Torshizi, H., Saeidifar, M., Khosravi, F., Divsalar, A., Akbar S. A., Yekke, G. Z. DNA-Binding and Thermodynamic Parameters, Structure and Cytotoxicity of Newly Designed Platinum(II) and Palladium(II) Anti-Tumor Complexes. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*(3): 947-955.

Marcaccini, S., Pepino, R., Pozo, M.C., Basurto, S., Gariaevalverde, M., Torroba, T. One-pot synthesis of quinolin-2-(1H)-ones via tandem Ugi-Knoevenagel condensations. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*: 3999-4001.

Marquis, N., Gourbal, B., Rosen, B. P., Muckopadhyay, R., et al. Modulation in aquaglyceroporin *AQP1* gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*: 1690-1699.

Marsden, P. D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1985**, *18*: 187-198.

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.

Matthews, J. M., Sunde, M. Zinc fingers–folds for many occasions. *IUBMB Life.* **2002**, *54*: 351–355.

McCann, M., Geraghty, M., Devereux, M., O'Shea, D., Mason, J., O'Sullivan, L. Insights into the mode of action of the anti-candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. *Metal Based Drugs.* **2000**, *7*(4): 185- 193.

Mengjun, C., Jianding, C., Mohamed, T. Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antifungal Activity of Yttrium(III) Complexes Including 1,10-Phenanthroline. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 1531-1538.

Mesa-Valle, C. M., Craciunescu, D., Parrondo-Iglesias, E., Osuna, A. In vitro Action of Platinum (II) and Platinum (IV) Complexes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Arzneim Forsch.* **1989**, *39*: 838-842.

Mesa-valle, C. M., Moraleda, V., Lazuen, J., Craciunescu, D., Parrondo-Iglesias, E., Osuna, A. Action of new organometallic complex against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *40*: 47-57.

Messerschmidt, A., Bode, W., Gyglar, M. Handbook of metalloproteins, *John Wiley & Sons.* **2004**, *3*:pg. 3.

Meyerhoff, A. U.S. Food and Drug Administration approval of Am-Bisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*: 42-51.

Miller J, McLachlan, A. D., Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **1985**, *4*:1609-1614.

Monks, T. J., Hanzlik, P., Cohen, G. M., Ross, D., Graham, D. G. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1992**, *112*: 2-16.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*: 55-63.

Murray HW; Berman JD; Davies CR; Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. In.: www.thelancet.com. v. 366, October 29, **2005**. p. 1561-1577.

Narla, R. K., Chun-Lin C., Yanhong, D., and Uckun F. M., *In Vivo* Antitumor Activity of Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) Sulfatoxovanadium(IV) {METVAN [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂]}. *Clin Cancer Res.* **2001**, *7*: 2124-2133.

Navarro, M, Hernández, C., Colmenares, I., Hernández, P., Fernández, M., Sierraalta, A., Marchán, E. Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃. DNA

interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*: 111–116.

Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E. F., Sierralta, A., Fernández-Mestre, M., Silva, P., Arrieché, D., Marchán, E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*: 401–408.

Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E. F., Fernandez-Mestre, M., Arriechec, D., Marchan, 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.

Nazif, M. A., Bangert, J. A., Ott, I., Gust. R., Stoll, r., Sheldrick, W. S. Dinuclear organoiridium(III) mono- and bis-intercalators with rigid bridging ligands: Synthesis, cytotoxicity and DNA binding. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*: 1405–1414.

Nogueira, L. S. C., Sampaio, R. N. R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* **2001**, *76*: 51-62.

Nunn, M., Sowerby, D. B., Wesolek, D. M. The preparation of phenyl substituted antimony(III) and antimony(V) chlorides and bromides. *J. Organomet.Chem.* **1983**, *251*: C45-C46.

Ouellette, M., Fase-Fowler, F., Borst, P. The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* **1990**, *9*: 1027–1033.

Ozturk, I. I.; Hadjikakou, S. K.; Hadjiliadis, N.; Kourkoumelis, N.; Kubicki, M.; Baril, M.; Butler, I. S.; Balzarini, J. Synthesis, Structural Characterization, and Biological Studies of New Antimony(III) Complexes with Thiones. The Influence of the Solvent on the Geometry of the Complexes. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*: 8652-8661.

Pazderski, L., Szłyk, E., Sitkowski, J., Kamiński, B, Kozerski, L., Tousek, J., Marek, R. Experimental and quantum-chemical studies of ^{15}N NMR coordination shifts in palladium and platinum chloride complexes with pyridine, 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. *Magn. Reson. Chem.* **2006**; *44*: 163–170.

Phillips, H. A., Eelman, M. D., Burford, N. Cooperative influence of thiolate ligands on the bio-relevant coordination chemistry of bismuth. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*: 736–739.

Phillips, T., Haq, I., Meijer, A. J. H. M., Adams, H., Soutar, I., Swanson, L., Sykes, M. J., Thomas, J. A. DNA Binding of an Organic dppz-Based Intercalator. *Biochemistry.* **2004**, *43*: 13657-13665.

Popov, A. M., Davidovich, R. L., Li, I. A., Skul'beda, A. V., Hu. S.-Z. Cytotoxic and antitumor activity of antimony(III) nitrilotriacetate complexes $M_2Sb(Nta)(HNta)nH_2O$ ($M = NH_4, Na; n = 1, 2$). *Pharm. Chem. Jl.* **2005**, *39*(3): 119-121.

Porquet, A.; Filella, M. Structural evidence of the similarity of $Sb(OH)_3$ and $As(OH)_3$ with glycerol: implications for their uptake. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1269–1276.

Prashanthi, Y., Kiranmai, K., Ira, Kumar, S. K., Kumar C. V., Shivaraj. Spectroscopic Characterization and Biological Activity of Mixed Ligand Complexes of Ni(II) with 1,10-Phenanthroline and Heterocyclic Schiff Bases. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2012**, *2012*: 1-12.

Quintal, S., Viegas, A., Erhardt, S., Cabrita, E. J., Farrell, N. P. Platinated DNA Affects Zinc Finger Conformation. Interaction of a Platinated Single-Stranded Oligonucleotide and the C-Terminal Zinc Finger of Nucleocapsid Protein HIVNCp7. *Biochemistry.* **2012**, *51*: 1752–1761.

Ràfols, C., Bosch, E., Ruiz, R., Box, K. R., Reis, M., Ventura, C., Santos, S., Araújo, M. E., Martins, F. Acidity and Hydrophobicity of Several New Potential Antitubercular Drugs: Isoniazid and Benzimidazole Derivatives. *J. Chem. Eng. Data.* **2012**, *57*: 330–338.

Rajendiran, V., Palaniandavar, M., Periasamy, V. S., Akbarsha, M. A. New $[Ru(5,6-dmp/3,4,7,8-tmp)_2(diimine)]^{2+}$ complexes: Non-covalent DNA and protein binding, anticancer activity and fluorescent probes for nuclear and protein components. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *116*: 151–162.

Ramírez-Macías, I., Marín, C., Es-Samti, H., Fernández, A., Guardia, J. J., Zentar, H., Agil, A., Chahboun, R., Alvarez-Manzaneda, E., Sánchez-Moreno, M.

Taiwaniaquinoid and abietane quinone derivatives with trypanocidal activity against *T. cruzi* and *Leishmania* spp. *Parasitol. Int.* **2012**, *61*: 405–413.

Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., de Jesús, M. N., Marzal, P. C., Junior, H. F. A., Tempone, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova.* **2003**, *26*(4): 550-555.

Reimão, J. K., Scotti, M. T., Tempone, A. G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*: 8044–8053.

Reis, D. C.; Pinto, M. C. X.; Souza-Fagundes, E. M.; Wardell, S. M.; Wardell, S. V.; Beraldo, J. M. H. Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human leukemia cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*: 3904-3910.

Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. E., Mansour, H. V. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, **1969**, *222*: 385.

Rosenthal, E., Marty, P., Poizot-Martin, I., Reynes, J., Pratlong, F., Lafeuillade, A., Jaubert, D., Boulat, O., Dereure, J. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in Southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *89*:159–162.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.* **1903**, *2*: 1261-1401.

Roy, S., Hagen, K. D., Maheswari, P. U., Lutz, M., Spek, A. L., Reedijk, J. van Wezel, G. P. Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*(9): 1427–1434.

Russell, D. G., Wilhelm, H. The involvement of the major glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 2613–2620.

Rutherford, T.J., Van Gijte, O., Kirsch-De Mesmaeker, A., and Keene, R. Stereoisomers of Mono-, Di-, and Triruthenium(II) Complexes Containing the Bridging Ligand 1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylene and Studies of Their Photophysical Properties. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*(20):4465–4474.

Sammes, P. G. and Yahioğlu, G. 1,10-Phenanthroline: a versatile ligand. *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 23 (5): 327–334.

Santos, N. C., Prietob, M., Castanho, M. A. R. B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1612: 123– 135.

Sasmal, P. K., Patra, A. K., Nethaji, M., Chakravarty, A. R. DNA cleavage by new oxovanadium(IV) complexes of N-salicylidene α -amino acids and phenanthroline bases in the photodynamic therapy window. *Inorg. Chem.* **2007**, 46: 11112–11121.

Schäfer, S., Sheldrick, W. S. Coligand tuning of the DNA binding properties of half-sandwich organometallic intercalators: Influence of polypyridyl (pp) and monodentate ligands (L = Cl, (NH₂)₂CS, (NMe₂)₂CS) on the intercalation of (g5-pentamethylcyclopentadienyl)-iridium(III)-dipyridoquinoxaline and dipyridophenazine complexes]. *Organomet. Chem.* **2007**, 692: 1300–1309.

Scharwitz, M. A., Ott, I., Gust, R. Kromma, A., Sheldrick, W. S. Synthesis, cellular uptake and structure-activity relationships for potent cytotoxic trichloridoiridium(III) polypyridyl complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102: 1623–1630.

Schilt, A. A., Taylor, R. C. Infra-red spectra of 1 : 10-phenanthroline metal complexes in the rock salt region below 2000 cm⁻¹. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1959**, 9: 211- 221.

Schneider, P., Glaser, T. A. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpeessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, 58: 277-282.

Sereno, D., M. Cavaleyra, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre. Axenically-grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42:3097–3102.

Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M. & Zilberstein, D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276: 3971–3976.

Sheldrick, G.M.S. *SHELXL-97—A Program for Crystal Structure Refinement*; University of Goettingen: Goettingen, Germany, 1997.

Sinha, S. P. 2,2'-Dipyridyl complexes of rare earths I: Preparation, infra-red and some other spectroscopic data. *Spectrochim. Acta.* **1964**, 20: 879-886.

Soto, J, Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J., Berman, J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine clinical infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, 44: 350-356.

Spellane, P. J., Watts, R. J. Carbon-13 NMR Spectrum of [Ir(bipy)₂H₂O(bipy)]Cl₃: Further Indication of a Monodentate Bipyridine Structure. *Inorg. Chem.* **1981**, 20: 3561-3563.

Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 797-821.

Suerbaum, S.; Michetti, P. Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347, 1175-1186.

Sun H, Li H, Harvey I, Sadler PJ: Interactions of bismuth complexes with metallothionein(II). *J. Biol. Chem.* **1999**, 274:29094-29101.

Sun H, Li H, Mason AB, Woodworth RC, Sadler PJ: Competitive binding of bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276:8829-8835.

Sun, H., Zhang, L., Szeto, K. Y. Bismuth in medicine. *Met Ions Biol Syst.* **2004**, 41:333-378.

Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C. K., Murray, H.W. Failure of pentavalent antimony in visceral

leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, 1104–1107.

Thota, S., Karki, S. S., Jayaveera, K. N., Balzarini, J., Clercq, E. Synthesis, characterization, antitumor, and cytotoxic activity of mononuclear Ru(II) complexes. *J. Coord. Chem.* **2010**, *63* (24): 4332–4346.

Tsang, C. N., Ho, K. S., Sun, H., Chan, W. T: Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single Helicobacter pylori cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*:7355–7357.

VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory. <http://www.vcclab.org> (acesso: Outubro de 2012) Vianna, G. O. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia.* **1912**, *4*, 426.

Walkup, G. K., Burdette, S. C. Lippard, S. J. Tsien, R. Y. A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn²⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*: 5644–5645.

Wang, W. C., Lu, Y. N., Xiao, J., Yu, L., Song, H. B., Li, J. S., Cui, J. R., Wang, R. Q., Ran, F. X. Synthesis, crystal structures and in vitro antitumor activities of some organoantimony arylhydroxamates. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*: 151–156.

Wheate, N. J., Taleb, R. I., Krause-Heuer, A. M., Cook, R. L., Wang, S., Collins, J. G., Aldrich-Wright, J. Novel platinum(II)-based anticancer complexes and molecular hosts as their drug delivery vehicles. *Dalton Trans.* **2007**, 5055–5064.

WHO. Tropical disease research: progress 1999–2000. World Health Organization, **2001**, Geneva.

Wijeratne, A. B., Garcia, J., Yang, S. H., Kroll, P., Armstrong, D. W., Schug, K. A. New structural insight for antimony(III)-trartrate. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*: 1504–1508.

Williamson, A. L., Brindley, P.J., Knox, D.P., Hotez, P.J., Loukas, A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*: 417–423.

Wilson, J. J., Lippard, S. J. In Vitro Anticancer Activity of cis-Diammineplatinum(II) Complexes with β-Diketonate Leaving Group Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*: 5326–5336.

Wyllie, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donoVani*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39925–39932.

Wyllie, S., Fairlamb, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*: 257–267.

Yamasaki, K., Yasuda, M. Stability of zinc and cadmium complexes with 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*: 1324-1324.

Yáñez, M., Guerrero, J., Aguirre, P., Moya, S. A., Cárdenas-Jirón, G. Experimental and theoretical characterization of Ru(II) complexes with polypyridine and phosphine ligands. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694* (23), 3781-3792.

Yao, C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect. Immun.* **2010**, *78*: 22-31.

Yardley, V., Croft SL, de Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A, Chappuis F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*: 272-275.

Yin, H.D., Zhai, J. Synthesis, characterizations and crystal structures of antimony(III) complexes with nitrogen-containing ligands. *Inorg. Chim. Acta.* **2009**, *362*: 339–345.

Yin, R., Gou, S., Liu, X., Lou, L. Antitumor activities and interaction with DNA of oxaliplatin-type platinum complexes with linear or branched alkoxyacetates as leaving groups. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*: 1095–1101.

Zhang, K. Y., Li, S. P. Y., Zhu, N., Or, I. W. S.,; Cheung, M. S. H., Lam, Y. W., Lo, K. K. W. Structure, photophysical and electrochemical properties, biomolecular interactions, and intracellular uptake of luminescent cyclometalated iridium(III) dipyridoquinoxaline complexes. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*: 2530–2540.

Zhang, L., Szeto, K. Y., Wong, W. B., Loh, T. T., Sadler, P. J., Sun, H. Interactions of bismuth with human lactoferrin and recognition of the Bi(III)-lactoferrin complex by intestinal cells. *Biochemistry.* **2001**, *40*:13281-13287.

Zhang, Li., Mulrooney, S. B., Leung, A. F. K., Zeng, Y., 1, Ko, B. B. C., Hausinger, R. P., Sun, H. Inhibition of urease by bismuth(III): Implications for the mechanism of action of bismuth drugs. *BioMetals*. **2006**, 19:503–511.

Zuber, M., Pruchnik, F. P. Hydridobipyridine rhodium complexes as a result of the C–H bond activation in coordinated ligand, NMR studies. *Polyhedron*. **2006**, 25: 2773–2777.

Anexos

Article

Improved Antileishmanial Activity of Dppz through Complexation with Antimony(III) and Bismuth(III): Investigation of the Role of the Metal

Edgar H. Lizarazo-Jaimes¹, Rubens L. Monte-Neto², Priscila G. Reis², Nelson G. Fernandes¹, Nivaldo L. Speziali³, Maria N. Melo⁴, Frédéric Frézard² and Cynthia Demicheli^{1,*}

¹ Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Department of Physics, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: demichel@netuno.lcc.ufmg.br; Tel.: +55-31-3409-5755; Fax: +55-31-3409-5700.

Received: 24 August 2012; in revised form: 21 October 2012 / Accepted: 22 October 2012 /

Published: 25 October 2012

Abstract: Two novel trivalent antimony(III) and bismuth(III) complexes with the nitrogen-donor heterocyclic ligand dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (dppz) were synthesized and characterized as $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ and $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$. The crystal structure of Sb(III) complex was determined by X-ray crystallography. These complexes were evaluated for their activity against the promastigote form of Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* and *Leishmania amazonensis* strains. Both complexes were more effective than dppz alone in inhibiting the growth of *Leishmania* promastigotes and were at least 77 and 2,400 times more active than potassium antimonyl tartrate in Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania*, respectively. The cytotoxicity of dppz and its complexes against mouse peritoneal macrophages occurred at dppz concentrations at least 6-fold greater than those found to be active against *Leishmania* promastigotes. To investigate the role of the metal in the improved antileishmanial activity of dppz, the activity of the Sb(III) complex was compared between the Sb-resistant mutants and their respective parental sensitive strains. The lack of cross-resistance to the Sb(III)-dppz

complex together with the much lower activity of antimony tartrate, SbCl_3 and BiCl_3 strongly support the model that the metal is not active by itself but improves the activity of dppz through complexation.

Keywords: crystal structure; dipyrdo [3,2-a:2',3'-c] phenazine; antimony; bismuth; *Leishmania*; drug resistance

1. Introduction

Pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate and meglumine antimonate, have been used in the treatment of all forms of leishmaniasis for more than half a century [1,2]. Although the mechanism of action of pentavalent antimonial is not fully understood, it is generally accepted that the active form of the metal is the reduced form Sb(III) [3,4].

A major problem in antimonial chemotherapy is the emergence of clinical resistance against pentavalent antimony drugs that has reached epidemic proportions in parts of India [5]. The ATP binding cassette (ABC) protein MRPA plays a major role in metal resistance in *Leishmania* parasites [6] and its localization in intracellular vesicle membranes suggests that it sequesters Sb(III)-thiol complexes into these vesicles [7].

Other mechanisms such as a diminished biological reduction of Sb(V) to Sb(III) [8], the loss of an aquaglyceroporin (AQP1) allele or its down regulation [9] and hypoxic conditions [10] have been reported to cause an increase in resistance to pentavalent antimonials. In this context, there is a great need for new safe and effective drugs that do not exhibit cross-resistance with conventional antimonial drugs.

Antimony(III) complexes have attracted special interest as potential antineoplastic agents since 1990, when Silvestru *et al.* [11] reported for the first time the anti-tumor activity of Sb(III) complexes. It was suggested that the mode of action of trivalent antimonial compounds involves some pathways similar to apoptosis, as DNA fragmentation [12,13], which is preceded by an increase in reactive oxygen species caused by alterations of the redox potential [14]. As an antileishmanial agent, Sb(III) inhibits and forms a complex with the enzyme trypanothione reductase which acts by recycling trypanothione disulphides in trypanothione, the major antioxidant thiol in *Leishmania*, important to maintain their intracellular redox balance [15,16].

On the other hand, bismuth compounds have been used to treat infections caused by *Helicobacter Pylori* bacteria and duodenal ulcers [17], as well as radio-therapeutic agents for cancer treatment [18]. Despite the close periodic table relationship of antimony and bismuth, there are only few reports in the literature of bismuth-based drugs being developed and evaluated as antileishmanial agents [19]. On the other hand, new bismuth complexes with DNA affinity and activity against cancer cell were reported [20,21].

Metal complexes with polypyridyl ligands, have been extensively studied by a number of research groups over the last year due to potential application in photodynamic therapy [22,23] and probes for biological molecules [24,25].

Recently, complexes of dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (dppz) with gold (Au), copper (Cu) and vanadium (V) have shown remarkable antileishmanial or antitrypanosomal activities [26,27], however, the possible synergism between the metal and the ligand was not fully investigated. On the other hand, there are few reports in the literature referring to the structural characterization of Sb(III) and Bi(III) complexes with polypyridyl ligands [28,29], but no report on their pharmacological activities.

In this work, the synthesis, the structural and physicochemical characterization of the polypyridyl ligand dppz coordinated to Sb(III) and Bi(III) are reported. The activities of dppz and its resulting complexes against both Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and their cytotoxicities towards peritoneal macrophages are described. The present paper reports for the first time a new experimental approach, based on tests against metal-resistant mutants and their respective parental sensitive strains, to get insight into the role of the metal in the cytotoxicity of a metal complex.

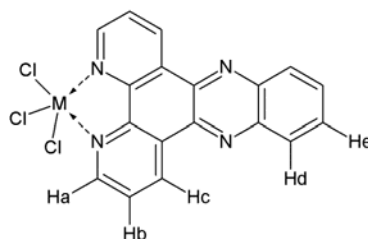
2. Results and Discussion

Antimony and bismuth complexes [Sb(dppz)Cl₃] (**1**) and [Bi(dppz)Cl₃] (**2**) were obtained in good yields by refluxing equimolar amounts of SbCl₃ or BiCl₃ with dppz in methanolic solutions. The complexes **1** and **2** prepared during the course of this investigation are an air-stable crystal and powder, respectively, which were characterized by spectroscopic methods including FT-IR, NMR, elemental analysis and also (in the case of complex **1**) by X-ray crystallography. In the case of complex **2**, the crystals obtained did not show sufficient quality for X-ray analysis. In FT-IR spectra of complexes **1** and **2**, bands were observed for C=N and C=C bonds stretching in aromatics in the 1640–1400 cm⁻¹ range. The dppz bands at around 1632 and 1616 cm⁻¹ are shifted considerably towards lower frequency—1616 and 1602 cm⁻¹ for [Sb(dppz)Cl₃] and 1616 and 1598 cm⁻¹ for [Bi(dppz)Cl₃]—confirming the coordination of N atoms to Sb and Bi. Similar results for the spectroscopic data of dppz complexes with Au and Cu have been reported previously [26]. The corresponding ¹H-NMR spectra showed only one set of signals, shifted downfield in both complexes with respect to the free ligand (Table 1). ¹H-NMR spectra of [Sb(dppz)Cl₃] and [Bi(dppz)Cl₃] complexes in DMSO-*d*₆ exhibited the presence of the polypyridine ligand aromatic protons between δ 9.68 and 8.05 ppm.

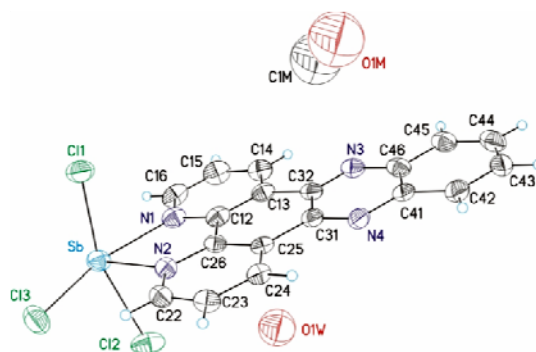
Table 1. Selected ¹H-NMR and IR data for free ligand and complexes **1** and **2**.

Compound	¹ H-NMR data (ppm)					References
	Hc	Ha	Hd	He	Hb	
Dppz	9.55	9.23	8.41	8.07	7.95	Navarro <i>et al.</i> (2006) [26]
<i>Sb(dppz)Cl</i> ₃	9.68	9.31	8.39	8.18	8.11	This work
<i>Bi(dppz)Cl</i> ₃	9.54	9.39	8.32	8.07	8.05	

The Hc proton of dppz and both complexes showed resonances at very low field because they are also highly deshielded due to the anisotropic effect provided by the nitrogen atom of the pyrazine ring (Figure 1). Ha protons in proximity of the coordinating nitrogen atoms of dppz ligand experienced a downfield shift by about δ 0.08–0.16 in complexes **1** and **2**, respectively, indicating the involvement of the dppz nitrogens in coordination. The unequivocal proton NMR assignments were made by concerted analysis of 1D ¹H-, 1D ¹³C-, 2D ¹H ¹H COSY and 2D ¹H ¹³C-HMQC.

Figure 1. Molecular structure of $[M(dppz)Cl_3]$, with $M = Sb$ or Bi .

For both complexes, satisfactory elemental analyses of C, H and N were obtained. In complex **1** crystallization methanol and water molecules are present, as confirmed by its thermogravimetric curves which showed a weight loss of 8.26% (calc. 8.92%), nevertheless complex **2** did not have crystallization molecules. The asymmetric unit of complex **1** is shown in Figure 2. Crystal data and structure refinement parameter are given in Table 2 and the selected bonds length and angles are given in Table 3.

Figure 2. Molecular structure of $[Sb(dppz)Cl_3]$.**Table 2.** Crystal data and structure refinement parameter for complex **1**.

	Sb(dppz)Cl₃
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₀ Cl ₃ N ₄ O _{1.25} Sb
Formula weight	542.41
Temperature (K)	293(2)
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2(1)/c
a (Å)	10.3244(2)
b (Å)	13.2760(3)
c (Å)	14.5753(3)
α (°)	90
β (°)	92.0930(19)
γ (°)	90
V (Å ³)	1994.44(7)
Z	4
$F(000)$	1056
D_{calc} (mg/m ³)	1.805
Crystal dimensions mm ³	0.2 × 0.2 × 0.3
θ Range (°)	4.29–62.65

Table 2. Cont.

Sb(dppz)Cl₃	
Reflections collected	9035
Independent reflection	3138
R_{int}	0.0355
Maximum/minimum transmission	1.000 / 0.30303
Data/restraints/parameters	3138 / 0 / 247
Goodness-of-fit on F^2	1.060
Final R indices	$RI = 0.0352$, $wR2 = 0.0826$
[$I > 2\sigma(I)$]	2478
R indices (all data)	$RI = 0.0522$, $wR2 = 0.0886$
Largest difference in peak/hole ($e \cdot \text{\AA}^{-3}$)	0.761 and -0.560

Table 3. Selected bond length (\AA) and angles ($^\circ$) for complex 1.

Sb-N(2)	2.245(4)	N(2)-Sb-N(1)	71.44(14)
Sb-N(1)	2.345(4)	N(1)-Sb-Cl(3)	159.07(10)
Sb-Cl(3)	2.4992(15)	N(2)-Sb-Cl(3)	87.73(11)
Sb-Cl(1)	2.5126(13)	N(2)-Sb-Cl(1)	82.14(10)
Sb-Cl(2)	2.6348(14)	N(1)-Sb-Cl(1)	84.23(10)
N(1)-C(16)	1.334(6)	Cl(3)-Sb-Cl(1)	95.22(5)
N(1)-C(12)	1.351(6)	N(2)-Sb-Cl(2)	80.25(10)
N(2)-C(22)	1.336(6)	N(1)-Sb-Cl(2)	82.97(10)
N(2)-C(26)	1.368(6)	Cl(3)-Sb-Cl(2)	91.68(5)
		Cl(1)-Sb-Cl(2)	160.80(5)

The geometry around the metal center is distorted square pyramidal (SP), with N(2) as the apex and Cl(1), Cl(2), Cl(3), N(1) occupying the equatorial plane. The four equatorial bonds are long (means 2,498 \AA), while the apical donor atom form the strongest bond (Sb(1)-N(2) 2.245(4) \AA). The sum of equatorial angles is 354° (Cl(3)-Sb-Cl(1) $95.22(5)^\circ$, Cl(3)-Sb-Cl(2) $91.68(5)^\circ$, N(1)-Sb(1)-Cl(1) $84.23(10)^\circ$, N(1)-Sb(1)-Cl(2) $82.97(10)^\circ$), which suggest some distortion from an ideal square pyramidal [30]. As shown in Figure 2, the asymmetrical unit in the crystal contains one molecule of methanol and one of water besides the [Sb(dppz)Cl₃] molecule.

Both complexes **1** and **2** were found to be highly active against *Leishmania* promastigote forms (Figure 3). The IC₅₀ for complexes **1** and **2** in the wild-type (WT) strains were similar, corresponding to ~ 0.6 and ~ 1 μM for *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis*, respectively (Table 4).

Strikingly, the IC₅₀ values for dppz complexes were similar when comparing the Sb-resistant mutants with their respective parental sensitive WT strains (Table 4). This is in contrast with the trivalent potassium antimonyl tartrate that was much less active against Sb-resistant mutants (Table 4).

Figure 3. Dppz-derived Sb(III) and Bi(III) complexes sensitivity profiles of antimony-sensitive and -resistant *L. chagasi* and *L. amazonensis* promastigotes. (A) *L. chagasi* BH400 wild-type; (B) *L. amazonensis* BA199 wild-type; (C) *L. chagasi* BH400Sb2700.2 (Sb-resistant); (D) *L. amazonensis* BA199Sb2700.2 (Sb-resistant). (●) dppz; (□) dppz/Bi; (△) dppz/Sb. The *Leishmania* promastigotes were cultivated in 24-well cell culture plates containing 2 mL of α -MEM medium for 72 h at 25 °C. The resistant lines were previously selected *in vitro* by step wise drug selection. All data represent average of, at least, three independent experiments.

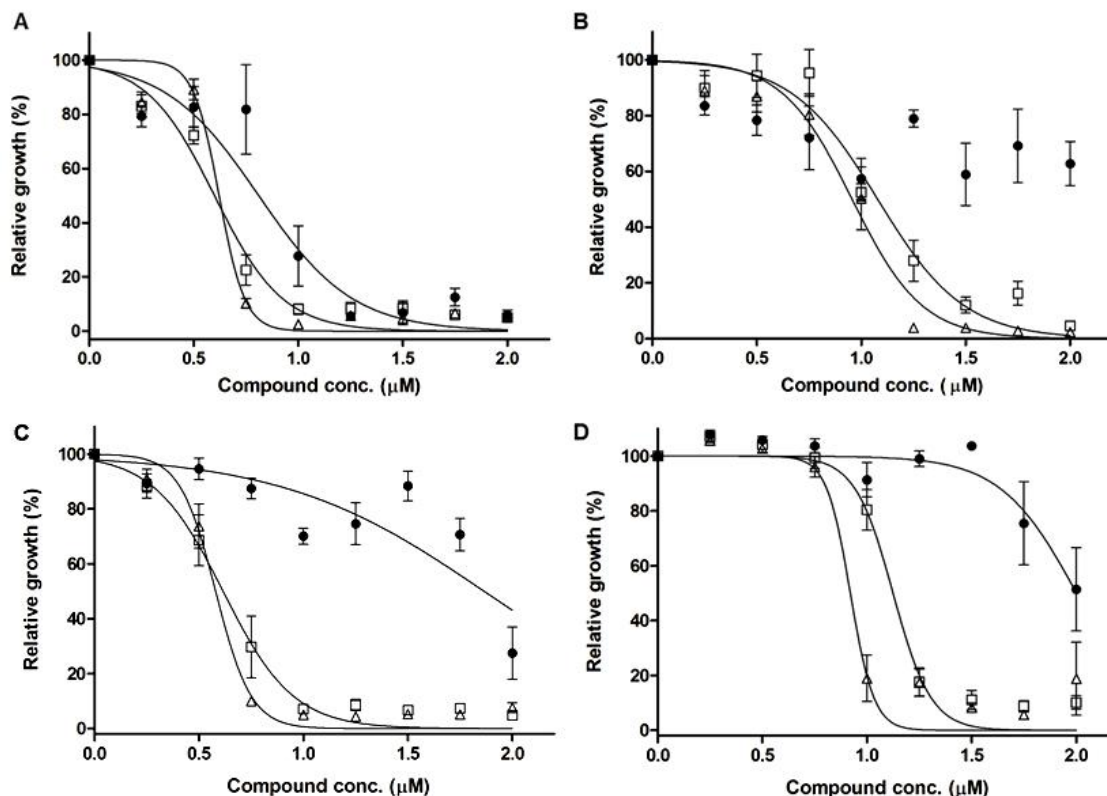


Table 4. Inhibitory concentrations of dppz and its Sb(III) and Bi(III) complexes towards antimony-sensitive and -resistant New World *Leishmania* species.

Strain	IC ₅₀ (μM) ± SEM (CI 95%)					
	Dppz	dppzBiCl ₃	dppzSbCl ₃	TA *	SbCl ₃	BiCl ₃
<i>L. infantum chagasi</i> (WT)	0.81 ± 0.04 (0.71–0.9)	0.59 ± 0.01 (0.56–0.63)	0.62 ± 0.01 (0.59–0.65)	100 ± 3	341 ± 2	563 ± 2
<i>L. infantum chagasi</i> (SbR)	1.86 ± 0.08 (1.69–2.03)	0.61 ± 0.02 (0.56–0.66)	0.57 ± 0.01 (0.55–0.60)	>2,700	462 ± 3	>500
<i>L. amazonensis</i> (WT)	>2	1.07 ± 0.03 (1.01–1.14)	0.95 ± 0.02 (0.89–1.01)	83 ± 1	362 ± 2	621 ± 2
<i>L. amazonensis</i> (SbR)	2.00 ± 0.05 (1.89–2.10)	1.12 ± 0.01 (1.08–1.16)	0.92 ± 0.02 (0.86–0.97)	>2,700	1503 ± 2	>500

* TA: potassium antimonyl tartrate as Sb(III) source; SEM: standard error of the mean; CI: confidence interval; SbR (Sb-resistant); The IC₅₀ values were calculated by non-linear regression.

When tested alone, dppz showed intrinsic activities against *Leishmania*, with IC_{50} varying from 0.8 to $\sim 2 \mu\text{M}$ for both Sb-sensitive or -resistant mutants of the two species studied (Table 4). Interestingly, complexes **1** and **2** exhibited significantly higher antileishmanial activity than dppz itself, indicating an additional role of the metal (Sb(III) and Bi(III)) in the antileishmanial activity of the complexes (Figure 3 and Table 4). Since complexes **1** and **2** were at least 80-fold more active against WT *Leishmania* strains than trivalent potassium antimonyl tartrate, BiCl_3 and SbCl_3 (Table 4), one can infer that the metal may not be active by itself and that the higher activity of the complexes compared to dppz may be related to the improved activity of dppz through metal complexation. The lower IC_{50} value of antimonyl tartrate compared to SbCl_3 in WT *L. amazonensis* also illustrates that complexation of a cytotoxic metal ion may enhance its activity, presumably through improved delivery to the target. In the case of antimonyl tartrate, much greater IC_{50} values were found in Sb-resistant mutants compared to the respective WT parental cells, demonstrating clearly that the metal ion contributes to the cytotoxicity of this Sb(III) complex. This is in contrast with the Sb(III)-dppz complex that was equally active against Sb-resistant and -sensitive *Leishmania* strains. Thus, the latter observation further supports the model that the metal is not directly responsible for the antileishmanial activity of Sb(III)-dppz complex. As shown in Table 5, the cytotoxicity of dppz and its complexes against mouse peritoneal macrophages occurred at dppz concentrations at least 6-fold greater than those found to be active against *Leishmania* promastigotes, indicating the selectivity of the complexes towards *Leishmania* parasites.

Table 5. Cytotoxicity of dppz and its Sb(III) and Bi(III) complexes against mouse peritoneal macrophages.

	Dppz	[Bi(dppz)Cl ₃]	[Sb(dppz)Cl ₃]
CC ₅₀ (μM) *	12.5	4.8	7.0
SI #	15.4	8.1	11.3

* CC₅₀: concentration of dppz which is cytotoxic against 50% of macrophages; # SI: selective index, calculated as the ratio between CC₅₀ in murine macrophages and IC_{50} in *L. infantum chagasi* (WT).

The *L. infantum chagasi* is the etiological agent for visceral leishmaniasis [31] while *L. amazonensis* is related to the cutaneous form of the disease in the New World [32]. Since these two species are causative agents of different clinical manifestations, they might also differ metabolically which reflect in their distinct drug sensitivity. This observation highlights the importance to use different *Leishmania* species for drug prospecting screening [33]. In addition to the high antileishmanial activity of **1** and **2**, both complexes can bypass the Sb-resistance of *Leishmania* in two different species of Sb-resistant *Leishmania* mutants (Table 4). The Sb-resistant selected lines of *L. infantum chagasi* BH400 Sb2700.2 and *L. amazonensis* BA199 Sb2700.2 were able to grow in the presence of Sb concentrations greater than 2700 μM , but failed to grow up in the presence of $\leq 1.12 \mu\text{M}$ of **1** and/or **2** (Table 4). Thus, this data taken altogether indicates that complexes **1** and **2** are very promising drug candidates for the treatment of Sb-resistant leishmaniasis.

An important physical characteristic that affects the bioavailability of a compound is its lipophilicity. Therefore a relatively optimal lipophilicity should be critical for a good drug candidate.

The lipophilicity of the complexes **1** and **2** was determined by measuring their octanol/water partition coefficients (log P). The log P values of the free dppz ligand was calculated using the online program ALOGSP 2.1. The log P values for dppz and complexes **1** and **2** are respectively 2.77 ± 0.76 ; 0.94 ± 0.24 and 0.98 ± 0.17 . More positive log P values correspond to more lipophilic compounds, whereas more negative log P values correspond to more hydrophilic ones. This data indicates that complexation with Sb(III) and Bi(III) makes dppz less lipophilic. Interestingly, the antileishmanial activity profile follows the hydrophilicity profile of the compound, *i.e.*, the more hydrophilic, the more active.

A possible explanation for the leishmanicidal activity of dppz complexes is their interaction with parasite DNA through intercalation, a mechanism recently suggested by Navarro and co-workers [34]. They described both Cu(II) and Au(III) complexes with dppz showing a potent leishmanicidal activity against both promastigotes of *Leishmania (Leishmania) mexicana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [34]. Although the best-known type of interaction of the polypyridyl complexes with DNA is the intercalation, highly reactive metal complexes containing reactive Cl could form the covalent bonds with DNA, as reported for $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pap})(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ and $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ [35,36]. In future studies, the interaction of Sb(III) and Bi(III) dppz complexes with DNA should be investigated, as a possible mechanism of cytotoxicity. In our work the differences in observed cytotoxicities of the complexes compared to dppz could be attributed to the changes in dppz lipophilicity following the coordination by SbCl_3 and BiCl_3 . The metal complexation to dppz probably leads to an increase of dppz bioavailability.

3. Experimental

3.1. General

Commercially available methanol was dried before use. All the preparations were done under anhydrous conditions. dppz was synthesized by a condensation of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and *ortho*-phenylenediamine according to the procedure described by Liang [37]. Sb(III) chloride (SbCl_3) and Bi(III) chloride (BiCl_3), from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used without further purification. Elemental analyses for C, H and N were carried out with a Perkin Elmer PE-2400 instrument. IR spectra in the $4,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ region were obtained for KBr pellets, with a Perkin Elmer RX-83303. The absorption spectra were recorded on a Varian Cary 100 *UV-Visible* Spectrophotometer.

NMR spectra were recorded at 400 MHz using Bruker DPX-400 spectrometer. ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts were measured relative to tetramethylsilane (TMS) and dimethyl sulfoxide- d_6 ($\text{DMSO-}d_6$) as the solvent. Intensity data for the X-ray were collected with Xcalibru Atlas Gemini ultra. Crystallographic data and experimental details of the structure determinations are listed in Table 1.

3.2. Synthesis of the Complexes $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ and $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$

3.2.1. Synthesis of $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ (**1**)

A solution of dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (0.05 g, 0.18 mmol) in dry methanol (26 mL) was added slowly to a freshly prepared antimony trichloride (0.041 g SbCl_3 , 0.18 mmol in 10 mL of dry methanol) solution at room temperature. The reaction mixture was stirred for 6 hours at 40 °C. The

resulting clear solution was kept in the darkness at room temperature to give yellow crystals. Yield: 82.9% (0.92 g). IR (KBr, cm^{-1}): 1614, 1578 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N})$; 1,138, 818, 724 $\delta(\text{Csp}^2\text{-H})$. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 400 MHz): δ 9.68 (dd, Hc); 9.31 (dd, Ha); 8.39 (q, Hd); 8.21–8.08 (m, He and Hb). Thermogravimetric and crystal data indicated the presence of one crystallization molecule of water and methanol. Elemental analysis for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2\text{Sb}$, calc. (found): C% 40.70 (41.21); H% 2.86 (2.73); N% 10.00 (10.25).

3.2.2. Synthesis of $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$ (**2**)

A solution of dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (0.07 g, 0.25 mmol) in dry methanol (26 mL) was added slowly to a freshly prepared antimony trichloride (0.079 g BiCl_3 , 0.25 mmol in 10 mL of dry methanol) solution at room temperature. The reaction mixture was stirred for 3 h at 40 °C and the resulting precipitate was filtered and dried. Yield: 82.9% (0.123 g). IR (KBr, cm^{-1}): 1,614, 1,574 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N})$; 1,140, 816, 730 $\delta(\text{Csp}^2\text{-H})$. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 400 MHz): δ 9.54 (dd, Hc); 9.39 (dd, Ha); 8.32 (q, Hd); 8.04–8.08 (m, He and Hb). Elemental analysis for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{Bi}$, calc. (found): C% 36.15 (36.21); H% 1.67 (1.63); N% 9.37 (9.19).

3.2.3. Stability of the Complexes

The stability of the complexes was checked by UV absorption spectroscopy. For this purpose, UV absorption spectra were registered at different time intervals (from 0 to 4 h) for dppz and complexes **1** and **2** at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in DMSO, DMSO-containing water and octanol. The spectra of the complexes were different from that of dppz and did not show significant changes as a function of time.

3.3. X-ray Crystallography

Single crystal X-ray diffraction data were obtained at room temperature on a Xcalibur Atlas Gemini Ultra diffractometer, using graphite monochromated $\text{MoK}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$). Final unit cell parameters and the integration of the collected reflections were performed using the CRYSTALISPRO software (Version 1.171.33.55 release 05-01-2010 CrysAlis171.NET). The structure solutions and full-matrix least-squares refinements based on F^2 were performed with the SHELXS-97 and SHELXL-97 program package [38]. All atoms except hydrogen were refined anisotropically. Although many hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map all of them were geometrically added to the structure and then refined by the riding model in the final stages. Details of data collection and structure refinement are given in Table 2. Selected distances and angles are given in Table 3. The crystallographic data were deposited at Cambridge Crystallographic Data Center on CCDC 874746.

3.4. Antileishmanial and Cytotoxic Activities

3.4.1. Parasite Culture

Leishmania (Leishmania) amazonensis (strain MHOM/BR/1989/BA199) and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (strain MCAN/BR/2002/BH400) promastigotes were maintained in minimum essential culture medium (α -MEM) (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)

supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 mg/mL kanamycin, 50 mg/mL ampicillin, 2 mM L-glutamine, 5 mg/mL hemin, 5 mM biopterin, (Sigma-Aldrich), pH 7.0 and incubated at 25 °C. *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* were selected for Sb(III) resistance as previously described [39,40]. The Sb(III)-resistant mutants *L. amazonensis* BA199Sb2700.2 and *L. infantum chagasi* BH400Sb2700.2 were selected in 25 cm² flasks containing 5 mL of α -MEM in the presence of increasing Sb(III) concentrations up to 2,700 μ M.

3.4.2. Antileishmanial Activity Assay

Complexes **1** and **2** were evaluated *in vitro* for their activity against both Sb(III)-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites. Log-phase *L. amazonensis* and *L. infantum chagasi* promastigotes (1×10^6 parasites/mL) were seeded in 24-wells cell culture plates with 1.5 mL of α -MEM, incubated under shaking at 25 °C during 72 h in the presence of several concentrations of complex **1** or **2**. Controls were performed using cultures in the presence of potassium antimonyl tartrate, SbCl₃, BiCl₃ and dppz itself. Non-treated parasites were established for growth comparison. Stock solutions of dppz, its complexes, SbCl₃ and BiCl₃ were dissolved in DMSO (5 M) and diluted in α -MEM cell culture medium to obtain the range of tested concentrations. The final DMSO concentration did not exceed 0.2%, which is known to be nontoxic to *Leishmania* parasites [41,42]. For drug susceptibility assay, *Leishmania* growth curves were constructed by measuring absorbance at 600 nm [43]. The antileishmanial activity is expressed as IC₅₀/72 h, which is the concentration that reduces cell growth by 50% compared to untreated control (relative growth). All experiments were done at least three times as independent experiments performed in triplicate.

3.4.3. Cytotoxicity Assay against Peritoneal Macrophages

The concentration of studied compounds which is cytotoxic to 50% of the macrophages (CC₅₀) was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) method according to Mosmann [44]. Macrophages were obtained by lavage of peritoneal cavity of mice with 10 mL cold RPMI without FBS. After washing, the cell suspension (4.0×10^6 /mL) was seeded (0.1 mL) in 96-well flat bottom plates. Macrophages were allowed to adhere for 2 h and non-adherent cells were removed by washing with RPMI. Then, the studied compounds were added to the wells at concentrations ranging from 1 to 20 μ M and the cells were further cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Thereafter, the medium was replaced with fresh RPMI containing 0.5 mg/mL of MTT and the plates were incubated for additional 4 h. Supernatants were aspirated and the formazan crystals formed were dissolved in 100 μ L of DMSO. After 15 min of incubation at room temperature, absorbance of solubilized MTT formazan product was spectrophotometrically measured at 570 nm.

3.5. Statistical Analysis

The IC₅₀ and CC₅₀ values were calculated by nonlinear regression using the software GraphPad Prism 5.0. The acceptable level of significance was 95% ($p < 0.05$).

3.6. *n*-Octanol/Water Partition Coefficient

Log P values were determined by the Shake-Flask method dissolving complexes **1** and **2** in octanol-saturated aqueous phosphate buffer (pH 6.8) to a concentration at which the solution was still unsaturated but close to saturation, 10 and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Then, three different partition systems were prepared by adding these solutions to water-saturated octanol, in octanol/water volume ratios, 1:1, 1:2 and 2:1 in duplicate. The mixtures were vortexed for 10 min and then centrifuged for 5 min. The partition coefficients were determined using the absorbance of complexes **1** and **2**. Calculated dppz log P value was obtained from the program ALOGPS 2.143 available on line. The feasibility of ALOGPS 2.143 ability to predict partition coefficient was successfully demonstrated [45].

4. Conclusions

Two novel complexes of Sb(III) and Bi(III) with dppz were synthesized in reasonably good yields and characterized as $[\text{Sb}(\text{dppz})\text{Cl}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ and $[\text{Bi}(\text{dppz})\text{Cl}_3]$. These complexes were more effective than dppz alone and at least 77 and 2,400 times more active than potassium antimonyl tartrate against Sb(III)-sensitive and –resistant *Leishmania*, respectively. The lack of cross-resistance to the Sb(III)-dppz complex, together with the much lower activity of antimonyl tartrate, SbCl_3 and BiCl_3 strongly support the model that the metal is not active by itself but improves the activity of dppz through complexation. Complexation was found to decrease the lipophilicity of dppz, suggesting the role of this factor in the improved antileishmanial activity of the complexes. The present work successfully applied a novel approach, based on tests against metal-resistant mutants and their respective parental sensitive strains, to get insight into the role of the metal in the cytotoxicity of metal complexes.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG and CAPES for financial support.

References

1. Marsden, P.D. Pentavalent antimonials: Old drugs for new diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1985**, *18*, 187–198.
2. Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R.R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 2317–2336.
3. Frézard, F.; Demicheli, C.; Ferreira, C.S.; Costa, M.A.P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 913–916.
4. Ferreira, C.D.; Martins, P.S.; Demicheli, C.; Brochu, C.; Ouellette, M.; Frézard, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinylglycine, cysteine and glutathione. *Biometals* **2003**, *16*, 441–446.
5. Sundar, S.; More, D.K.; Singh, M.K.; Singh, V.P.; Sharma, S.; Makharia, A.; Kumar, P.C.K.; Murray, H.W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, 1104–1107.

6. Ouellette, M.; Légaré, D.; Haimeur, A.; Grondin, K.; Roy, G.; Brochu, C.; Papadopoulou, B. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **1998**, *1*, 43–48.
7. Légaré, D.; Richard, D.; Mukhopadhyay, R.; Stierhof, Y.D.; Rosen, B.P.; Haimeur, A.; Papadopoulou, B.; Ouellette, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26301–26307.
8. Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3971–3976.
9. Gourbal, B.; Sonuc, N.; Bhattacharjee, H.; Légaré, D.; Sundar, S.; Ouellette, M.; Rosen, B.P.; Mukhopadhyay, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31010–31017.
10. Ayres, D.C.; Pinto, L.A.; Giorgio, S. Efficacy of pentavalent antimony, amphotericin B, and miltefosine in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages under normoxic and hypoxic conditions. *J. Parasitol.* **2008**, *94*, 1415–1417.
11. Silvestru, C.; Socaciu, C.; Bara, A.; Haiduc, I. The first organoantimony(III) compounds possessing antitumor properties: Diphenylantimony(III) derivatives of dithiophosphorus ligand. *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 803–804.
12. Sereno, D.; Holzmüller, P.; Mangot, I.; Cuny, G.; Ouaiissi, A.; Lemesre, J.L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2064–2069.
13. Moreira, W.; Leprohon, P.; Ouellette, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, 1–8.
14. Wyllie, S.; Fairlamb, A.H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 257–267.
15. Cunningham, M.L.; Fairlamb, A.H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani* Purification, characterization and inhibition by trivalent antimonials. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 460–468.
16. Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603–2612.
17. Klapotke, T. Biological activity of organometallic bismuth compounds. *Biol. Met.* **1988**, *1*, 69–76.
18. Yang, N.; Sun, H. Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2354–2366.
19. 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.
20. Ensafi, A.A.; Hajian, R.; Ebrahimi, S. Study on the interaction between Morin-Bi(III) complex and DNA with the use of methylene blue dye as a fluorophore probe. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 266–276.
21. Oliveira, L.G.; Silva, M.M.; de Paula, F.C.S.; Pereira-Maia, E.C.; Donnici, C.L.; de Simone, C.A.; Frézard, F.; da Silva Junior, E.N.; Demicheli, C. Antimony(V) and bismuth(V) complexes of lapachol: Synthesis, crystal structure and cytotoxic activity. *Molecules* **2011**, *16*, 10314–10323.

22. Sasmal, P.K.; Patra, A.K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A.R. DNA cleavage by new oxovanadium(IV) complexes of N-salicylidene α -amino acids and phenanthroline bases in the photodynamic therapy window. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 11112–11121.
23. Toneatto, J.; Boero, R.A.; Lorenzatti, G.; Cabanillas, A.M.; Argueello, G.A. New insights in the DNA-[Cr(phen)₂(dppz)]³⁺ binding and photocleavage properties by the complex with an intercalating ligand. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 697–703.
24. Friedman, A.E.; Chambron, J.C.; Sauvage, J.P.; Turro, N.J.; Barton, J.K. Molecular light switch for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)²⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4960–4962.
25. Zhang, K.Y.; Li, S.P.Y.; Zhu, N.; Or, I.W.S.; Cheung, M.S.H.; Lam, Y.W.; Lo, K.K.W. Structure, photophysical and electrochemical properties, biomolecular interactions, and intracellular uptake of luminescent cyclometalated iridium(III) dipyridoquinoxaline complexes. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2530–2540.
26. Navarro, M.; Hernandez, C.; Colmenares, I.; Hernandez, P.; Fernandez, M.; Sierralta, A.; Marchan, E. Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃: DNA Interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 111–116.
27. Benítez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Pessoa, J.C.; Moreno, V.; Lorenzo, J.; Avilés, F.X.; Garat, B.; Gambino, D. A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1386–1387.
28. Yin, H.D.; Zhai, J. Synthesis, characterizations and crystal structures of antimony(III) complexes with nitrogen-containing ligands. *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 339–345.
29. Espínola, J.G.P.; Martins, E.P.S.; Aguiar, F.P.; Silva, H.R.M.; Fonseca, M.G.; Arakaki, L.N.H.; Teotônio, E.E.S. Thermal decomposition study of bismuth (III) trichloride complex with 1,10-phenanthroline as the ligand. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2011**, *106*, 601–606.
30. Bertazzi, N.; Alonzo, G.; Gibb, T.C. Antimony-121 moessbauer and infrared spectral studies on 1,10-phenanthroline adducts of antimony(III) halides. *Inorg. Chim. Acta* **1983**, *73*, 121–124.
31. Shaw, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi for the a etiologial agent of American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 577–579.
32. Marzochi, M.C.D.A.; Marzochi, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Públ.* **1994**, *10*, 359–375.
33. Sinagra, A.; Luna, C.; Abraham, D.; Iannella, M.D.C.; Riarte, A.; Krolewiecki, A.J. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2007**, *40*, 627–630.
34. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.J.; Sierralta, A.; Fernandez-Mestre, M.; Silva, P.; Arrieche, D.; Marchán, E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 401–408.
35. Pramanik, N.C.; Pramanik, K.; Ghosh, P.; Bhattacharya, S. Chemistry of [Ru(tpy)(pap)(L')]ⁿ⁺ (tpy = 2,2',6',2''-terpyridine; pap = 2-(phenylazo)pyridine; L' = Cl⁻, H₂O, CH₃CN, 4-picoline, N₃⁻; n = 1,2. X-ray crystal structure of [Ru(tpy)(pap)(CH₃CN)](ClO₄)₂ and catalytic oxidation of water to dioxygen by [Ru(tpy)(pap)(H₂O)]²⁺. *Polyhedron* **1998**, *17*, 1525–1534.

36. Ossipov, D.; Gohil, S.; Chattopadhyaya, J. Synthesis of the DNA-[Ru(tpy)(dppz)(CH₃CN)]²⁺ conjugates and their photo cross-linking studies with the complementary DNA strand. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13416–13433.
37. Liang, B.; Zhu, M.X.; Zhu, W.G. Synthesis and Photoluminescence of New Europium Complex Eu(DBM)₃(DPPZ) with Dipyridophenazine Ligand. *Chin. Chem. Lett.* **2003**, *14*, 43–46.
38. Sheldrick, G.M.S. *SHELXL-97—A Program for Crystal Structure Refinement*; University of Goettingen: Goettingen, Germany, 1997.
39. Ouellette, M.; Borst, P. Drug-resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res. Microbiol.* **1991**, *142*, 737–746.
40. Monte-Neto, R.L.; Coelho, A.C.; Raymond, F.; Légaré, D.; Corbeil, J.; Melo, M.N.; Frézard, F.; Ouellette, M. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1167.
41. Ma, G.Y.; Khan, S.I.; Jacob, M.R.; Tekwani, B.L.; Li, Z.Q.; Pasco, D.S.; Walker, L.A.; Khan, L.A. Antimicrobial and antileishmanial activities of hypocrellins A and B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4450–4452.
42. Habtemariam, S. *In vitro* antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. chimperi* and *P. oligotricha*. *BMC Pharmacol.* **2003**, *3*, 1–6.
43. Ouellette, M.; Fase-Fowler, F.; Borst, P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1027–1033.
44. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
45. Wilson, J.J.; Lippard, S.J. *In Vitro* Anticancer Activity of cis-Diammineplatinum(II) Complexes with β-Diketonate Leaving Group Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5326–5336.

Sample Availability: Samples of the antimony(III) and bismuth(III) complexes of dppz are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Frédéric Frézard, Cynthia Demicheli*, Kelly C. Kato, Priscila G. Reis
and Edgar H. Lizarazo-Jaimes

Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action

Abstract: Antimonial drugs have been used for a century in the therapy of the parasitic disease leishmaniasis. Even though pentavalent antimonials are still first-line drugs, they exhibit several limitations, including severe side effects, the need for daily parenteral administration and drug resistance. The molecular structure of pentavalent antimonials, their metabolism and mechanism of action, are still being investigated. Previous studies suggest that pentavalent antimony acts as a prodrug which is converted to the active and more toxic trivalent antimony. Other works support the direct involvement of pentavalent antimony. Recent data indicate that thiols and ribose-containing biomolecules may mediate the pharmacological action of these drugs. Trypanothione reductase and zinc-finger proteins were identified as possible molecular targets. This review summarizes the progress achieved to date on the chemistry of antimonial drugs in biological systems.

Keywords: antimony; *Leishmania*; reduction; resistance; ribonucleosides; thiols; zinc finger protein.

Savage-Smith 1985, Estes 1989). The importance of antimony compounds in early medicine is well documented, due to the debate created around their utilization in this period (Duffin and René 1991). The first antimony compounds prepared for medicinal applications were introduced in the 16th and 17th centuries and we can emphasize the utilization of Sb(III) potassium tartrate (tartar emetic). Tartar emetic was first obtained placing sour wine in antimony vessels and its use was prescribed for many diseases, especially the lung diseases. However, still in the 16th century, the Paris Faculty of Medicine banned the use of antimony due to its high toxicity. Nevertheless, it was brought back by popular demand, partly because it was said that tartar emetic had cured King Louis XIV from typhoid fever in 1657. During the late 19th century, tartar emetic was used for fever and pneumonia and its use declined slowly until the beginning of 20th century.

The most significant clinical use of organoantimonials is certainly that in the treatment of leishmaniasis during the last century. Leishmaniasis are infective parasitic diseases, which are endemic in 88 countries, 22 in the New World and 66 in the Old World, and affect mainly poor and marginalized populations (WHO, accessed August 15, 2012). Clinical manifestations of the disease can involve the skin, with local (cutaneous), diffuse (diffuse cutaneous) or disfiguring lesions (mucocutaneous), or the viscera (liver, spleen and bone marrow), leading to death if untreated. It is caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted to humans *via* the bite of sandflies. Wild and domesticated animals, and humans themselves, can act as a reservoir of infection. The *Leishmania* parasite is found as a motile promastigote in the sandfly; it transforms into an amastigote when engulfed by host macrophages, and resides in the acidic environment of secondary lysosomes (WHO, accessed August 15, 2012).

At the beginning of the last century, Plimmer and Thomson (1908) demonstrated the efficacy of tartar emetic against experimental *Trypanosoma* infections. A few years later, the pioneer researcher Gaspar Vianna reported the efficacy of tartar emetic for treatment of mucocutaneous leishmaniasis (Vianna 1912). This activity was confirmed in visceral leishmaniasis in Italy (Di Cristina and Caronia

***Corresponding author: Cynthia Demicheli**, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, e-mail: demichel@netuno.lcc.ufmg.br
Frédéric Frézard, Kelly C. Kato and Priscila G. Reis: Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas
Edgar H. Lizarazo-Jaimes: Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Introduction

Antimonial compounds have been used in therapeutics for several centuries. Some authors have suggested that their earliest use was in ancient Egypt, for cosmetic purposes. However, it has been shown that this affirmation was based on a misreading of the ancient texts (Allan 1979,

Q1:
Please
supply
location for
Affiliation
"Departa-
mento...."

Q2:
Please
confirm the
running
head

Q3:
“Di Cristina
and Caronia
1912”
changed
to “Di
Cristina and
Caronia,
1915”
“Marques
da Silva et
al. 2008”
changed to
“Marques-
da-Silva et
al., 2008”
year was
match
with ref
list. Please
check and
confirm

1915), Africa (Cole 1944) and India (Cook 2006). Later, the clinical use of this compound was interrupted because of severe side-effects.

From 1940, the less toxic, pentavalent antimony [Sb(V)] complexes, were introduced in the therapeutics of leishmaniasis. Even though pentavalent antimonials are still the first-line drugs against all forms of leishmaniasis in several countries, their use in the clinical setting shows several limitations (Marsden 1985, Berman 1997). These compounds have to be given parenterally, daily, for at least 3 weeks (typically 20 mg of Sb/kg/day for 20–30 days). Antimony therapy is often accompanied by local pain during intramuscular injections and by systemic side effects, requiring very careful medical supervision. Typical side-effects include nausea, vomiting, weakness and myalgia, abdominal colic, diarrhea, skin rashes and hepatotoxicity, together with the most severe cardiotoxicity. Widespread resistance to antimonials has emerged in India, but not in Africa or South America. Therefore, antimonials are no longer recommended for treatment of leishmaniasis in Bihar State, India (Guerin et al. 2002). A hypothesis to explain the emergence of resistance in this specific region of India refers to the role of arsenic in drinking water (Perry et al. 2011).

Until recently, little was known about the chemical structure and pharmacology of antimonial drugs, as well as the methods used in the industry for their preparation (Steck 1974, Berman 1997). As a consequence, inadequate manufacture has already occurred, as evidenced by the serious side effects produced by some commercial forms of pentavalent organoantimonials (Sundar et al. 1998, Deps et al. 2000).

Recent studies with pentavalent antimonials have also revealed their effectiveness in experimental models of cancer, hepatitis C and AIDS (Yan et al. 2005). This also explains the renewed interest in the chemistry and biochemistry of these old drugs.

The present review will cover the progress recently achieved on the chemistry and biochemistry of antimonial compounds.

Antimony chemistry in aqueous solution

Antimony oxides

Hydrated antimony pentoxide species can be obtained by hydrolysis of antimony pentachloride in water. These species polymerize to give a material of approximate

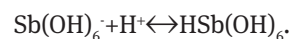
$\text{Sb}_2\text{O}_5 \cdot 3.5 \text{H}_2\text{O}$ composition, however, the exact structure of this material has not yet been characterized. Another way to obtain the hydrated antimony pentoxide species, is by means of acidification of a solution of potassium hexahydroxoantimonate(V), $\text{KSb}(\text{OH})_6$, also known as potassium antimonate. The polymerization of antimonate started to be investigated in the 1960s. It is only recently that the first polyantimonate $[\text{Sb}_8\text{O}_{12}(\text{OH})_{20}]^{4-}$ was characterized by X-ray (Nakano et al. 1995). This salt was prepared by passing a $\text{KSb}(\text{OH})_6$ solution through a cation exchange column. The antimony atoms were found to be ordered in SbO_6 octahedra, which may share corners or edges in the same way as the building block found in the structures of antimony complexes (Bailar et al. 1973). Although $\text{KSb}(\text{OH})_6$ is highly soluble in water, $\text{NaSb}(\text{OH})_6$ is one of the least soluble antimony(V) salts known and is useful in sodium analyses.

SbCl_3 also hydrolyses readily in aqueous solution, to give hydrated antimony trioxide species. Sb_2O_3 dissolves by forming the neutral $\text{Sb}(\text{OH})_3$ species, which is slightly soluble in a pH range of 1.5–12. At $\text{pH} < 1.5$, the oxide dissolves to form the SbO^+ cation and at $\text{pH} > 12$, it dissolves to form SbO_2^- .

The available thermodynamic data for antimony oxides and antimonate species are scarce and were first reported five decades ago. However, the obtained values are not in agreement with those reported later. Furthermore, different chemical formulae were proposed for the same species in solution, as for instance SbO_2^- and $\text{Sb}(\text{OH})_4^-$.

The first experimental study was carried out by Pitman et al. (1957) who calculated the constant for the equilibrium $\text{SbO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{SbO}_3^- + 3\text{H}^+$ and found: $\log(\text{SbO}_3^-)/(\text{SbO}_2^-) = 0.54 + 2\text{pH}$.

In subsequent studies, Jander and Ostmann (1962) reported a pK value of 2.5 for “antimonic acid” and Lefebvre and Maria (1963) reported a pK value of -2.55 for the equilibrium:

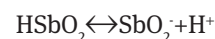


The data obtained by the latter authors were re-calculated by Baes and Mesmer (1976) and this pKa value has been cited frequently in the literature since then.

The acid-base properties of Sb(III) have been investigated essentially through solubility assays. Pitman et al. (1957) calculated the constant for the equilibria:



where $\log(\text{HSbO}_2)/(\text{SbO}^+) = -0.87 + \text{pH}$ and



where $\log(\text{SbO}_2^-)/(\text{HSbO}_2) = -11.00 + \text{pH}$.

Q4:
 “biological and bio-logical interest.” This is repetition – please check and amend as appropriate

Filella and May (2003) developed computer speciation models for antimony aqueous solutions of biological and biological interest. In this work, they collected most of the available thermodynamic data.

Structural characterization of clinically-used pentavalent antimonials

The two main antimonials, under current clinical use, are complexes of Sb(V) with N-methyl-D-glucamine (meglumine antimoniate or Glucantime) or sodium gluconate (sodium stibogluconate or Pentostam). Although the exact structure of these complexes remained unknown for decades, mainly because of the amorphous state of these compounds, the use of mass spectrometric approaches and NMR techniques allowed significant progress.

Fast-atom bombardment mass spectrometric (FAB-MS) data on the commercially available meglumine antimoniate, suggested a main structure in which two molecules of meglumine (NMG) coordinate with a single Sb atom in a symmetrical geometry (Headley et al. 1995). By contrast, positive ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI(+)-MS) analyses have suggested the existence of a mixture of oligomeric structures with the general formula $(\text{NMG-Sb})_n\text{-NMG}$ (Roberts et al. 1998). Further studies of meglumine antimoniate by ESI-MS, in both the positive and negative modes, showed negatively-charged 1:1 (m/z 364) and 2:2 (m/z 765) Sb(V)-meglumine complexes and supported the predominance of zwitterionic species in solution (Frézard et al. 2008). ESI-MS measurements of sodium stibogluconate also showed that it consists of a mixture of oligomeric structures (Frézard et al. 2008), in agreement with earlier results obtained by molecular sieve chromatography (Berman and Grogl 1988) and consistent with the general formula $(\text{GLU-Sb})_n\text{-GLU}$ and $(\text{GLU-Sb})_n$ (GLU, gluconate). Osmolarity measurements suggested the predominance of the 1:1 Sb-NMG and Sb-GLU complexes in diluted samples (Roberts et al. 1998, Frézard et al. 2008). This interpretation was further supported by HPLC-inductively coupled plasma-MS and ESI-MS analyses in the case of sodium stibogluconate (Hansen et al. 2008). Figure 1 shows the structures actually proposed for the predominant Sb-ligand complex in diluted solutions of meglumine antimoniate and sodium stibogluconate.

In the commercial concentrated liquid form of meglumine antimoniate (Glucantime at 85 g/l of Sb), osmolarity measurements associated with elemental analyses of carbon, sodium, potassium, chloride and antimony, predominance of a 2:3 Sb-NMG complex with a positive net charge is suggested (Figure 2).

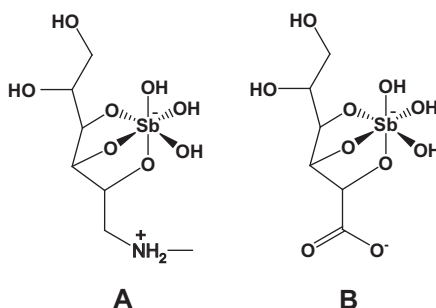


Figure 1 Proposed structural formula for meglumine antimoniate (A) and stibogluconate (B) in diluted aqueous solution. Adapted from Frézard et al. (2008).

A proton NMR study allowed the assignment of proton resonances in meglumine antimoniate, and established the existence of two distinct coordination environments for the NMG molecule (Demicheli et al. 2003), as expected from the proposed structure in Figure 2. Competition binding experiments with 5'-GMP ribonucleoside allowed the estimation of the stability constant of the meglumine antimoniate complex, 8600 l mol^{-1} (pD 5, 37°C) (Ferreira et al. 2006).

It is noteworthy that MS and NMR data obtained so far are expected to be useful to the quality control of meglumine antimoniate, following industrial production.

Q6:
 Both ⁻¹ and / have been used – please choose one for consistency

Q5:
 This has been written both as ⁿ and _n – please choose one for consistency

Chemistry of pentavalent antimonials in biological systems

The metabolism and mechanism of action of pentavalent antimonials against leishmaniasis still remain poorly understood (Estes 1989, Duffin and René 1991). It is not yet clear whether the final active form of pentavalent antimonials is Sb(III) or whether both oxidation states exhibit biological activity.

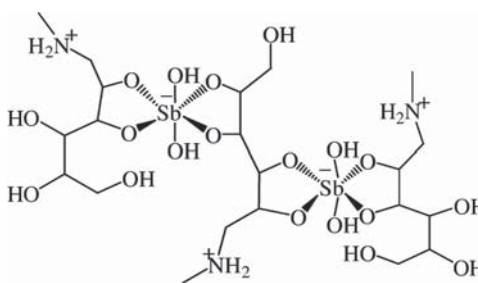


Figure 2 Proposed structural formula for meglumine antimoniate in its commercial liquid form (Glucantime).

The prodrug model and role of sulfhydryl-containing biomolecules

According to this first model, Sb(V) would behave as a prodrug which is reduced within the organism into the more toxic and active Sb(III). This model is supported by the observation that Sb(V) is reduced into the more toxic Sb(III) in the vertebrate host and the parasite (Goodwin and Page 1943, Burguera et al. 1993, Shaked-Mishan et al. 2001). Nevertheless, the accuracy of the speciation assays is often questioned. Early work tended to use low pH (<1) extractions due to better sensitivity. However, Sb(V) may be converted to Sb(III) under such conditions. It is possible that extraction of biological material at higher pH values around 5, in the presence of sulfhydryl-containing biomolecules, could also reduce Sb(V) to Sb(III) (see discussion below, about the influence of thiols). This may explain why conflicting results were presented with respect to the ability of macrophages to reduce Sb(V) to Sb(III) (Wyllie and Fairlamb 2006, Hansen et al. 2011). Furthermore, speciation assays in pentavalent antimonial drugs reported markedly different amounts of Sb(III), showing that the

Sb(III) determination in such matrix is far from trivial. For instance, Glucantime with total Sb of 85 g/l, showed Sb(III) concentrations as high as 15 g/l (Franco et al. 1995) and as low as 0.02 g/l (Lukaszczyk and Zyrnicki 2010).

Figure 3 illustrates the proposed role of Sb(III) and sulfhydryl-containing biomolecules in the mechanism of action of pentavalent antimonials.

Recent studies indicate that thiols may act as a reducing agent in this conversion (Frézard et al. 2001, Ferreira et al. 2003, Yan et al. 2003). Four different thiols have been evaluated: glutathione (GSH), which is the main thiol in the cytosol of mammalian cells; cysteine (Cys) and cysteinyl-glycine (Cys-Gly) found predominantly within lysosomes (Mego 1985, Gainey et al. 1996); and the glutathione-spermine conjugate, trypanothione [T(SH)₂], which is the main thiol within the parasite (Fairlamb and Cerami 1992). It has been reported that GSH, Cys, Cys-Gly and T(SH)₂ do promote the reduction of Sb(V) into Sb(III) at 37°C, according to the following reactions:

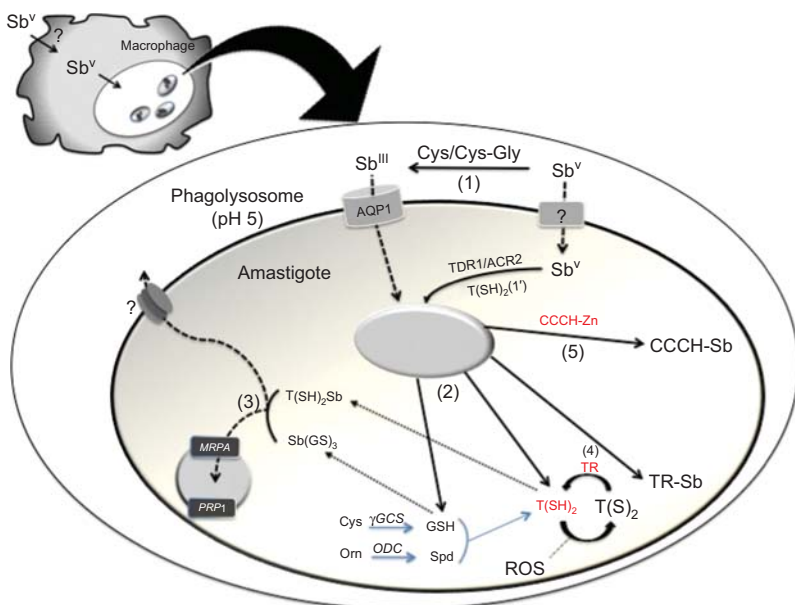
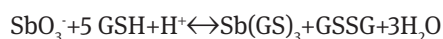


Figure 3 Model proposed for the mechanism of action of pentavalent antimonials, involving Sb(III) and sulfhydryl-containing biomolecules. Reduction of Sb(V) to Sb(III) may be mediated (1) by the thiols Cys or Cys-Gly as reducing agents within the phagolysosomes, (1') by T(SH)₂ as the predominant thiol within parasite or by the thiol-dependent reductase 1 (TDR1) or antimoniate reductase 2 (ACR2); (2) formation of complexes between Sb(III) and thiols (GSH, T(SH)₂); (3) sequestration by ABC transporter multidrug resistance protein A (MRPA) or possibly pentamidine resistance protein 1 (PRP1) into intracellular organelles or active extrusion by a non-identified plasma membrane transporter; (4) binding of Sb(III) to the active site and inhibition of trypanothione reductase, increasing intracellular ROS production; (5) ejection of Zn(II) from zinc-finger protein by competition with Sb(III), resulting in the interference with post-transcriptional regulation of gene expression; (?) means a mechanism not yet elucidated.

GSH, glutathione; YGCS, enzyme γ -glutamylcysteine synthase; T(SH)₂, trypanothione; Spd, spermidine; ODC, ornithine decarboxylase; TR, trypanothione reductase; AQP1, aquaglyceroporin; TDR1, thiol dependent reductase 1; ACR2, antimoniate reductase 2; MRPA, multidrug resistance protein A; Orn, ornithine; ROS, reactive oxygen species.

where GSSG and $T(S)_2H^+$ represent the oxidized forms of GSH and $T(SH)_2$, respectively.

Strikingly, the initial rates of reduction of Sb(V) were much greater in the presence of Cys-Gly, Cys and $T(SH)_2$, than in the presence of GSH (Ferreira et al. 2003). These reactions occurred at both pH 5 and 7, but were favored at an acidic pH and slightly elevated temperature (Ferreira et al. 2003, Oliveira et al. 2006).

These data support the model that Sb(V) may be reduced *in vivo* by $T(SH)_2$ within *Leishmania* parasites and by Cys or Cys-Gly within the acidic compartments of mammalian cells.

In the study of the reaction of Sb(V) with Cys, reaction orders of 1.0 and 3.3 were determined with respect to Sb and Cys, respectively, indicating a strong influence of Cys concentration upon the rate of reduction (Oliveira et al. 2006). From this data, it was suggested that Cys should have a concentration in the millimolar range, to exert a significant pharmacological role. Thus, only once significant levels of thiols have been shown to be present in the acidic phagolysosome where the amastigotes reside, could this mechanism be validated.

Other studies have suggested the participation of a parasite-specific enzyme in the process of reduction of Sb(V) to Sb(III): a thiol-dependent reductase (TDR1) (Denton et al. 2004) and an antimoniate reductase (ACR2) (Zhou et al. 2004).

TDR1 was characterized as a unique trimer of subunits, each containing two glutathione-S-transferase domains, which exhibits deglutathionylation activity (Fyfe et al. 2012). It was suggested that the mechanism for the activation of the antimonial prodrugs by TDR1 involves first, binding of Sb(V)–GSH adducts, followed by deglutathionylation, during which the reduction and release of Sb(III) occurs. However, no data were presented that directly demonstrate a relationship of this enzyme and drug sensitivity in *Leishmania* amastigotes.

The arsenate reductase homologue, ACR2, also uses GSH and requires glutaredoxin as a cofactor for its activity. Importantly, macrophage-infected amastigotes, derived from *Leishmania infantum* (*L. infantum*) promastigotes transfected with ACR2, exhibited increased sensitivity to Pentostam (Zhou et al. 2004).

The much lower activity of pentavalent antimonials against promastigotes compared to amastigotes (Roberts et al. 1995) would imply that there is a stage-specific expression or upregulation of antimony-reducing enzymes in amastigotes. Indeed, evidence for such a stage-dependent expression was presented in the case TDR1 (Denton et al. 2004, Aduai et al. 2011).

It is now well established that Sb(III) enters *Leishmania* cells primarily through an aquaglyceroporin named AQP1, and that the level of expression of this transporter may modulate the resistance of the parasite to Sb(III) (Gourbal et al. 2004).

Sb(III) is classified as a borderline metal ion and has a high affinity towards nitrogen- and sulfhydryl-containing ligands. The mechanism of antileishmanial action of Sb(III) is probably related to its interaction with sulfhydryl-containing biomolecules, including thiols, peptides, proteins and enzymes.

Thus, Sb(III) was found to form stable complexes with the major intracellular thiols GSH and $T(SH)_2$ as 1:3 and 1:1 Sb-thiol complexes, respectively (Sun et al. 2000, Yan et al. 2003). Once Sb(III) is in the cell and is conjugated to $T(SH)_2$, the complex can be sequestered inside a vacuole or extruded from the cell by ATP-binding cassette (ABC) transporters (Mukhopadhyay et al. 1996, Légaré et al. 2001). It is established that exposition of *Leishmania* to Sb(III) induces a decrease of intracellular thiol concentration and an inhibition of trypanothione reductase (TR), resulting in enhanced susceptibility of the parasite to oxidative stress (Wyllie et al. 2004). In this context, increase in total thiols (Cys, GSH and $T(SH)_2$) and/or overexpression of ABC transporters are often observed in metal-resistant *Leishmania* (Légaré et al. 2001, Coelho et al. 2003). The thiol increase is mediated by the overexpression or amplification of a number of different genes involved in the synthesis of GSH or polyamines, which are the two building blocks of $T(SH)_2$ (Ouellette et al. 2004). MRPA was the first ABC transporter characterized in *Leishmania* and classically associated with Sb resistance in this organism (Ouellette et al. 1990, Callahan and Beverley 1991). It was shown in *L. tarentolae* that this membrane protein is located in an intracellular compartment close to the flagellar pocket of the parasite recognized as the site of endocytosis and exocytosis and promotes sequestration of the Sb/thiol complex (Légaré et al. 2001).

Resistance of *Leishmania* to Sb is generally associated with a reduced intracellular accumulation of the metal (Brochu et al. 2003), however, MRPA does not seem to be involved in this reduction (Papadopoulou et al. 1994) and the responsible transport pathways still need to be characterized.

Increased levels of trypanothione and trypanothione peroxidase, resulting in enhanced antioxidant defenses, was recently established as an additional Sb resistance mechanism in *Leishmania* (Wyllie et al. 2008, 2010).

Evidence was also obtained that some *Leishmania* strains can promote resistance to antimonial treatment through upregulation of the host multidrug

resistance-associated protein 1 (MRP1), a GSH-coupled efflux pump which reduces the cellular accumulation of Sb(III) in the infected macrophage (Basu et al. 2008).

It is now clear that clinical resistance to antimonial drugs is a multi-factorial process, but recent comparative genomics and proteomics suggest an even higher complexity (Biyani et al. 2011, Monte-Neto et al. 2011, Rogers et al. 2011, Sterkers et al. 2012).

In summary, thiols exhibit a dual role in the pharmacology of pentavalent antimonials. On one hand, thiols promote the activation of these drugs through the reduction of Sb(V). On the other hand, thiols promote the drug detoxification by forming conjugates with Sb(III) for efflux and/or sequestration.

Among the potential molecular targets of Sb(III), evidence was obtained that trypanothione reductase (TR) or zinc-finger protein may be involved. Such interaction is consistent with the modality of Cys binding of thiophilic metals, such as As(III), Sb(III), and Bi(III).

The trypanothione/TR system, which keeps T(SH)₂ under the reduced state, replaces the nearly ubiquitous glutathione/glutathione reductase (GR) system, protects trypanosomatids from oxidative damage and toxic heavy metals and delivers the reducing equivalents for DNA synthesis (Krauth-Siegel and Comini 2008). Although TR shares structural and mechanistic similarities with GR, differences in the disulfide binding site between TR and GR draw the interest for selective inhibition. Fairlamb and co-workers (1992) reported that trivalent antimonials interfere with T(SH)₂ metabolism by inhibiting TR and inducing rapid efflux of intracellular T(SH)₂ and GSH in intact *Leishmania* cells (Cunningham and Fairlamb 1995, Wyllie et al. 2004). The crystal structures of the complex of TR with NADPH and Sb(III) in the reduced state was recently described (Baiocco et al. 2009). Sb(III) was found to be coordinated by the two redox-active catalytic cysteine residues (Cys52 and Cys57), one threonine residue (Thr335), and His461' of the 2-fold symmetry related subunit in the dimer.

In other recent studies, our group reported the ability of Sb(III) to bind to CCHC and CCCH zinc finger peptide models and to promote the ejection of Zn(II) (Demicheli et al. 2008, Frézard et al. 2012). The zinc finger domain is characterized by the coordination of a zinc atom by several amino acid residues, including cysteines and histidines. These structural elements are associated with protein–nucleic acid and protein–protein interactions, as well as extraordinarily diverse functions, including DNA recognition, RNA packaging, protein folding and assembly, lipid binding, transcriptional activation, cell differentiation and growth and regulation of apoptosis (Leon and

Roth 2000). Zinc finger proteins sharing the CCHC motif have been identified in trypanosomatids and have been shown to be involved in different cellular functions. In *L. major*, for instance, the protein HEXBP containing nine CCHC motifs binds to the hexanucleotide repeat sequence found in the intervening region of the GP63 gene cluster, the most abundant surface glycoprotein of this protozoan, and it is likely to be involved in DNA replication, structure and repair (Webb and McMaster 1993). On the other hand, CCCH zinc finger domains, essentially C-X7-C-X5-C-X3-H or C-X8-CX5-C-X3-H, are found mainly in RNA binding proteins with regulatory functions at all stages of mRNA metabolism (Lai et al. 2002). CCCH-type zinc finger proteins have been considered to play a crucial role in the biology of kinetoplastid protozoa, because of the unusual emphasis on post-transcriptional control of gene expression in this group of organisms (Clayton and Shapira 2007, Bhandari et al. 2011). In this context, we recently reported that Sb(III) more effectively promotes Zn(II) ejection from CCCH zinc finger peptides than from CCHC peptides (Frézard et al. 2012), suggesting that the action of antimonial drugs could be intimately related to interaction of Sb(III) with CCCH zinc finger proteins.

Treatment of *L. infantum* amastigotes with Sb(III) at low concentrations was found to induce DNA fragmentation, suggesting the appearance of late events of programmed cell death (apoptosis) (Sereno et al. 2001). Further studies on the mechanisms of the apoptotic cell death pathway in *Leishmania* indicated that intracellular Ca²⁺ plays a central role in intracellular parasite clearance (Sudhandiran and Shaha 2003), a phenomenon previously documented in the oxidative-stress-induced apoptosis-like death in *L. donovani* promastigotes (Mukherjee et al. 2002).

Direct action of antimony(V) and possible role of ribose-containing biomolecules

According to this second model, Sb(V) would present intrinsic antileishmanial activity. Sodium stibogluconate, but not Sb(III), was shown to specifically inhibit type I DNA topoisomerase from *L. donovani* through the inhibition of the unwinding and cleavage of the supercoiled plasmid pBR322, and to stabilize topoisomerase and DNA covalent complexes, but not calf-thymus topoisomerase I and *Escherichia coli* DNA gyrase (Chakraborty and Majumder 1988, Walker and Saravia 2004). Furthermore, the *in vivo* sensitivity and resistance of *Leishmania* was correlated with the effect of such a complex (Lucumi et al. 1998).

The conclusions of early studies on the mechanism of action of Pentostam should be considered cautiously, because the drug contains the preservative *m*-chlororesol, which exhibits by itself antiparasitic effects (Roberts and Rainey 1993).

Evidence was obtained that the antileishmanial action of pentavalent antimonials depends on a number of host factors, including immune cells like macrophage and T-cell subsets and cytokines (Murray 2001). It is also proposed that pentavalent drug itself may trigger the host cell defense mechanisms. An interesting effect of stibogluconate, that seems to be specific of the organometallic complex, is its activation of the PI3K and Akt pathways of the macrophages, triggering ERK phosphorylation and ROS and NO generation and, ultimately, the death of intracellular parasites (Basu et al. 2006). Stibogluconate was also found to be a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases, which leads to an increase in cytokine responses (Pathak and Yi 2001). Another study revealed that meglumine antimoniate increased the phagocytic capacity of monocytes and neutrophils and enhanced superoxide anion production by phagocytes (Muniz-Junqueira and Paula-Coelho 2008).

In search of a molecular target of Sb(V), Demicheli and co-workers (2002) evidenced its interaction with adenine ribonucleoside. This was the first report of a physiologically-relevant biomolecule capable of forming stable complexes with Sb(V). Both 1:1 and 1:2 Sb(V)-ribonucleoside complexes were evidenced (Demicheli et al. 2002, 2006, Chai et al. 2005). The large changes for H^{2'} NMR resonance

suggested that –OH groups in the ribose are the binding sites for Sb(V), probably *via* ring chelation at C2' and C3'. Figure 4 shows the structure proposed for 1:1 and 1:2 Sb-nucleoside complexes in the case of adenosine.

The complexation of Sb(V) with ribonucleosides was found to be faster at acidic pH, indicating that it is kinetically favored in acidic biological compartments (Ferreira et al. 2006, Hansen and Pergantis 2006). Another remarkable property of these complexes is their very slow dissociation rate constant in aqueous solutions at neutral pH (Ferreira et al. 2006). Since *Leishmania* is a true auxotroph for purines, purine ribonucleosides may be present in significant amounts in the parasitophorous vacuole. The value of the stability constant determined for 1:1 Sb(V)-GMP complex (Ferreira et al. 2006) is consistent with the formation of Sb(V)-ribonucleoside complexes in the vertebrate host following treatment with pentavalent antimonial drugs, especially if one considers the high accumulation and prolonged retention of antimony in macrophages (Roberts et al. 1995). With respect to the possible pharmacological role of Sb(V)-ribonucleosides complexes, several hypotheses may be raised (Ferreira et al. 2006). Such Sb(V) complexes may act as inhibitors of the *Leishmania* purine transporters (Vasudevan et al. 1998) and/or ectonucleotidases (Sansom et al. 2008) involved in the purine salvage pathway. Evidence was recently obtained that ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase exerts an important role in the virulence and infectivity of *Trypanosomatidae* parasites (Marques-da-Silva et al. 2008, Santos et al. 2009). The formation

Q7:
This is
Marques-da-Silva in the
reference
list – please
amend
one as
appropriate

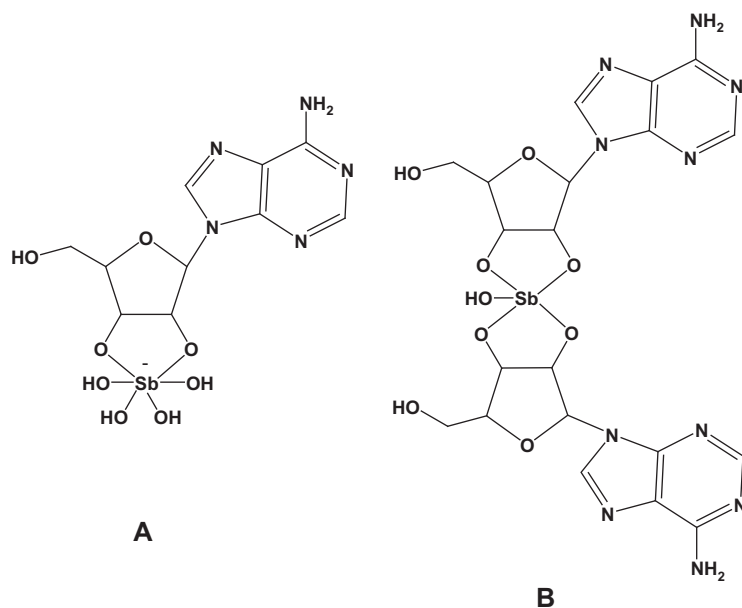


Figure 4 Structure proposed for 1:1 and 1:2 Sb(V)-adenosine complexes formed in aqueous solution, A and B, respectively.

of these complexes inside the cell may also explain the depletion of ATP and GTP, as reported previously, after exposition of the *Leishmania* parasite to sodium stibogluconate (Berman et al. 1985, 1987). This may occur due to the downstream inhibition of the purine salvage pathway, similarly to the effect of the purine analog allopurinol (Marr 1995). Alternatively, ATP depletion could be a final stage prior to cell death as a consequence of other effects, such as general inhibition of metabolism due to oxidative stress. Furthermore, the complexation of Sb(V) with RNA molecules (Hansen and Pergantis 2006) may cause interference with transcription and/or the post-transcriptional regulation of gene expression (Atayde et al. 2011). Nevertheless, the pharmacological relevance of the formation of complex(es) between Sb(V) and ribose-containing biomolecules still remains to be established.

In summary, pentavalent antimonials are likely to be promiscuous inhibitors affecting multiple processes, with pharmacological actions mediated by both oxidation states of the metal. However, the order in which these effects occur (i.e., cause or consequence) is not known and still needs to be established.

Improved synthetic processes for reduced side-effects of pentavalent antimonials

Two processes proposed in a Rhône Poulenc patent (Gailiot 1941, Joan and Concepcio 1994) for the synthesis of meglumine antimoniate start either from SbCl_5 or from SbCl_3 . In the SbCl_5 process, SbCl_5 is dissolved in chloroform at a low temperature, and the organic phase is then mixed with an aqueous solution of the ligand. In the SbCl_3 process, Sb(III) is first oxidized by H_2O_2 and the resulting Sb(V) product is mixed with NMG. Another patent describes a synthetic process starting from Sb_2O_3 , which is first oxidized to Sb(V) by H_2O_2 , for subsequent synthesis.

Other synthetic methods for preparing pentavalent organoantimonials have recently been described (Demicheli, C. Synthesis of pentavalent antimony derivatives used in the treatment of protozooses. 1999. *Brazil Patent Pending PI 9907575-0*, Demicheli, C.; Frézard, F. New process for preparing derivatives of antimony. 2001. *Brazil Patent Pending PI 0106305-7*, Demicheli et al. 2003, Morais-Teixeira et al. 2008). Two of these methods used SbCl_5 as a source of Sb(V) (Demicheli 1999, Demicheli and Frézard 2001) and another one used KSb(OH)_6 (Morais-Teixeira et al. 2008).

These methods, when compared to those previously reported in the literature, are simpler, as they require less steps and avoid the use of organic solvents (often toxic and sometimes difficult to remove).

Interestingly, the pentavalent compound obtained from KSb(OH)_6 contained <0.0015% (w/w) of residual Sb(III) (Dzamtika et al. 2006). This amount of Sb(III) was more than 10-fold lower than amounts found in the compound prepared from SbCl_5 and in different commercial lots of meglumine antimoniate (Dzamtika et al. 2006). The compounds obtained from KSb(OH)_6 and SbCl_5 were evaluated *in vitro* and *in vivo* on *L. amazonensis* infections. Although *in vitro* the most effective drugs contained the highest levels of Sb(III), no correlation was found *in vivo* between the antileishmanial activity of meglumine antimoniate and its residual Sb(III) content, suggesting that residual Sb(III) contributes only marginally *in vivo* to the drug antileishmanial activity (Dzamtika et al. 2006). Importantly, the synthetic compounds showed *in vivo* antileishmanial efficacies similar to that of the commercial drug.

It should be mentioned that even though residual Sb(III) did not affect the drug antileishmanial effectiveness, it may be responsible for some of the side effects of the pentavalent antimonial drug.

Another interesting observation is the relatively high toxicity of Sb(OH)_6^- towards mammalian cells when compared to meglumine antimoniate (Dzamtika et al. 2006, Ferreira et al. 2010). These data strongly suggest that, the complexation of Sb(OH)_6^- to meglumine and the slow dissociation of this complex, contribute to the reduced toxicity of the drug. By contrast, incomplete complexation is expected to result in more toxic drugs and this may explain why high-osmolarity lots of pentavalent antimonials exhibited high toxicity (Sundar et al. 1998).

In this context, strategies to reduce the amount of residual Sb(III) and of non-complexed Sb(V) in pentavalent antimonial drugs may result in safer treatments.

The new processes may encounter application in the industrial production of meglumine antimoniate and result in improved quality and reduced cost of the final product.

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Brazilian agencies, FAPEMIG, CAPES, CNPq and MCTI.

Received August 15, 2012; accepted January 11, 2013

Q8:
Please
check trans-
lation in the
paragraph
“Other
synthetic”

Q9:
The fol-
lowing
references
are cited in
text but not
cited in Ref.
list please
supply
Refs. details
“Demicheli
1999” and
“Demicheli
and Frézard
2001”

References

- Adai, V.; Castillo, D.; Zimic, M.; Gutierrez, A.; Decuypere, S.; Vanaerschot, M.; De Doncker, S.; Schnorbusch, K.; Maes, I.; Van der Auwera, G.; Maes, L.; Llanos-Cuentas, A.; Arevalo, J.; Dujardin, J. C. Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1021.
- Allan, J. W. *Persian Metal Technology 700-1300 A.D.*, Ithaca Press: London, U.K., 1979.
- Atayde, V.D.; Tschudi, C.; Ullu, E. The emerging world of small silencing RNAs in protozoan. *Parasites. Trends Parasitol.* **2011**, *27*, 321–327.
- Baes, C. F.; Mesmer, R. E. *The Hydrolysis of Cations*. Ed. John Wiley & Sons: New York, 1976.
- Bailar, J. C.; Emeleus, H. J.; Nyholm, R.; Trotman-Dickenson, A. F. *Comprehensive Inorganic Chemistry*. Ed. Pergamon Press: New York, 1973.
- Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603–2612.
- Basu, J. M.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S.; Sen, P.; Banerjee, S.; Naskar, K.; Choudhuri, S. K.; Saha, B.; Raha, S.; Roy, S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1788–1797.
- Basu, J. M.; Mookerjee, A.; Banerjee, R.; Saha, M.; Singh, S.; Naskar, K.; Tripathy, G.; Sinha, P.; Pandey, K.; Sundar, S.; Bimal, S.; Das, P. K.; Choudhuri, S. K.; Roy, S. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1080–1093.
- Berman, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, 684–703.
- Berman, J. D.; Grogl, M. *Leishmania mexicana*: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). *Exp. Parasitol.* **1988**, *67*, 96–103.
- Berman, J. D.; Waddell, D.; Hanson, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 916–920.
- Berman, J. D.; Gallalee, J. V.; Best, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 197–201.
- Bhandari, D.; Guha, K.; Bhaduri, N.; Saha, P. Ubiquitination of mRNA cycling sequence binding protein from *Leishmania donovani* (LdCSBP) modulates the RNA endonuclease activity of its Smr domain. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 809–813.
- Biyani, N.; Singh, A. K.; Mandal, S.; Chawla, B.; Madhubala, R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *179*, 91–99.
- Brochu, C.; Wang, J.; Roy, G.; Messier, N.; Wang, X. Y.; Saravia, N. G.; Ouellette, M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3073–3079.
- Burguera, J. L.; Burguera, M.; Petit de Pena, Y.; Lugo, A.; Anez, N. Selective determination of antimony(III) and antimony(V) in serum and urine and of total antimony in skin biopsies of patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Trace Elem. Med.* **1993**, *10*, 66–70.
- Callahan, H. L.; Beverley, S. M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18427–18430.
- Chai, Y.; Yan, S.; Wong, I. L. K.; Chow, L. M. C.; Sun, H. Complexation of antimony [Sb(V)] with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-D-mannose: formation of both mono and bis-adducts. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2257–2263.
- Chakraborty, A. K.; Majumder, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *152*, 605–611.
- Clayton, C.; Shapira, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *156*, 93–101.
- Coelho, A. C.; Beverley, S. M.; Cotrim, P. C. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 83–90.
- Cole, A. C. E. Kala-azar in east Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1944**, *37*, 409–435.
- Cook, C. Leonard Rogers KCSI FRCP FRS (1868–1962) and the founding of the Calcutta School of Tropical Medicine. *Notes Rec. R. Soc.* **2006**, *60*, 171–181.
- Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 460–468.
- Demicheli, C.; Frézard, F.; Lecouvey, M.; Garnier-Suillerot, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1570*, 192–198.
- Demicheli, C.; Ochoa, R.; Lula, I. S.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M.; Frézard, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate. *Applied Organomet. Chem.* **2003**, *17*, 226–231.
- Demicheli, C.; Santos, L. S.; Ferreira, C. S.; Bouchemal, N.; Hantz, E.; Eberlin, M. N.; Frézard, F. Synthesis and characterization of Sb(V)-adenosine and Sb(V)-guanosine complexes in aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 159–167.
- Demicheli, C.; Frézard, F.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. *Chem. Commun.* **2008**, *39*, 4828–4830.
- Denton, H.; McGregor, J. C.; Coombs, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 405–412.
- Depts, P. D.; Viana, M. C.; Falqueto, A.; Dietze, R. Comparative evaluation of efficacy and toxicity of antimoniate N-methylglucamine and sodium stibogluconate BP88 for the treatment

Q10:
Please
supply
editor name
for Refs.
“Baes (1976)
and Bailar
(1973)”

Q11:
Please
check trans-
lation of
the title for
Refs. “Depts
(2000)”

- Q12: Please translate the title for refs. "Di Cristina (1915), Gailiot (1941), Jander (1962), Lefebvre (1963) and Vianna (1912)"
- of localized cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2000**, *33*, 535–543.
- Di Cristina, G.; Caronia, G. Sulla terapia della leishmaniosi interna. *Pathologica.* **1915**, *7*, 82–83.
- Duffin, J.; René, P. Anti-moine; Anti-biotique. The public fortunes of the secret properties of antimony potassium tartrate (tartar emetic). *J. Hist. Med. Allied Sci.* **1991**, *46*, 440–456.
- Dzamtika, S. A.; Falcão, C. A.; Oliveira, F. B.; Marbeuf, C.; Garnier-Suillerot, A.; Demicheli, C.; Rossi-Bergmann, B.; Frézard, F. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. *Chem. Biol. Int.* **2006**, *160*, 217–224.
- Estes, J. W. *The Medical Skills of Ancient Egypt*; Science History Publications: Canton, MA, 1989.
- Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 695–729.
- Ferreira, C. S.; Martins, P. S.; Demicheli, C.; Brochu, C.; Ouellette, M.; Frézard, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals* **2003**, *16*, 441–443.
- Ferreira, C. S.; Pimenta, A. M. C.; Demicheli, C.; Frézard, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. *Biometals* **2006**, *19*, 573–581.
- Ferreira, C. S.; da Rocha, I. C. M.; Neto, R. L. M.; Melo, M. N.; Frézard, F.; Demicheli, C. Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of sbv-ribonucleoside complexes. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1258–1265.
- Filella, M.; May, P. M. Computer simulation of the low-molecular-weight inorganic species distribution of antimony(III) and antimony(V) in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 4013–4031.
- Franco, M. A.; Barbosa, A. C.; Rath, S.; Dorea, J. G. Antimony oxidation-states in antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *52*, 435–437.
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Ferreira, C. S.; Costa, M. A. P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 913–916.
- Frézard, F.; Martins, P. S.; Barbosa, M. C. M.; Pimenta, A. M. C.; Ferreira, W. A.; de Melo, J. E.; Mangrum, J. B.; Demicheli, C. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 656–665.
- Frézard, F.; Silva, H.; Pimenta, A. M. C.; Farrell, N.; Demicheli, C. Greater binding affinity of trivalent antimony to a CCCH zinc finger domain compared to CCHC domain of kinetoplastid proteins. *Metallomics* **2012**, *4*, 433–440.
- Fyfe, P. K.; Westrop, G. D.; Silva, A. M.; Coombs, G. H.; Hunter, W. N. *Leishmania* TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11693–11698.
- Gailiot, P. L. Procédé de préparation de dérivés de l'antimoine. Société des usines chimiques de Rhone-Poulenc. **1941**. *FR Patent 8.687.47*.
- Gainey, D.; Short, S.; McCoy, K. L. Intracellular location of cysteine transport activity correlates with productive processing of antigen disulfide. *J. Cell Physiol.* **1996**, *168*, 248–254.
- Goodwin, L. C.; Page, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* **1943**, *22*, 236–240.
- Gourbal, B.; Sonuc, N.; Bhattacharjee, H.; Legare, D.; Sundar, S.; Ouellette, M.; Rosen, B. P.; Mukhopadhyay, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31010–31017.
- Guerin, P. J.; Olliaro, P.; Sundar, S.; Boelaert, M.; Croft, S. L.; Desjeux, P.; Wasunna, M. K.; Bryceon, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 494–501.
- Hansen, H. R.; Pergantis, S. A. Mass spectrometric identification and characterization of antimony complexes with ribose-containing biomolecules and an RNA oligomer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 821–833.
- Hansen, H. R.; Hansen, C.; Jensen, K. P.; Hansen, S. H.; Sturup, S.; Gammelgaard, B. Characterization of sodium stibogluconate by online liquid separation cell technology monitored by ICPMS and ESMS and computational chemistry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5993–6000.
- Hansen, C.; Hansen, E. W.; Hansen, H. R.; Gammelgaard, B.; Stürup, S. Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 234–243.
- Headley, J. V.; Yong, M. S.; Brooks, P. W.; Phillips, A. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonite. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 372–376.
- Jander, G.; Ostmann, H.-J. 1962. Über die Sauerstoffsäuren des Antimon(V). II. Elektrochemische Titrationen. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1962**, *315*, 250–258.
- Joan, F. B.; Concepcio, M. C. New procedure for the preparation of antimoniac acid derivatives applicable in the treatment of canine leishmaniosis. **1994**. *ES Patent 2.050.614*.
- Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1236–1248.
- Lai, W. S.; Kennington, E. A.; Blackshear, P. J. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9606–9613.
- Lefebvre, J.; Maria, H. Étude des équilibres dans les solutions récentes de polyantimoniates. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1963**, *256*, 3121–3124.
- Légaré, D.; Richard, D.; Mukhopadhyay, R.; Stierhof, Y. D.; Rosen, B. P.; Haimeur, A.; Papadopoulou, B.; Ouellette, M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26301–26307.
- Leon, O.; Roth, M. Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. *Biol. Res.* **2000**, *33*, 21–30.
- Lucumi, A.; Robledo, S.; Gama, V.; Saravia, N. G. Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1990–1995.

- Lukaszczyk, L.; Zyrnicki, W. Speciation analysis of Sb(III) and Sb(V) in antileishmaniotic drug using Dowex 1×4 resin from hydrochloric acid solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *52*, 747–751.
- Marques-da-Silva, E. A.; De Oliveira, J. C.; Figueiredo, A. B.; Júnior, D. S. L.; Carneiro, C. M.; Fietto, J. L. R.; Afonso, L. C. C. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 850–857.
- Marr, J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *J. Lab. Clin. Med.* **1995**, *118*, 111–119.
- Marsden, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1985**, *18*, 187–198.
- Mego, J. L. Stimulation of intralysosomal proteolysis by cysteinyl-glycine, a product of the action of gamma-glutamyl transpeptidase on glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *841*, 139–144.
- Monte-Neto, R. L.; Coelho, A. C.; Raymond, F.; Légaré, D.; Corbeil, J.; Melo, M. N.; Frézard, F.; Ouellette, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1167.
- Morais-Teixeira, E.; De Carvalho, A. S.; Da Costa, J. C. S.; Duarte, S. L.; Mendonça, J. S.; Boechat, N.; Rabello, A. *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farman-guinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *10*, 358–362.
- Mukherjee, S. B.; Das, M.; Sudhandiran, G.; Shaha, C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24717–24727.
- Mukhopadhyay, R.; Dey, S.; Xu, N.; Gage, D.; Lightbody, J.; Ouellette, M.; Rosen, B. P. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10383–10387.
- Muniz-Junqueira, M. I.; Paula-Coelho, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 1633–1638.
- Murray, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2185–2197.
- Nakano, H.; Ozawa, Y.; Yagasaki, A. Synthesis and characterization of the first polyantimonate, [Sb₈O₁₂(OH)₂₀]⁴⁻. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12007–12008.
- Oliveira, F. B.; Schettini, D. A.; Ferreira, C. S.; Rates, B.; Rocha, O. G. F.; Frézard, F.; Demicheli, C. Kinetics of antimony(V) reduction by L-cysteine. Pharmacological implications and application to the determination of antimony in pentavalent antimonial drugs. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1642–1650.
- Ouellette, M.; Fowler, F.; Borst, P. The amplified H circle of methotrexate resistant *Leishmania tarentoleae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1027–1033.
- Ouellette, M.; Drummelsmith, J.; Papadopoulou, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* **2004**, *7*, 257–266.
- Papadopoulou, B.; Roy, G.; Dey, S.; Rosen, B. P.; Ouellette, M. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein-related gene *ltgpA* to oxanion resistance. *J. Biol. Chem.* **1994**, *22*, 269, 11980–11986.
- Pathak, M. K.; Yi, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 3391–3397.
- Perry, M. R.; Wyllie, S.; Prajapati, V. K.; Feldmann, J.; Sundar, S.; Boelaert, M.; Fairlamb, A. H. Visceral leishmaniasis and arsenic: an ancient poison contributing to antimonial treatment failure in the Indian subcontinent?. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1227.
- Pitman, A. L.; Pourbaix, M.; de Zoubov, N. Potential-pH diagram of the antimony-water system. Its applications to properties of the metal, its compounds, its corrosion, and antimony electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **1957**, *104*, 594–600.
- Plimmer, H. G.; Thomson, J. D. Further results of the experimental treatment of trypanosomiasis in rats; being a progress report of a committee of the Royal Society. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **1908**, *80*, 1–10.
- Roberts, W. L.; Rainey, P. M. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1842–1846.
- Roberts, W. L.; Berman, J. D.; Rainey, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1234–1239.
- Roberts, W. L.; McMurray, W. J.; Rainey, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1076–1082.
- Rogers, M. B.; Hilley, J. D.; Dickens, N. J.; Wilkes, J.; Bates, P. A.; Depledge, D. P.; Harris, D.; Her, Y.; Herzyk, P.; Imamura, H.; Otto, T. D.; Sanders, M.; Seeger, K.; Dujardin, J.-C.; Berriman, M.; Smith, D. F.; Hertz-Fowler, C.; Mottram, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* **2011**, *21*, 2129–2142.
- Sansom, F. M.; Robson, S. C.; Hartland, E. L. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 765–768.
- Santos, R. F.; Possa, M. A.; Bastos, M. S.; Guedes, P. M.; Almeida, M. R.; Demarco, R.; Verjovski-Almeida, S.; Bahia, M. T.; Fietto, J. L. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e387, 1–9.
- Savage-Smith, E. *Dioscorides on Pharmacy and Medicine*. Ed. In J. M. Riddle, University of Texas Press: Austin, 1985, pp. 96–97.
- Sereno, D.; Holzmüller, P.; Mangot, I.; Cuny, G.; Ouassiss, A.; Lemesre, J. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2064–2069.
- Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel intracellular Sb(V) reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3971–3976.
- Steck, E. A. The leishmaniasis. *Prog. Drug Res.* **1974**, *18*, 289–351.
- Sterkers, Y.; Lachaud, L.; Bourgeois, N.; Crobu, L.; Bastien, P.; Pagès, M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 15–23.

- Sudhandiran, G.; Shaha, C. Antimonial induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25120–25132.
- Sun, H.; Yan, S. C.; Cheng, W. S. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5450–5457.
- Sundar, S.; Sinha, P. R.; Agrawal, N. K.; Srivastava, R.; Rainey, P. M.; Berman, J. D.; Murray, H. W.; Singh, V. P. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolality lot of sodium antimony gluconate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *59*, 139–143.
- Vasudevan, G.; Carter, N. S.; Drew, M. E.; Beverley, S. M.; Sanchez, M. A.; Seyfang, A.; Ullman, B.; Landfear, A. M. Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9873–9878.
- Vianna, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *7º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, Brasil, **1912**, *4*, 426–428.
- Walker, J.; Saravia, N. G. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J. Parasitol.* **2004**, *90*, 1155–1162.
- Webb, J. R.; McMaster, W. R. Molecular cloning and expression of a *Leishmania major* gene encoding a single-stranded DNA-binding protein containing nine “CCHC” zinc finger motifs. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13994–14002.
- World Health Organization, <http://www.who.int/tdr/diseases/leish>. (accessed August 15, 2012).
- Wyllie, S.; Fairlamb, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 257–267.
- Wyllie, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39925–39993.
- Wyllie, S.; Vickers, T. J.; Fairlamb, A. H. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1359–1365.
- Wyllie, S.; Mandal, G.; Singh, N.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H.; Chatterjee, M. Elevated levels of tryparedoxin peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *173*, 162–164.
- Yan, S. C.; Li, F.; Ding, K. Y.; Sun, H. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 689–697.
- Yan, S.; Jin, L.; Sun, H.; Gielen; E. R. T. Sb antimony in Medicine. In *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*; 1st Edition. Ed. John Wiley & Sons: New York, USA, 2005, pp. 441–461.
- Zhou, Y.; Messier, N.; Ouellette, M.; Rosen, B. P.; Mukhopadhyay, R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37445–37451.

Q13:
Please
supply
editor
name for
“Yan et al.
(2005)”