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

Rodrigo Rodrigues Victor de Carvalho

Quelantes Bifuncionais para o Tratamento de
Neurodisfunções Associadas ao Ferro

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/04/2019

RODRIGO RODRIGUES VICTOR DE CARVALHO

**Quelantes Bifuncionais para o Tratamento de
Neurodisfunções Associadas ao Ferro**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo

2019

Dedicatória

A minha esposa, Leidaiany Pereira dos Santos,

Pela paciência,

Pelo carinho,

Pelo apoio,

Te gosto tanto.

Amo você meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, mesmo nos momentos mais sombrios, sempre me fortaleceu para superar as mais difíceis batalhas. Louvado seja o seu nome para agora e para sempre. Amém.

À minha esposa Leidaiany, que desde 16 de maio de 2008, arranca sorrisos dos meus lábios e semeia alegrias em meu coração. Sempre compartilhamos tudo desde a graduação e essa cumplicidade, construiu essa relação repleta de amor que temos um pelo outro. Sabemos o que passamos nestes 4 anos e saiba que este trabalho jamais teria sido desenvolvido com sucesso sem você amor. Te amo.

Ao meu Orientador, Amigo e a pessoa mais humana que conheci durante toda minha jornada acadêmica, **Prof. Dr. Breno Pannia Espósito**, pela orientação, confiança, dedicação e paciência. Pela oportunidade de desenvolver meu trabalho e evoluir conhecimentos e habilidades em seu laboratório. Toda a liberdade dada a mim, ajudou-me a crescer e a auto-conhecer como Químico e Cientista. Nestes 4 anos, aprendi com você que o valor da amizade, vai muito além dos muros da Universidade. Jamais esquecerei o que fez por mim.

A todos os amigos que fiz no **LAQBAM**: Jéssica Espósito, Yesenia Pastrana Alta, Hector Aguilar Vitorino, Bárbara de Castro Lopes, Aline Cristina, Gabriel Souto da Silva, Fredson Torres Silva, Alejandro Garcia Ríos, José Miguel Díaz Romero, Luca Michael Sihn, Lucas Antonio Arias Correia. Em especial a Jesus Alvarado e Faiz Ahmed, pelas conversas e momentos de descontração.

À Fabiane Capraro Fogo por todo suporte para compra de materiais e assistência para desenvolvimento deste trabalho, pela sua amizade, por sempre ouvir meus desabafos, pelas risadas e momentos divertidos. Sentirei saudades.

À **Profa. Dra. Maria Teresa Machini** e ao **Dr. Cleber Wanderlei Liria** pelos ensinamentos, suporte no processo de caracterização e purificação dos conjugados. Em especial, a Teresa, por ser além de uma parceira de trabalho, uma amiga e motivadora.

À **Profa. Dra. Liliana Marzorati** e **Prof. Dr. Marcio Henrique Zaim** pelos ensinamentos no laboratório de Catálise e Transferência de Fase. Aprendi com vocês, outro olhar sobre a Química Orgânica e como ela pode ser intrigante e ao mesmo tempo divertida.

Ao **Prof. Dr. Henrique Eisi Toma**, **Prof. Dr. Vitor de Moraes Zamarion**, e à **Roberta Mansini Cardoso** por mostrarem durante meu estágio no PAE, o quão fascinante é a Química de Coordenação.

Ao **Dr. Michael Aschner** (*Pharmacology Department – Albert Einstein College of Medicine New York City – USA*) pela oportunidade dada em seu laboratório para testar meus compostos, pela compreensão, pelo seu apoio, orientação e discussões. Trabalhar com você foi uma aventura inesquecível.

A todos os membros e amigos que fiz no grupo de pesquisa do Dr. Aschner: Patricia Morcillo Garcia, Beatriz Ferrer Villahoz, e em especial aos Brazucas Felipe Marques Gonçalves, Cinara Ludvig Gonçalves e Tanara Vieira Peres por toda orientação, assistência, suporte e preocupação durante os 6 meses que estive em Nova York. Nos caminhos da vida, não se encontram todos os dias, pessoas especiais. Espero reencontrá-los futuramente. Vocês tem a minha eterna gratidão

À Lourdes, Rhomina Carrasco e família pelo acolhimento. Estar com vocês durante estes 6 meses me fizeram refletir que fazer parte de uma família, vai muito além de laços de sangue. Quando cheguei aos EUA, estava cheio de tristezas, dúvidas, angústias, incertezas mas vocês tornaram meu processo de adaptação mais leve. Me fizeram sentir como um verdadeiro New Yorker, sinto falta das nossas conversas e dos bolos inesquecíveis da Lourdes. Um dia, retornarei para Nova York para revê-los.

Ao suporte financeiro fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa, e oportunidade de realizar meu Doutorado Sanduíche, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A quem eu esqueci,
Muito Obrigado!

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam”.

Salmos 23:4

“Na vida não existe nada a temer, mas a entender”.

Marie Curie/

“A imaginação muitas vezes nos leva a mundos que nunca sequer existiram. Mas sem ela, não vamos a lugar nenhum.

Carl Sagan

“By treating one, we can change the lives of millions”

Autor desconhecido

RESUMO

Carvalho, R.R.V. **Quelantes Bifuncionais para o Tratamento de Neurodisfunções Associadas ao Ferro**. 2019. 166p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ferro é o metal de transição mais abundante da Terra. Quando se encontra na presença de substratos biológicos como o peróxido, Fe(II) o reduz ao radical hidroxila através da reação de Fenton. Os riscos associados a desordens neurodegenerativas aumentam devido à presença das espécies reativas de oxigênio, em alguns casos geradas por intermédio de reações com ferro. Uma das desordens mais graves entre estas é a Doença de Alzheimer (DA). Diferentes fármacos foram desenvolvidas ao longo dos anos para tratamento da DA. O tratamento da sobrecarga de Fe é baseado na terapia de quelação. Um dos quelantes amplamente empregados é a desferrioxamina (DFO). Nos últimos anos, um novo paradigma tem surgido na química medicinal, a estratégia MTDL (*Multiple- target- directed ligand*; ligante direcionado a múltiplos alvos). Propomos neste trabalho a conjugação de diferentes aminas aromáticas inspiradas em moléculas anti-Alzheimer com DFO, a fim de melhorar as propriedades farmacológicas deste quelante. Os novos quelantes, conjugados de DFO com anilina (DFOANI), benzosulfanilamida (DFO-BAN), 2-aminonaftaleno (DFONAF) e 6-aminoquinolina (DFOQUN) foram obtidos. DFOQUN apresenta atividade quelante comparável à da DFO, enquanto os demais conjugados parecem menos eficientes. Ensaio antioxidante com dihidrorodamina (DHR) mostra que os conjugados (exceto DFONAF) apresentam comportamento similar ao da DFO, o que era esperado em função do ambiente de coordenação envolvido. DFOQUN promoveu significativo aumento de inibição de agregação de beta amiloide (β A) quando comparado com DFO, devido ao anel quinolínico em sua estrutura. Estudos com a enzima acetilcolinesterase (AChE) realizados *in vitro* e *in vivo* (*Caenorhabditis elegans*) mostraram que a atividade de AChE decaiu na presença de DFOQUN. Estudos comportamentais demonstraram aumento no número de curvaturas dos vermes tratado com Fe na presença de DFO e DFOQUN. Além disso, verificou-se aumento de permeabilidade celular de DFOQUN e DFOANI comparado com DFO, sem decaimento da viabilidade dos conjugados na presença de Fe. Concluímos que DFOQUN demonstra características importantes como novo candidato a fármaco anti-DA.

Palavras-chave: desferrioxamina, conjugação, ferro, doença de alzheimer, acetilcolinesterase, amiloide

ABSTRACT

Carvalho, R.R.V **Bifunctional Chelators for the Treatment of Neurodysfunctions Associated with Iron**. 2019. 166p. Thesis (PhD) – Graduation in Chemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

Iron is the most abundant transition metal on Earth. In the presence of biological substrates such as peroxide, Fe(II) generates hydroxyl radical through the Fenton reaction. The risks associated with neurodegenerative disorders increase due to the presence of reactive oxygen species, in some cases catalyzed by iron. One of the most serious disorders among these is Alzheimer's Disease (AD). Different drugs have been developed over the years for the treatment of AD. The treatment of iron overload is based on chelation therapy. One of the widely used chelators is desferrioxamine (DFO). In recent years, a new paradigm has emerged in medicinal chemistry, the MTDL (Multiple Target-directed ligand) strategy. We propose in this work the conjugation of different aromatic amines inspired in anti-Alzheimer molecules with DFO to improve the pharmacological properties of this chelator. The novel chelators, DFO conjugate with aniline (DFOANI), benzosulfanilamide (DFOBAN), 2-naphtylamine (DFONAF) and 6-quinolinamine (DFOQUN) were obtained. DFOQUN has comparable chelating activity to that of DFO, while the other conjugates appear to be less efficient. Antioxidant tests with dihydrorhodamine (DHR) showed that, except for DFONAF, the conjugates exhibit similar behavior as DFO, due to the coordination environment involved. DFOQUN promoted a significant increase in inhibition of beta amyloid ($A\beta$) aggregation when compared to DFO, because of the quinoline ring in its structure. Studies with the enzyme acetylcholinesterase (AChE) performed *in vitro* and *in vivo* (*Caenorhabditis elegans*) showed that AChE activity declined in the presence of DFOQUN. Behavioral studies showed an increase in the number of bends of the worms treated with Fe in the presence of DFO and DFOQUN. In addition, increased cell permeability of DFOQUN and DFOANI compared to DFO was observed, without decreased cell viability caused by the conjugates in the presence of Fe. We conclude that DFOQUN showed important characteristics for a new anti-AD drug candidate.

Keywords: desferrioxamine, conjugation, iron, Alzheimer's Disease, acetylcholinesterase, β -amyloid

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE: *acetylcholinesterase*, acetilcolinesterase

ACN: Acetonitrila

ACh: *acetylcholine*; acetilcolina

APP: *amyloid precursor protein* ; proteína precursora do amiloide

AP: *Acyl pocket*;sítio de ligação acila;

βA: *Amyloid Beta*;peptídeo β- amiloide

CAS: *catalytic anionic site*; sitio catalítico aniônico

CAL: Calceína

CAL-AM: acetometoxicalceína

CAFe :Complexo calceína-ferro

CSF: *cerebrospinal fluid* ;fluido cerebrospinal

CNS: *central nervous system*; sistema nervoso central

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

DA: Doença de Alzheimer

Dcytb: *duodenal cytochrome B*, citocromo B duodenal

DMT1: *divalent metal ion transporter 1*, transportador metálico divalente 1

DTPA: Ácido Pentético

DIPEA: Diisopropilamina

DFO: Desferrioxamina

DFOANI: Conjugado de Desferrioxamina com anilina

DFOBAN: Conjugado de Desferrioxamina com benzosulfanilamida

DFONAF: Conjugado de Desferrioxamina com 2-aminonaftaleno

DFOQUN: Conjugado de Desferrioxamina com 6-aminoquinolina

DHR: Diidrorodamina

DMSO Dimetilsulfóxido

DMF: Dimetilformamida

DPPH:2,2 – difenil-1-picril-hidrazila

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida –

Fpn: *ferroportin* ,ferroportina

FDA: *Food and drug administration*

FAS: Sulfato ferroso amoniacal -

HOBt: 1-Hidroxibenzotriazol

HBS: *Hepes Buffered Saline*; tampão salino hepes

Hp: *Hephaestin*; Hefaestina

LIP: *labile Iron pool*, reservatório de ferro labil

LPI: *labile plasma iron*,ferro lábil plasmático

LC-ESI/MS: Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

MRI: *magnetic ressonance images*; Ressonância magnética de imagens

MTDL: *multiple-target-directed ligands*; ligantes direcionados a múltiplos alvos

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NTBI: *non-transferrin-bound iron*, ferro não-ligado à transferrina

NTA: Nitrilotriacetato de sódio

PBS: *phosphate buffered saline*; tampão salino fosfato

PAS: *peripheral anionic site*; sítio aninônico periférico

PNS: *peripheral nervous system* ;sistema nervoso periférico

Tf: *transferrin*, transferrina

ThT: *thioflavin T*; Tioflavina T

TLC: cromatografia de camada delgada

ROS - *reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

Rf – fator de retenção

SOD: superóxido dismutase

TFA: Ácido Trifluoro Acético

8HQ: 8-Hidroxiquinolina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Materiais (reagentes, solventes e kits) utilizados.	46
Tabela 2 - Diferentes proporções metal-ligante utilizadas neste estudo.....	57
Tabela 3 - Massa molar e os respectivos picos dos íons moleculares dos compostos	76
Tabela 4 - Temperatura de fusão dos ácidos carboxílicos	78
Tabela 5 - Rendimento percentual das reações para obtenção dos ácidos carboxílicos	79
Tabela 6 - Massa molar e os respectivos picos dos íons moleculares dos conjugados.....	82
Tabela 7 - Dados de Análise Elementar (%CHN) dos Conjugados, o limite de variação é 0,4%. teor. = teórico, exp. = experimental, Δ = diferença entre o valor teórico e experimental	83
Tabela 8 - Comparativo entre as fórmulas moleculares teóricas e experimentais dos conjugados.	84
Tabela 9 - Temperatura de fusão dos conjugados. *Desferrioxamina apresenta ponto de fusão entre 138-140°C ⁷⁴	86
Tabela 10 - Rendimento percentual das reações para obtenção dos conjugados	86
Tabela 11 - Quelantes de Ferro e os valores correspondentes ao log P.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do ferro no corpo humano ⁴	26
Figura 2 - Passagem do Ferro através do trato gastrointestinal até ser coordenado pela transferina. Legenda: DMT1 (Transportador metálico divalente 1), Ft (ferritina) Tf (transferrina), Hp (Hefestina), Dcytb (citocromo B duodenal), Fpn (ferroportina), LIP (<i>labile iron pool</i>) ³	27
Figura 3 - Tranferrina ligada ao íon Fe(III) ⁵	28
Figura 4 - Professor Alois Alzheimer (1864-1915), neuropatologista alemão responsável pela descoberta da Doença de Alzheimer ¹⁵	30
Figura 5 - Processamento proteolítico da APP. As vias amiloidigênica e não amiloidigênica são definidas pela ação das secretases ¹⁹	32
Figura 6 - Secretases clivam a APP no exterior celular, gerando monômeros que se agregam formando fibrilas e sequencialmente formam as placas senis provocando morte neuronal ¹⁹	33
Figura 7 - Imagens dos metais Fe (a), Cu (b) e Zn (c) presentes da região do hipocampo de camundongos APP/PS1 obtidas por meio de Fluorescência de raios- X. Espectros de fluorescência correspondem a cada pixel de imagem, originando mapas elementais, processados através do programa Fuji ²⁴	34
Figura 8 - Concentração de β A no CSF de paciente saudáveis (alta ferritina) e com DA (baixa ferritina) ²⁵	35
Figura 9 - Hidrólise da acetilcolina pela AChE ²⁷	35
Figura 10 - Ilustração dos sítios de ligação da AChE ²⁸	36
Figura 11 - Estruturas dos inibidores de AChE utilizados no tratamento clínico da DA ²⁹ . *FDA - <i>Food and Drug Administration</i>	37
Figura 12 - Quelantes de uso clínico para o tratamento da sobrecarga de Ferro.	39
Figura 13 - Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> ⁴¹	41
Figura 14 - Aminas aromáticas escolhidas para conjugação com DFO	43
Figura 15 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(fenilamino)butanóico	49
Figura 16 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-((sufamoilfenil)amino)butanóico	49

Figura 17 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(naftalen-2-fenilamino)butanóico	50
Figura 18 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(quinolin-6-fenilamino)butanóico.....	51
Figura 19 - Síntese dos conjugados de DFO.....	52
Figura 20 - Estrutura dos conjugados de DFO.....	53
Figura 21 - Supressão e recuperação de fluorescência da calceína na presença de ferro e conjugados. A - Fluorescência inicial, B - Supressão de fluorescência na presença de ferro, C- Estabilização de fluorescência após adição de ferro, neste ponto, adiciona-se o conjugado, D- Recuperação e estabilização de fluorescência após adição do conjugado ⁵	56
Figura 22 - Oxidação da sonda DHR. (a) Com a concentração de ferro fixa, variou-se a concentração do quelante, observando redução da fluorescência. (b) A taxa de oxidação diminui com o aumento da concentração do quelante que provoca redução da geração de ROS.	59
Figura 23 - Preparação das placas Petri	61
Figura 24 - "Shank" entre duas placas Petri. Este procedimento consiste em retirar um pedaço do meio colonizado pelos vermes e coloca-lo em uma nova placa em posição invertida. A nova placa deve ser monitorada diariamente para se verificar o aparecimento de ovos.	62
Figura 25 - Esquema geral da sincronização	63
Figura 26 - Ovos permanecem na superfície da solução de sacarose devido a sua menor densidade. Eles são transferidos para outro tubo falcon para lavagem. ..	64
Figura 27 - Esquema geral do ensaio de letalidade.....	65
Figura 28 - Cálculo de especiação usando software CHEAQS NEXT	66
Figura 29 - Extração da AChE dos nematóides para determinação da atividade da enzima com Amplex Red	68
Figura 30 - Locomoção do <i>C. elegans</i> mediado pelo seu sistema motor.	69
Figura 31 - Esquema geral do estudo comportamental de <i>C.elegans</i>	70
Figura 32 - Saída de uma molécula de água através de uma segmentação α no composto A. O mesmo perfil de fragmentação ocorre com os outros ácidos carboxílicos aromáticos sintetizados ⁶⁸	77

Figura 33 - Fatores de retenção dos ácidos carboxílicos sintetizados. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido acético (85:10:5).....	77
Figura 34 - Mecanismo da reação explicando a formação dos ácidos carboxílicos ⁶⁹	80
Figura 35 - Padrão de fragmentação dos conjugados de DFO ⁷³	83
Figura 36 - Fatores de retenção dos conjugados sintetizados. Eluente: clorofórmio:metanol (80:20)	85
Figura 37 - Mecanismo que descreve a formação dos conjugados de DFO ⁶⁹	88
Figura 38 - Complexação da Sonda Calceína com Fe(III) ⁷⁵	89
Figura 39 - Fluorescência da sonda calceína após 1 hora na ausência de Ferro. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N = 2 experimentos realizados em duplicata.....	90
Figura 40 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 30 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N = 2 experimentos realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%	90
Figura 41 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 60 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N=2 realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%	91
Figura 42 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 120 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N = 2 realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%	92
Figura 43 - Espectros UV-VIS de DFO e seus conjugados (0,5 mM em 30% DMSO)	95
Figura 44 - Espectros eletrônicos dos complexos (0,5mM em 30% DMSO). A banda de formação do complexo se encontra em 430 nm.	96
Figura 45 - Curvas de calibração para DFO e conjugados (30% em DMSO)	97

Figura 46 - Estudo da estequiometria dos complexos formados entre Ferro e (a) DFO, (b) DFOANI variando-se o nº de mol de cada reagente. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata, o percentual de DMSO é igual a 30%. As cores azul e laranja correspondem a duas retas, cada qual com seu próprio r quadrado e linearidade. Quanto maior a linearidade, menor o erro associado a determinação da razão estequiométrica dos complexos. 100

Figura 47 - - Estudo da estequiometria dos complexos formados entre Ferro e (a) DFOBAN, (b) DFOQUN variando-se o nº de mol de cada reagente. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata, o percentual de DMSO é igual a 30%. As cores azul e laranja correspondem a duas retas, cada qual com seu próprio r quadrado e linearidade. Quanto maior a linearidade, menor o erro associado a determinação da razão estequiométrica dos complexos. 101

Figura 48 - Oxidação do DHR (não-fluorescente) a rodamina (fluorescente) na presença de Fe(III)e ascorbato 102

Figura 49 - Atividade antioxidante de DFO e seus conjugados contra a oxidação de ascorbato catalisada por ferro. Fe(NTA) = 2 µM, Ascorbato = 40 µM, DHR = 50 µM. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicata (O percentual final de DMSO é igual a 5%). 103

Figura 50 - Conversão do DPPH radicalar em sua forma não radicalar 104

Figura 51 - Atividade Antioxidante dos conjugados contra DPPH.Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicata (DPPH = 0,1mM em metanol, o percentual final de DMSO é igual a 5%). 105

Figura 52 - Ensaio de letalidade de Ferro em linhagem *C. elegans* Bristol N2. OS resultados mostram 0% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) 107

Figura 53 - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFO (2,5 µM;% DMSO igual a 0,015), (b) DFO (5 µM;% DMSO igual a 0,03); (c) DFO (10 µM;% DMSO igual a 0,06). Ferro e o quelante foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra . Os resultados mostram 0% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica

a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 109

Figura 54 - - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFOANI (5 μ M) e (b) DFONAF(5 μ M) com% DMSO igual 0,03 . Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. Os resultados mostram o% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 110

Figura 55 - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFOBAN (5 μ M) e (b) DFOQUN(5 μ M) com% DMSO igual 0,03.. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. Os resultados mostram o% de so-brevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) , NS = Não significativa 111

Figura 56 - Ensaio do Amplex red para medir a atividade da AChE⁹⁵ 113

Figura 57- Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE em 15 minutos. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,1%.. Cada barra representa representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) , NS = Não significativa 115

Figura 58 - - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE em 60 minutos. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,1%.. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) , NS = Não significativa 116

Figura 59 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE da linhagem *C. elegans* Bristol N2 em 15 minutos. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 117

Figura 60 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE da linhagem *C. elegans* Bristol N2 em 60 minutos. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 118

Figura 61 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na locomoção da linhagem *C. elegans* Bristol N2 no Tratamento 1. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 120

Figura 62 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na locomoção da linhagem *C. elegans* Bristol N2 no Tratamento 2. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa 121

Figura 63 - Supressão de fluorescência de ThT que ocorre em meio aquoso e emissão de fluorescência da sonda na presença das fibrilas do peptídeo β A¹⁸. 122

Figura 64 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na inibição de β A₁₋₄₂. A concentração de DFO, DFOQUN e Tacrina = 20 μ M, Ferro

= 2 μ M e ThT = 1 μ M com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra é representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 4 experimentos realizados em Quadruplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05), ** (p<0,01) e ***(p<0,001) , NS = Não significante 123

Figura 65 - CAL-AM (hidrofóbico) permeia membranas celulares, sofrendo hidrólise na presença de esterases, se convertendo em Calceína e emitindo fluorescência esverdeada. 124

Figura 66 - - Ensaio de Permeabilidade celular com CAL-AM. A concentração de DFO, Conjugados e SIH = 75 μ M, Fe(8HQ) = 2,5 μ M e Cal-AM = 3,1 μ M com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05), ** (p<0,01) e ***(p<0,001) , NS = Não significante 126

Figura 67 - Conversão de MTT a Formazan. O produto em forma de cristais, rompe a membrana celular, levando a morte celular, possibilitando determinação da atividade metabólica celular por espectrofotometria¹⁰⁴ 127

Figura 68 - Ensaio de Viabilidade Celular com MTT. A concentração de DFO, Conjugados e SIH = 75 μ M, Ferro = 75 μ M e MTT = 0,84 mM com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05), ** (p<0,01) e ***(p<0,001) , NS = Não significante 128

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	25
1.1 - A Importância do Ferro em Sistemas Biológicos	25
1.2 - Homeostase do Ferro	26
1.3 - Ferro e as Espécies Reativas de Oxigênio	28
1.4 –A Doença de Alzheimer	30
1.4.1 - Peptídeo β - Amilóide (β A)	31
1.4.1.1- Peptídeo β - Amilóide e a Coordenação com Ferro.....	33
1.4.2 - Acetilcolinesterase (AChE)	35
1.4.2.1 – Inibidores da AChE.....	37
1.4.3 – Quelantes de Ferro e a Estratégia dos Ligantes Direcionados a Múltiplos Alvos (MTDL)	39
1.4.4 - <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>).....	40
2- OBJETIVOS	43
2.1 - Hipóteses.....	43
2.2 – Objetivos gerais.....	43
2.3 - Objetivos específicos	44
3- PARTE EXPERIMENTAL.....	46
3.1. Materiais e Equipamentos	46
3.2 - Sínteses.....	48
3.2.1 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(fenilamino)butanóico (ROD003).....	48

3.2.2 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-((sufamoilfenil)amino)butanóico (ROD007)	49
3.2.3 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(naftalen-2-fenilamino)butanóico (ROD020)	50
3.2.4 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(quinolin-6-fenilamino)butanóico (ROD021)	50
3.2.5 - Síntese dos Conjugados de DFO.....	51
3.2.6 - -Purificação dos Conjugados de DFO.....	53
3.2.6.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)	53
3.3 – Caracterização dos Compostos Sintetizados	54
3.3.2 – Rendimento Químico	54
3.3.3 - Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	54
3.3.4 - Determinação do ponto de fusão.....	54
3.3.5 - Análise Elementar	55
3.3.6 - Análise por Espectrometria de Massas (ESI/MS) e Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS)	55
3.3.7 - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C	Erro! Indicador não definido.
3.4 - Estudos de Competição de Calceína	56
3.5 – Espectroscopia UV-Vis	57
3.6 - Método das Variações Contínuas (Job's Plot).....	57
3.7 – Estudos Anti-Oxidantes.....	58
3.7.1 – Sistema Ferro Ascorbato	58
3.7.2 - Sistema DPPH.....	59
3.8 – Experimentos usando nematóide <i>Caenorhabditis elegans</i>	60

3.8.1 – Preparação de Meio para Placas de Petri e Manutenção do Verme.....	60
3.8.2 – Sincronização	62
3.8.3 - Toxicidade Induzida por Ferro: Ensaio de Letalidade.....	64
3.8.4 - Tratamento para Sobrecarga de Ferro: Ensaio de Sobrevivência.....	65
3.8.5 - Estudo de especiação de Fe(II) com software CHEAQS NEXT	66
3.8.6 – Estudo da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) com <i>Amplex Red</i> ..	67
3.8.6.1 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em <i>C. elegans</i> (Ensaio <i>In Vivo</i>)	67
3.8.6.2 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (Ensaio <i>in Vitro</i>)	68
3.8.7 – Estudo de Análise Comportamental - <i>Body bend</i>	69
3.9 - Estudo do Efeito dos Conjugados na Agregação do Peptídeo β – Amilóide	70
3.10 – Experimentos Envolvendo Células HeLa	71
3.10.1 - Cultura Celular.....	71
3.10.2 - Estudos de Permeabilidade	71
3.10.2.1 - Permeabilidade Celular com Acetometoxi Calceína (CAL-AM)	71
3.10.2.2 – Determinação do log P utilizando software Marvin Sketch	72
3.10.3 – Estudo de Viabilidade Celular com Células HeLa	73
3.11 - Estatística	73
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1. – Síntese e Caracterização dos Ácidos Carboxílicos	75
4.1.1. - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C	75

4.1.2. - Análise por ESI/MS.	76
4.1.3. - Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	77
4.1.4. - Ponto de Fusão	78
4.1.5. - Rendimento Químico	79
4.1.6 - Mecanismo da Reação	79
4.2. - Síntese e Caracterização dos Conjugados.....	80
4.2.1 - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C	80
4.2.2- Análise por LC-ESI/MS.....	82
4.2.3 - Análise Elementar	83
4.2.4 – Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	85
4.2.5 - Ponto de fusão	86
4.2.6. - Rendimento Químico	86
4.2.7 - Mecanismo da Reação	87
4.3. - Estudos de Competição com Calceína.....	89
4.4 - Espectroscopia no Ultravioleta e Visível.....	93
4.5 - O Método das Variações Contínuas (Job's Plot).....	98
4.6 - Ensaio Anti-Oxidantes.....	102
4.6.1 - Sistema Ferro Ascorbato.....	102
4.6.2 – Sistema DPPH	104
4.7 - Toxicidade induzida por ferro: Ensaio de Letalidade	106

4.8 - Tratamento para Sobrecarga de Ferro: Ensaio de Sobrevivência.....	108
4.9 - Estudo de especiação de Fe(II) com software CHEAQS NEXT	112
4.10 - Estudo da Atividade da Acetilcolinesterase com <i>Amplex Red</i>	112
4.11 - Estudo de Análise Comportamental - <i>Body Bend</i>	119
4.12 - Estudo do Efeito dos Conjugado DFOQUN na Agregação do Peptídeo β – Amilóide	122
4.13 - Estudo Comparativo de Permeabilidade entre os Conjugados em Células HeLa e Software Marvin Sketch	124
4.14 - Estudo de Viabilidade Celular com Células HeLa.	127
5- CONCLUSÕES	130
6- PERSPECTIVAS	132
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
8- SÚMULA CURRICULAR	142
9- ANEXOS	144
A – Espectros de RMN ^1H E RMN ^{13}C	144
B - Espectros de Massa	160
C - Relatório Fornecido pelo Programa CHEAQS NEXT	165

Capítulo 1

Introdução

1- Introdução

1.1 - A Importância do Ferro em Sistemas Biológicos

Ferro é um elemento químico de número atômico 26 da tabela periódica, com configuração eletrônica $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$, considerado o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre. Existe a hipótese de que o início da química da vida na Terra seja oriunda de fontes minerais incluindo íon ferroso, sulfeto e hidrogênio¹. É considerado um elemento importante em sistemas biológicos devido à sua capacidade de agir como doador ou receptor de elétrons². Os estados de oxidação mais importantes e estáveis do ferro são o +3 (férico, $\text{Fe(III)} - 3d^5$) e +2 (ferroso, $\text{Fe(II)} - 3d^6$), cujas formas oxidada e reduzida são facilmente interconvertidas. Em solução aquosa, a presença dos íons Fe(III) ou Fe(II) , depende do potencial redox da solução. Em soluções oxidantes ou na presença de oxigênio, no caso de sistemas biológicos, ferro tende a se oxidar em Fe(III) , enquanto, em soluções redutoras ou na presença de agentes redutores, ferro tende a se reduzir em Fe(II) ³. A solubilidade do ferro também depende do pH da solução: soluções ácidas promovem a solubilização de Fe(III) , enquanto Fe(II) é mais solúvel em soluções alcalinas, e em pH neutro, Fe(II) é mais solúvel que Fe(III) ³. O potencial de redução padrão do par Fe(III)/Fe(II) em água é 0,77 V:

A reação redox indicada pela equação 1, participa de uma ampla gama de sistemas biológicos. Complexos de ferro podem mostrar uma ampla variedade de constantes de estabilidade, dependendo do estado de oxidação e do tipo de ligante. A maioria dos ligantes biológicos complexados a Fe(III) ou Fe(II) , são capazes de satisfazer quase toda gama de reações redox em sistemas biológicos (-0,5 a +0,6 V)³. Isso favorece o uso do ferro em metaloproteínas, especialmente, aquelas que utilizam oxigênio para a síntese de ATP e a redução de precursores do DNA para formação do grupo Heme¹.

1.2 - Homeostase do Ferro

A distribuição do ferro no corpo humano é ilustrada de acordo com a **Figura 1**. A quantidade total de ferro em um homem adulto varia de 3,5 – 4,0 g (50 mg/kg). Dentro do corpo humano, a maior parte do ferro (65%), se encontra na hemoglobina presente nas células vermelhas no sangue e cerca de 10%, é distribuído entre a mioglobina e metaloproteínas (enzimas e citocromos)³. Quando as células vermelhas no sangue alcançam o fim de sua vida útil, elas são recicladas pelos macrófagos reticuloendoteliais que removem o ferro do grupo heme³.

Figura 1 - Distribuição do ferro no corpo humano⁴

A maior parte do ferro presente no corpo humano é estocada no fígado. Um homem adulto pode estocar 0,5 – 1,0 g de ferro em seu fígado. Crianças recém-nascidas e mulheres menstruadas tem uma quantidade menor de ferro em estoque no fígado devido a maior necessidade de ferro de ambas e ao mesmo tempo, perda deste elemento⁴. Na gravidez, uma fração significativa do ferro total é desviada para o desenvolvimento do feto. A fração remanescente é redistribuída entre proteínas de transporte e estoque presentes em diferentes tipos de células³. Humanos consomem de 15 – 20 mg/dia de ferro em sua dieta, mas somente 1 – 2 mg/dia são

absorvidos. O teor de ferro é mantido em equilíbrio entre a sua ingestão e sua perda fisiológica (1 mg/dia para homens e 1,5 mg/dia para mulheres)³.

A entrada de ferro no nosso corpo depende da sua absorção regular no intestino, que normalmente ocorre em uma porção próxima ao duodeno. Essa parte do trato intestinal é caracterizada pela presença de células altamente polarizadas (enterócitos)³. Os enterócitos estão presentes em microvilosidades na região apical do duodeno, e se encontram conectados por junções que formam uma barreira no lúmen intestinal³. O ferro precisa superar essa barreira para entrar na circulação sanguínea (**Figura 2**). O ferro consumido na nossa alimentação se encontra normalmente na forma Fe(III) e é pouco solúvel no trato intestinal, devido a alcalinidade das microvilosidades³. Para contornar este problema, nosso corpo faz o uso de transportadores e enzimas específicas que possibilitam mudar o estado de oxidação deste elemento³.

Figura 2 - Passagem do Ferro através do trato gastrointestinal até ser coordenado pela transferina. Legenda: DMT1 (Transportador metálico divalente 1), Ft (ferritina) Tf (transferrina), Hp (Hefaestina), Dcytb (citocromo B duodenal), Fpn (ferroportina), LIP (*labile iron pool*)³

Uma dessas enzimas é a ferriredutase citocromo B duodenal (*duodenal cytochrome B*; Dcytb), que possui ascorbato como cofator, consequentemente, provocando a redução de Fe(III) em Fe(II)³. Posteriormente, Fe(II) é capturado pelo transportador metálico divalente 1 (*divalent metal ion transporter 1*; DMT1) localizado na membrana dos enterócitos e

responsável pela absorção de ferro³. O Fe(II) remanescente permanece na célula para ser usado na produção de energia e estocagem, enquanto outra fração cruza a membrana basolateral através do transportador ferroportina (*ferroportin*; Fpn) até o plasma, o que não segue até o plasma se armazena no reservatório de ferro labil (*labile iron pool*; LIP)³. Para circulação na corrente sanguínea, Fe(II) precisa ser oxidada em Fe(III) devido a sua elevada solubilidade, o que é realizado através de uma enzima chamada hefaestina (*Hephaestin*; Hp)^{3,4}. Os íons Fe(III) são rapidamente quelados (**Figura 3**) pela proteína transferrina (*transferrin*; Tf), coordenando-se por meio de um resíduo carboxilato de aspartato, resíduos fenólicos de tirosina, um íon carbonato e um grupo imidazol de histidina⁴. A função da transferrina é transportar o ferro até diferentes compartimentos no nosso organismo e o excedente é armazenado no interior das ferritinas⁵. Dentro dos enterócitos, ferro se torna parte do LIP, que é um pool de ferro quelável e redox ativo, que é transitório e funciona como uma encruzilhada no metabolismo de ferro celular³.

Figura 3 - Transferrina ligada ao íon Fe(III)⁵

1.3 - Ferro e as Espécies Reativas de Oxigênio

Em algumas condições o corpo pode encontrar-se sobrecarregado de Fe. A sobrecarga de Fe ocorre sempre que, pela razão que seja, o organismo adquire mais Fe do que o necessário para o seu funcionamento adequado. Geralmente, este acúmulo de Fe está associado a desordens como a Hemocromatose Hereditária e a Talassemia, ocorrendo em ambas, saturação da transferrina⁵. Instauram-se então os chamados reservatórios de ferro lábil, que podem

ser plasmáticos ou citossólicos. Os reservatórios plasmáticos são conhecidos como ferro não-ligado à transferrina (*Non-transferrin-bound iron*; NTBI). O NTBI plasmático circula livremente em órgãos como pâncreas, fígado, coração e cérebro prejudicando a saúde do paciente. A composição química desses reservatórios é indefinida, envolvendo espécies monoméricas ou oligoméricas de Fe com albumina, citrato, aminoácidos ou outros ligantes séricos^{6,7}. Embora o NTBI esteja associado a acumulação de Fe em tecidos provocando toxicidade, certas frações podem não estar ligadas especificamente a proteínas do plasma, não sendo redox ativas ou estarem disponíveis para serem carregadas no interior das células⁶. Devido a estas controvérsias conceituais, as formas potencialmente tóxicas com atividade redox do NTBI são definidas como ferro lábil plasmático (*labile plasma iron*; LPI)⁸.

Portanto, embora o ferro seja essencial para manutenção e funcionamento das células, provoca danos quando em excesso⁹. Quando se encontra na presença de substratos biológicos como o peróxido, Fe(II) reage reduzindo-o a radical hidroxila (OH $\cdot$) através da chamada reação Fenton (Equação 2). O ferro pode ser também reduzido pelo peróxido, gerando o ânion radical superóxido (O $_2^{\cdot-}$; Equação 3), e sua dismutação através da superóxido dismutase (SOD) regenera o peróxido, reiniciando o ciclo^{10,10}.

Os riscos associados a desordens neurodegenerativas aumentam devido à presença das espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*; ROS), que provocam oxidação de lipídeos, proteínas, DNA e RNA^{11,12}. O estresse oxidativo ocasionará um desequilíbrio quando essas espécies se acumularem nos compartimentos celulares provocando disfunção. No caso de células sensíveis como as neuronais, ROS podem levar à morte celular¹³. O cérebro é vulnerável a danos provocados pelo estresse oxidativo, devido a fatores como alto consumo de oxigênio, baixa concentração de agentes antioxidantes e a tendência a acumular metais com o tempo¹³, desenvolvendo doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer(DA).

1.4 –A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa comum que provoca demência, atingindo principalmente idosos. É uma desordem neurológica fatal que afeta mais de 36 milhões de pessoas no mundo e que até o momento não possui cura. Estima-se que este número aumente para 66 milhões em 2030 e até 115 milhões em 2050¹³. Essa doença foi descrita pela primeira vez pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer (**Figura 4**)^{14,15}. Em 25 de novembro de 1901, Alois Alzheimer recebeu em seu escritório, em Frankfurt, a visita de uma paciente chamada Auguste Denter (1850 - 1906), que apresentava sintomas atípicos como perda de memória frequente, mania de perseguição, insônia e ansiedade. Após a morte de Denter em 1906, sua autopsia revelou a presença de fibrilas em seu córtex cerebral e outras regiões do cérebro¹⁵.

Figura 4 - Professor Alois Alzheimer (1864-1915), neuropatologista alemão responsável pela descoberta da Doença de Alzheimer¹⁵

Os sintomas mais comuns em pacientes com DA são a perda de memória de curto prazo e a dificuldade de armazenar novas informações. Isso ocorre devido à morte dos neurônios nas regiões do cérebro responsáveis pelo armazenamento de novas memórias¹⁶. Além disso, os sintomas típicos de um paciente com DA são: dificuldades no planejamento ou solução

de problemas, dificuldade na execução de tarefas domésticas, confusão temporal ou espacial, problemas na fala ou escrita, mudança de humor ou de personalidade. Em estágios mais avançados da doença, o paciente precisa de ajuda para executar atividades básicas como se vestir, tomar banho, fazer suas necessidades e se alimentar. No estágio final, o paciente perde a capacidade de se comunicar, reconhecer seus familiares e se movimentar¹⁷. Nos Estados Unidos, pacientes com estágio mais avançado da doença podem custar mais de 36 milhões de dólares por ano ao governo, sendo uma das principais preocupações do sistema de saúde norte-americano¹⁷. No Brasil, o número atual de idosos é de 15 milhões de pessoas, estimando-se um aumento de 15% até 2020, apresentando 1,2 milhões de pessoas portadoras de DA¹⁸. A DA é um problema de saúde pública que, além de gerar gastos ao governo local, provoca decaimento na qualidade de vida nos pacientes e grande desgaste emocional em seus familiares. Do ponto de vista molecular, diversos fatores podem estar relacionados à DA, dentre eles, o surgimento do peptídeo β -amilóide (*Amyloid Beta*; β A) e a degradação de acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.

1.4.1 - Peptídeo β - Amilóide (β A)

A DA se caracteriza pelo depósito das placas senis e pelos emaranhados neurofibrilares no cérebro. A hipótese da cascata da amilóide implica que o acúmulo de agregados insolúveis do peptídeo β A é um dos principais componentes na patogênese e eventos posteriores da doença¹⁴. No interior de uma célula neuronal, ocorre a produção da chamada proteína precursora do amiloide (*amyloid precursor protein*; APP), que se liga a receptores presentes na parede celular do neurônio. O resíduo C-terminal do APP se encontra no espaço intracelular, enquanto no espaço extracelular, se encontra o resíduo N-terminal¹⁸. Existem duas vias em que ocorrem o processamento proteolítico da APP: a via amiloidigênica e a via não amiloidigênica (**Figura 5**). Esse processo ocorre através de enzimas chamadas secretases.

Figura 5 - Processamento proteolítico da APP. As vias amiloidigênica e não amiloidigênica são definidas pela ação das secretases¹⁹.

A via não amiloidigênica envolve a clivagem da APP pela enzima α -secretase que se liga à parede celular liberando fragmento N-terminal solúvel, nomeado como sAPP α , para o espaço extracelular¹⁹. O fragmento remanescente é clivado pela γ -secretase no domínio transmembrana (localizado entre os espaços extra e intracelular), liberando o fragmento P3 (A β_{17-42}), considerado não tóxico¹⁹. Já na via amiloidigênica, a proteólise da APP segue um caminho similar, contudo, a clivagem da APP ocorre por meio da enzima β -secretase (BACE-1) e a fração sAPP β é liberada. Essa fração é clivada pela enzima γ -secretase, e o peptídeo A β é liberado, possuindo 39-43 resíduos de aminoácidos (βA_{1-42} e βA_{1-43}). Parte do resíduo do C-terminal da APP é liberado juntamente com N-terminal, tornando βA altamente hidrofóbico e tóxico¹⁹. O resíduo βA_{1-42} é constituído por duas folhas β pregueadas ($\beta 1$ e $\beta 2$), que ao longo das fibrilas, formam um “sanduíche” que é internamente estabilizado por interações intermoleculares¹⁹. As interações iônicas (Asp23 e Lys28), forças de dispersão de London (Leu17, Phe19, Ala21, Val36 e Gly38) e ligações de hidrogênio através de resíduos de glutamato são responsáveis pela estabilização de $\beta 1$ e $\beta 2$ ¹⁹. Após liberação da APP, monômeros de βA sofrem um processo chamado fibrilização, definido como processo em que polipeptídeos saem de sua conformação convencional para estruturas de folhas β secundárias predominantes¹⁹. Isso promoverá à formação de fibrilas regulares que se agregarão originando as chamadas placas senis (**Figura 6**).

Figura 6 - Secretases clivam a APP no exterior celular, gerando monômeros que se agregam formando fibrilas e sequencialmente formam as placas senis provocando morte neuronal¹⁹.

Estima-se que o ferro seja encontrado nas placas senis com uma concentração de 1 mM. Estudos sugerem que os íons Fe(II) e Fe(III) hexacoordenados, encontram-se ligados ao βA através de resíduos de Asp, Glu e His²⁰.

1.4.1.1- Peptídeo β - Amilóide e a Coordenação com Ferro

A relação entre Fe e a agregação de βA, além do acúmulo deste metal são discutidos em estudos *in vivo* e *in vitro* descritos em trabalhos na literatura, e serão apresentados nos parágrafos a seguir.

Bush e colaboradores²¹ comprovaram o comportamento redox existente entre βA e Fe, estudando o surgimento de H₂O₂ na presença de vitamina C, Fe(II) e βA₁₋₄₂ utilizando colorimetria. Os resultados demonstram que a agregação de βA pode ser catalisada pela presença de Fe, ocasionando a formação de complexos de βA/Fe(II) e βA/Fe(III). Os autores concluíram que Fe(III) é reduzido a Fe(II) provovendo a produção de H₂O₂ e posteriormente, o complexo βA/Fe(II) na presença de H₂O₂ gerando ROS.

D'Arrigo e colaboradores²² avaliaram a interação entre βA₁₋₄₂ e citrato férrico, utilizando medidas de fluorescência com a sonda Tioflavina T (ThT), estudos de dicroísmo

circular, dentre outros. Os resultados reportam aumento do processo de fibrilização indicado pelo marcador ThT. Ademais, mudanças conformacionais do peptídeo na presença de ferro, comprovadas por dicroísmo, demonstraram alteração da estrutura secundária das folhas β .

Hare e colaboradores²³ avaliaram a formação de placas senis em camundongos transgênicos APP/PS1 utilizando Microscopia de Fluorescência de Raios – X e Mapas elementais de imagens das amostras (tecidos cerebrais) foram contruídos. Os resultados (**Figura 7**) evidenciam a presença de Fe, Cu e Zn na região do hipocampo.

Figura 7 - Imagens dos metais Fe (a), Cu (b) e Zn (c) presentes da região do hipocampo de camundongos APP/PS1 obtidas por meio de Fluorescência de raios- X. Espectros de fluorescência correspondem a cada pixel de imagem, originando mapas elementais, processados através do programa Fuji²⁴.

Bush e colaboradores²⁴ investigaram a presença de ferritina no fluido cerebrospinal (*cerebrospinal fluid*; CSF) em 296 voluntários anos utilizando a chamada RBM multiplex plataforma (quantificação de proteínas por imuno-histoquímica). Ressonância magnética de imagens (*magnetic resonance images*; MRI) foi usada paralelamente para investigar o surgimento das placas senis e RBM usado na quantificação. Os resultados demonstraram que em baixos níveis de ferritina, a concentração de β A foi mais acentuada, isso sugere que a deficiência da proteína de estoque, provoque acúmulo de ferro provocando agregação de β A. (**Figura 8**).

Figura 8 - Concentração de β A no CSF de paciente saudáveis (alta ferritina) e com DA (baixa ferritina)²⁵.

1.4.2 - Acetilcolinesterase (AChE)

O sistema colinérgico controla os sinais provenientes de células nervosas para células musculares ou ainda para outras células nervosas. O neurotransmissor acetilcolina (*acetylcholine*; ACh) modula a sinalização em células pré e pós sinápticas na chamada fenda sináptica através de ligação a receptores colinérgicos^{25,26}. Com o papel de modular a neurotransmissão, sua atuação é fundamental no sistema nervoso central (*central nervous system*; CNS) e sistema nervoso periférico (*peripheral nervous system*; PNS)²⁷. A enzima acetilcolinesterase (*acetylcholinesterase*; AChE) possui o papel de hidrolisar (**Figura 9**) e inativar a ACh modulando sua concentração.

Figura 9 - Hidrólise da acetilcolina pela AChE²⁷

A estrutura cristalográfica (**Figura 10**) mostra que a AChE é constituída por uma tríade catalítica formada por resíduos de serina, histidina e glutamato localizada em uma cavidade com 20 Å de profundidade. Essa tríade penetra metade do percurso dentro da enzima e se alarga próximo à sua base²⁷. A cavidade de ligação com ligantes é revestida com resíduos de aminoácidos que envolvem aproximadamente 40% de sua superfície. A entrada dessa cavidade é denominada sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site*; PAS) que contém aminoácidos carregados negativamente que interagem preferencialmente com cátions ajudando na orientação da ACh e de outros ligantes²⁷. Os ligantes são direcionados ao sítio catalítico aniônico (*catalytic aninonic site*; CAS) onde se localiza a tríade catalítica e o sítio de ligação acila (*Acyl pocket*; AP) formado por resíduos de aminoácidos aromáticos alinhados à base da cavidade.

Figura 10 - Ilustração dos sítios de ligação da AChE²⁸

A hipótese colinérgica postula que o bloqueio da enzima AChE aumenta os níveis de ACh, melhorando o déficit cognitivo. Diferentes fármacos foram desenvolvidas ao longo dos anos para tratamento da DA, tendo como principal alvo a inibição da AChE e serão discutidos posteriormente no próximo tópico.

1.4.2.1 – Inibidores da AChE

Inibidores da AChE inibem a hidrólise da ACh, aumentando a concentração e duração da ação do neurotransmissor, e de acordo com seu modo de ação, são classificados como: irreversíveis e reversíveis²⁸. Os inibidores reversíveis podem ser competitivos ou não-competitivos e são amplamente usados em aplicações terapêuticas, dentre eles estão a Tacrina, Galantamina, Rivastigmina e a Donepezila²⁸(**Figura 11**):

Figura 11 - Estruturas dos inibidores de AChE utilizados no tratamento clínico da DA²⁹. *FDA - *Food and Drug Administration*

Tacrina: A Tacrina é um inibidor reversível da AChE que interage com a região hidrofóbica próximo ao sítio aniônico da enzima, seu processo de inibição se encontra entre competitivo e não-competitivo²⁹. Em média, uma inibição de 40% da AChE presente no plasma, é obtida em pacientes administrando-se diariamente 160 mg da fármaco, provocando melhora na função cognitiva³⁰. Sua biodisponibilidade varia entre 17-37% e o tempo que leva para alcançar a concentração máxima no plasma entre 1-2 horas com a administração de 10-50 mg em pacientes com DA[31]. Seu tempo de meia-vida varia de 1,3 - 7 horas³¹. Tacrina foi o primeiro inibidor da AChE aprovado pela FDA (1993), entretanto seu uso foi suspenso em alguns países devido ao efeitos de hepatotoxicidade²⁸.

Donepezila: Donepezila é um inibidor reversível da AChE, que se liga ao PAS, onde além de inibir a atividade da AChE, retarda a agregação de β A, melhorando a função cognitiva em pacientes com DA em estágio avançado²⁸. Esta fármaco é administrada por via oral e apresenta um tempo de meia vida de 72 horas, podendo ser administrada apenas uma vez ao dia²⁸. O tratamento é geralmente realizado com dosagem inicial de 5 mg por dia e aumentado no decorrer do avanço da doença para 10 mg, com dosagem máxima diária igual a 23 mg, atingindo a concentração máxima no plasma entre 3-5 horas²⁸. Os efeitos colaterais incluem náuseas, vômitos, dores abdominais e anorexia²⁸.

Rivastigmina: Rivastigmina é um inibidor pseudo irreversível da AChE que forma um complexo carbomoiado com a enzima. Ela é absorvida por via oral atingindo concentração máxima no plasma entre 0,5- 2 horas, apresenta biodisponibilidade de 40%, se ligando a proteínas no plasma, sendo eliminada rapidamente (tempo-meia vida varia entre 0,6-2 horas)³¹. Seus efeitos colaterais incluem náusea, vômito e tontura³¹.

Galantamina: Galantamina é um alcalóide isolado da planta *Galanthus woronowii* aplicada em pacientes com DA em seu estágio moderado²⁸. É um inibidor reversível, competitivo que interage com os subsítios aniônicos bem como a cavidade hidrofóbica da AChE²⁸. Sua biodisponibilidade é igual a 85%, com administração via oral com concentração máxima no plasma com 52 min e tempo de meia-vida de 5,7 horas. Seus efeitos colaterais incluem náusea e diarreia.

Fármacos anti-DA podem ser combinadas com outras moléculas^{31,32,33,34} a fim de melhorar suas propriedades farmacológicas, e uma das possibilidades é combiná-las com agentes quelantes. Essa combinação envolve a produção de novas moléculas que podem se comportar como quelantes de Fe (moléculas capazes de sequestrar Fe em excesso) evitando a geração de ROS e ao mesmo tempo atacar alvos responsáveis pela DA, onde neste caso, temos o desenvolvimento de moléculas bifuncionais²⁹. Essa estratégia será descrita a seguir.

1.4.3 – Quelantes de Ferro e a Estratégia dos Ligantes Direcionados a Múltiplos Alvos (MTDL)

O tratamento da sobrecarga de Fe pode se dar por simples flebotomia, mas normalmente é aliado a uma terapia de quelação. Em linhas gerais, essa terapia envolve a administração de um quelante por via intravenosa (desferrioxamina - DFO) ou oral (deferiprona, deferasirox; **Figura 12**) dentro de um regime de tratamento voltado a mobilizar o Fe dos seus reservatórios para posterior excreção³⁵. As células são permeáveis aos quelantes deferiprona e deferasirox (mas não à desferrioxamina), portanto esses medicamentos também podem ser usados para a diminuição dos reservatórios de ferro lábil citossólicos, ou seja dos LIP³⁶.

Figura 12 - Quelantes de uso clínico para o tratamento da sobrecarga de Ferro.

A DA apresenta uma patologia complexa e sua natureza multifatorial dificulta a identificação de alvos biológicos específicos para o desenvolvimento de novos fármacos. Nos últimos anos, um novo paradigma tem surgido na química medicinal, chamada estratégia dos ligantes direcionados a múltiplos alvos (*Multiple-target-directed ligands*; MTDL)³⁶. Essa estratégia é usada através da conjugação de diferentes moléculas com alto potencial para atacar diferentes alvos responsáveis pela DA³⁷. Uma característica importante que estes conjugados devem possuir é a capacidade de permear a barreira hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*; BBB). A BBB é definida pela microvasculatura do cérebro que consiste em uma monofase polarizada de células endoteliais que conectadas formam complexas junções endoteliais responsáveis pelo bloqueio do acesso de fármacos ao cérebro para tratamento da DA³⁷. Recentemente, nosso grupo de pesquisa introduziu três novos quelantes com permeabilidade aumentada à BBB: o conjugado desferrioxamina-cafeína (DFCAF³⁸) e desferrioxamina associada aos peptídeos TAT e penetratina³⁹. Para melhor avaliação de candidatos a fármacos anti-DA, é possível usar modelos biológicos como o *Caenorhabditis elegans*.

1.4.4 - *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

Há mais de 50 anos, o cientista Sydney Brenner teve a visão de desenvolver o nematóide *C. elegans* como modelo genético para compreender questões relacionadas à biologia e a neurobiologia. Com o decorrer dos anos, as pesquisas envolvendo *C. elegans* se expandiram para diversas áreas, incluindo estudos sobre genômica, toxicologia, aplicação e uso de fármacos⁴⁰. Em 1963, Brenner enviou uma carta a Max Perutz, presidente do laboratório do conselho médico de biologia molecular, expressando suas preocupações com problemas clássicos da biologia molecular que seriam resolvidos nas próximas décadas. Com um olhar além de sua época, propôs que o futuro da biologia molecular se baseava na extensão para outros campos da ciência, principalmente no que abrange o sistema nervoso⁴¹. Com seu conhecimento sobre genética, ele desenvolveu o modelo *C. elegans*, que hoje, possui mais de 1200 artigos publicados em revistas de alto fator de impacto entre 2010-2015⁴¹.

C. elegans é um nematóide de solo que pode ser facilmente isolado de plantas apodrecidas com um amplo suprimento de bactérias, que são sua fonte de alimentação⁴¹. Este nematóide existe primariamente na forma de hermafroditas, tendo machos como 0,2% de sua população, sendo um animal de vida livre encontrado ao redor do mundo. Suas larvas recém eclodidas apresentam 0,25 mm de comprimento e os adultos 1 mm⁴¹. Em função de seu pequeno tamanho, este verme, em placas petri, pode ser observado em microscópios de dissecação que permitem a ampliação de 100 a 1000 vezes⁴¹. *C. elegans* possui rápido ciclo de vida (3 dias em uma temperatura de 25°C dos ovos para o estágio adulto), se desenvolvendo através de quatro estágios larvais (L1-L4)⁴¹. No estágio L4, os hermafroditas possuem uma cauda afilada e uma vulva em desenvolvimento (**Figura 13**, seta branca), já os machos possuem uma cauda mais larga (**Figura 13**, seta preta)⁴¹. Nos adultos os dois sexos podem ser diferenciados pelo maior perímetro e cauda mais afilada do hermafrodita. Na ausência de comida, o estágio L2 desenvolve uma forma alternativa chamada *Dauer*⁴¹.

Este modelo apresenta vantagens em relação ao seu armazenamento e manuseio para execução de experimentos. Seu pequeno tamanho permite que números elevados do verme possam ser cultivados em espaços muito pequenos, e seu corpo transparente permite a observação de células e outras características anatômicas, sem a necessidade de matar e dissecar o animal⁴¹. Essa transparência permite maior riqueza de estudos sobre o animal, com o uso de proteínas fluorescentes. Seu rápido crescimento, aliado ao seu tempo de vida curto, tornam o modelo eficiente em estudos, em diferentes campos da ciência⁴¹.

Figura 13 - Ciclo de vida de *C. elegans*⁴¹

Ademais, apesar de sua aparência simples, ele possui hipoderme, intestino, gônadas e um sistema excretor, e seu sistema nervoso é composto por 302 neurônios⁴². *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado, possuindo homologia de 60-80% com o dos humanos. Isso significa que seu sistema nervoso central conserva o uso de neurotransmissores como acetilcolina e dopamina nas sinapses, bem como a presença de células neuronais como nos mamíferos⁴². Essa característica faz com que o nematóide possa ser utilizado como modelo biológico para o *screening* de novas fármacos para combater à neurodegeneração^{42,43,44}.

Capítulo 2

Objetivos

2- Objetivos

2.1 - Hipóteses

Em função do que foi discutido, verifica-se uma relação entre Ferro e a Doença de Alzheimer e o desenvolvimento de fármacos anti-DA que se comportem como quelantes é interessante para tratamento desta desordem. Isso leva aos seguintes questionamentos:

- 1- A presença de anéis aromáticos na estrutura de um quelante poderia colaborar para inibir alvos anti-DA como AChE e β A ?
- 2- A quelação de Ferro pode afetar a atividade da AChE e agregação de β A ?
- 3- Como melhorar a permeabilidade celular de um fármaco hidrofílico? Acoplar grupos aromáticos e/ou hidrofóbicos em sua estrutura seria uma solução ?

2.2 – Objetivos gerais

Na literatura, observou-se que em geral, moléculas com anéis aromáticos em suas estruturas apresentam capacidade de inibir a ação da AChE e inibir a agregação de β A. Além disso, o aumento da permeabilidade de possíveis candidatos a fármacos anti-DA a membranas celulares é crucial. Propomos neste trabalho, a conjugação de diferentes aminas aromáticas (**Figura 14**) com DFO, a fim de melhorar as propriedades farmacológicas deste quelante.

Figura 14 - Aminas aromáticas escolhidas para conjugação com DFO

2.3 - Objetivos específicos

Os objetivos específicos envolvendo os conjugados, são:

1 - Síntese, caracterização e avaliação anti-DA dos novos conjugados de DFO com aminas aromáticas. Estas novas moléculas foram nomeadas como: DFOANI (DFO-Anilina), DFOBAN (DFO-benzosulfanilamida), DFONAF (DFO-2-amino-naftaleno) e DFOQUN (DFO-6-aminoquinolina).

2- Estudar suas propriedades de complexação com Fe

3- Avaliar suas propriedades antioxidantes

4- Determinação da capacidade dos conjugados de inibir a atividade da AChE e a agregação de βA_{1-42} .

5- Comprovar sua permeabilidade celular, utilizando células HeLa como modelo. Esta linhagem celular apresenta bom fator de resposta diante da permeabilidade da sonda Acetometoxicalceína (CAL-AM), descrito posteriormente no tópico 3.10.2.

6- Verificar o seu comportamento em sistemas biológicos, utilizando o modelo *C. elegans*.

Capítulo 3

Parte Experimental

3- Parte Experimental

3.1. Materiais e Equipamentos

Tabela 1 - Materiais (reagentes, solventes e kits) utilizados.

Materiais	Fornecedor	Grau de pureza
Calceína (CAL)	Synth	Analítico
Cloreto de diidrorodamina (DHR)	Biotium	Analítico
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich	99,0%
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6)	Sigma Aldrich	99,0%
Água deionizada	Equipamento Millipore (Bedford, EUA)	Ultra-pura
Sulfato ferroso amoniacal (FAS)	Sigma Aldrich	98,0%
Mesilato de desferrioxamina (DFO)	Cristália	99,0%
Nitrilotriacetato de sódio (NTA)	Vetec	Analítico
Anidrido succínico	Vetec	Analítico
Anilina	Sigma Aldrich	99,0%
Acetona	Sigma Aldrich	99,0%
Benzosulfanilamida	-	-
6-aminoquinolina	Sigma Aldrich	-
2-aminonaftaleno	-	-
Clorofórmio	Sigma Aldrich	99,0%
Metanol	Sigma Aldrich	99,0%
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich	99,0%
Tetraidrofurano	Sigma Aldrich	99,0%
2,2 – difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	Sigma Aldrich	99,0%
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)	Sigma Aldrich	99,0%

1-Hidroxibenzotriazol hidratado (HOBt)	Sigma Aldrich	99,0%
Diisopropilamina (DIPEA)	Sigma Aldrich	99,0%
Ácido Trifluoro Acético (TFA)	Merk	Espectroscópico
Acetonitrila (ACN)	Vetec	Analítico
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma Aldrich	99,0%
Ágar	Thermo Fisher	-
Peptona desidratada	Thermo Fisher	-
Colesterol	Sigma Aldrich	99,0%
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	Sigma Aldrich	99,0%
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	Sigma Aldrich	99,0%
Hidrogeno -Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich	99,0%
Nistatina	Thermo Fisher	-
Sulfato de estreptomicina	Sigma Aldrich	-
<i>Luria Broth</i>	Thermo Fisher	-
Hidrogeno- Fosfato de Sódio (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich	99,0%
Hidroxido de Sódio (NaOH)	Sigma Aldrich	99,0%
Sulfato de Ferro (FeSO ₄)	Sigma Aldrich	99,0%
Sacarose	Sigma Aldrich	99,5%
Kit de Ensaio: <i>Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay</i>	Thermo Fisher	-
Kit de Ensaio: <i>Pierce BCA Protein Assay</i>	Thermo Fisher	-
Peptideo Amilóide: <i>Amyloid β Protein Fragment 1-42</i>	Sigma Aldrich	-
Tioflavina-T	Sigma Aldrich	-
PBS pH = 7,4	Thermo Fisher	
DMEM - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco	
DMEM sem fenol vermelho	Gibco	
Ácido Pentético (DTPA)	Sigma Aldrich	-

Tampão HBS/Chelex: Hepes (20mM), NaCl (150 mM), lavado com Chelex-100 (sódica) 1 g/100 mL, pH 7,4. Os equipamentos utilizados nesta tese foram:

1- Leitor de microplacas *SpectraMax M4 da Molecular Devices* (EUA)

2- - Leitor de microplacas *BMG Fluostar Optima da BMG LabTech*

(EUA)

3 - Cromatógrafo Líquido de Alta eficiência em Fase Reversa *RP-HPLC Waters* (EUA)

4 - Cromatógrafo Líquido de Alta eficiência em Fase Reversa *RP-HPLC da LDC Analytical* (EUA)

5 - Espectrômetro de massas *Amazon Speed ETD – Brucker* (Alemanha)

6 - Cromatógrafo Líquido de Alta eficiência em Fase Reversa RP-HPLC da *Shimadzu Corporation* (Japão) acoplado a um espectrômetro de massas *Amazon X da Bruker Daltonics* (Alemanha)

3.2 - Sínteses

3.2.1 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(fenilamino)butanóico (ROD003)

A reação foi realizada de acordo com o método descrito por Dulla et al⁴⁵. Em água deionizada (5 mL), anilina (1 mmol) foi adicionada permanecendo sob agitação constante, temperatura ambiente e em contato com oxigênio. Em seguida, três porções de anidrido succínico (1 mmol; 1mmol e 0,6 mmol) foram adicionados ao meio reacional (uma porção a cada 2 minutos). O tempo total da reação foi de 10 minutos (**Figura 15**). O sólido branco foi lavado com água deionizada e seco sob vácuo durante 24 horas para se obter o produto desejado. A reação foi monitorada por cromatografia de camada delgada (*thin layer chromatography*; TLC) utilizando clorofórmio metanol: ácido acético como eluente nas proporções 85:10:5.

Figura 15 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(fenilamino)butanóico

3.2.2 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-((sufamoilfenil)amino)butanóico (ROD007)

A reação foi realizada de acordo com o método descrito por Dulla et al⁴⁶. Em água deionizada (5 mL), benzosulanilamida (1 mmol) foi adicionada permanecendo sob agitação constante, temperatura ambiente e em contato com oxigênio. Em seguida, três porções de anidrido succínico (1 mmol; 1 mmol e 0,6 mmol) foram adicionados ao meio reacional (uma porção a cada 2 minutos). O tempo total da reação foi de 10 minutos. O sólido amarelo claro foi lavado com água destilada e seco sob vácuo durante 24 horas para se obter o produto desejado (**Figura 16**). A reação foi monitorada por TLC utilizando clorofórmio metanol: ácido acético como eluente nas proporções 85:10:5.

Figura 16 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-((sufamoilfenil)amino)butanóico

3.2.3 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(naftalen-2-fenilamino)butanóico (ROD020)

A reação foi realizada de acordo com o método descrito por Dulla et al⁴⁶. Em água deionizada (50 mL), 2-amino-naftaleno (10 mmol) e anidrido succínico (10 mmol) foram misturados. O procedimento foi realizado mantendo o meio reacional sob agitação constante, temperatura ambiente e em contato com oxigênio. Após 15 minutos, o sólido marrom opaco foi lavado com ácido acético concentrado e seco sob vácuo durante 24 horas para se obter o produto desejado (**Figura 17**). A reação foi monitorada TLC utilizando clorofórmio metanol: ácido acético como eluente nas proporções 85:10:5.

Figura 17 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(naftalen-2-fenilamino)butanóico

3.2.4 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(quinolin-6-fenilamino)butanóico (ROD021)

A reação foi realizada de acordo com o método descrito por Sinha e Shrivastava⁴⁶. Em Tolueno (15 mL), 6-aminoquinolina (2 mmol) e anidrido succínico (2 mmol) foram misturados. O procedimento foi realizado mantendo o meio reacional sob agitação constante, em refluxo e utilizando gás nitrogênio como meio inerte. Após 4 horas, o sólido amarelo foi lavado com uma mistura CHCl₃/MeOH 95:5 e seco sob vácuo durante 24 horas para se obter o produto desejado (**Figura 18**). A reação foi monitorada por TLC utilizando clorofórmio metanol: ácido acético como eluente nas proporções 85:10:5.

Figura 18 - Síntese do Ácido 4-oxo-4-(quinolin-6-fenilamino)butanóico

3.2.5 - Síntese dos Conjugados de DFO

Os quelantes foram preparados de acordo com as metodologias descritas por Alta et al³⁸.; Liu et al⁴⁷. Em DMF (15 mL), foram adicionados ROD003, ROD007, ROD020 ou ROD021 (1 mmol), DFO (1 mmol), EDC (1,5 mmol), HOBt (1,5 mmol). A mistura sob agitação constante foi aquecida até uma temperatura de 50°C durante 5 minutos e após a solubilização dos reagentes, DIPEA (2 mmol) foi adicionado ao meio reacional. O procedimento foi realizado utilizando gás nitrogênio como meio inerte, em temperatura ambiente, durante tempo de 16 horas (**Figuras 19 e 20**). Os sólidos obtidos foram lavados com éter dietílico e água destilada e secos sob vácuo durante 72 horas. A reação foi monitorada por TLC utilizando clorofórmio : metanol como eluente nas proporções 80:20. Os quelantes foram nomeados como: 1- **DFOANI**, 2- **DFOBAN**, 3- **DFONAF** e 4- **DFOQUN**.

Figura 19 - Síntese dos conjugados de DFO

Figura 20 - Estrutura dos conjugados de DFO.

3.2.6 - Purificação dos Conjugados de DFO

3.2.6.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

Para cada conjugado foi feita uma purificação seguida de análise do purificado. A purificação foi realizada usando cromatografia em fase reversa com o sistema RP-HPLC Waters (EUA), modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C18, 10 μ m, 300 $\text{\AA}$, 2,2 x 25 cm). Dois eluentes foram preparados: A- Solução 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) em água e B – Solução 60% Acetonitrila (ACN) e 0,09% TFA. Uma amostra de 250 mg de cada conjugado (em DMSO) a ser purificado foi injetado e a sequência de eluição foi 5% B (95% A) em 5 min, 5-20% B em 5min, 20- 65% B em 90 min, 60 – 95% B em 5 min e 95% B (5% A) em 5 min.. As frações coletadas foram analisadas uma a uma para a detecção do conjugado. Aquelas com o mesmo perfil foram juntadas para resultar num único liofilizado, que foi pesado

Os purificados liofilizados foram analisados usando um sistema para RP-HPLC da LDC Analytical composto por um controlador de gradiente automático, duas bombas (ConstaMetric 3500 e ConstaMetric 3200), um detetor UV (Milton Roy, spectromonitor 3100), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um integrador (TermoSeparation Products, Data Jet integrator) e uma coluna analítica (Vydac C18, 5 μ m, 300Å, 0,46 x 25 cm). Preparam-se soluções de 1mg/mL dos conjugados em DMSO e foram injetados 7 μ L das amostras com gradiente linear de 5%-95% do Solvente B por 30 min.

Essas etapas foram realizadas pelo Dr. Cleber W. Liria empregando equipamentos do Laboratório de Química de Peptídeos, IQUSP, sob orientação da Profa. Dra. M. Teresa Machini.

3.3 – Caracterização dos Compostos Sintetizados

3.3.2 – Rendimento Químico

Os rendimentos das reações das sínteses dos ácidos carboxílicos e conjugados de DFO foram calculados através da razão entre a massa experimental e a massa teórica obtida após lavagem e purificação dos mesmos através da relação:

$$(\%) \text{Rendimento} = \frac{\text{Massa experimental}}{\text{Massa teórica}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

3.3.3 - Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Cromatografia de camada delgada (TLC) foi empregada para acompanhamento das reações e determinação dos fatores de retenção (R_f) dos produtos sintetizados. Cromatofolhas de alumínio cobertas por sílica fluorescente foram usadas e reveladas através de luz ultravioleta (254 nm) e/ou iodo de acordo com as características de cada composto.

3.3.4 - Determinação do ponto de fusão

As determinações dos pontos de fusão dos compostos foram efetuadas em um microscópio dotado de bloco Kofler Optics AHT utilizando-se lâminas de vidro.

3.3.5 - Análise Elementar

Análise Elementar dos Conjugados de DFO foram realizadas na Central Analítica do IQUSP em um *Analizador Perkin Elmer 2400 CHN*. Para avaliação da pureza das amostras, foi admitido variação experimental de no máximo 0,4% sobre os valores de cada composto. Em caso de extrapolação da variação experimental definida, empregou-se o programa *JASPER 2.0* (<http://www.chem.yorku.ca/profs/potvin/Jasper/jasper2.htm>) para identificação de possíveis contaminantes.

3.3.6 - Análise por Espectrometria de Massas (ESI/MS) e Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS)

Os espectros de massas dos ácidos carboxílicos foram obtidos no equipamento *Amazon Speed ETD – Bruker* da Central Analítica do IQUSP com ionização do tipo eletrospray, analisador do tipo íon trap, modos ESI positivo e negativo com nebulizador (12 psi), gás inerte (5 L/min), temperatura de 200° C e voltagem aplicada igual a 4500 V (capilar).

Para análise dos conjugados de DFO, foi utilizado um sistema de RP-HPLC da *Shimadzu Corporation* (Kyoto, Japão, fluxo 0,8 mL/min), composto por um degaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor *Rheodyne 8125*, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C18 (5 x 2 mm, 4,6mm) *Shim-pack GVP-ODS* e uma coluna C18 (150 x 2mm, diâmetro de partícula = 4,6 µm e diâmetro de poro = 12 nm) *Shim-pack GVP-ODS 44* acoplada a um espectro de massas *Amazon X da Bruker Daltonics* (Alemanha) com fonte de ionização do tipo eletrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo ‘Ion trap’. As voltagens aplicadas foram 3500 V (capilar) e 37 kV (cone). O gradiente aplicado foi 5-95% de B em 30 min. Os espectros foram analisados utilizando o programa HyStar 3.2.

Essas análises foram realizadas pelo Dr. Cleber W. Liria empregando equipamento do Laboratório de Química de Peptídeos, IQUSP, sob orientação da Profa. Dra. M. Teresa Machini

3.3.7 - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C

Espectros de RMN de próton e carbono dos ácidos carboxílicos e conjugados de DFO foram obtidos em DMSO deuterado a 298 K nos equipamentos Varian Inova 300 MHz e Bruker DRX 500 MHz da Central Analítica-IQUSP.

3.4 - Estudos de Competição de Calceína

Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 180 μL de uma solução de calceína (2 μM em HBS) em cada poço. A fluorescência foi registrada (BMG Fluostar Optima; $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emt}} = 485/520 \text{ nm}$) por 10 minutos. Após esse tempo, 10 μL de uma solução de sulfato ferroso amoniacal foram adicionados aos poços (a concentração final foi igual a 2 μM), formando o complexo não fluorescente calceína-ferro (CAFe). A estabilização da supressão de fluorescência foi aguardada ($\sim 15 \text{ min}$), e então 10 μL de soluções dos conjugados (0 – 300 μM) dissolvidos em DMSO, foram adicionados em cada poço, com as concentrações finais variando de 0 – 15 μM , com percentual final de DMSO igual a 5%. Dois ensaios independentes foram realizados, cada um em duplicata. O percentual de recuperação de fluorescência (Recuperação (%)) foi calculado baseado no modelo descrito na **Figura 21** e de acordo com a equação 6^{48,49,50}:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{D-C}{A-C} \times 100 \text{ (Equação 6)}$$

Figura 21 - Supressão e recuperação de fluorescência da calceína na presença de ferro e conjugados. A - Fluorescência inicial, B - Supressão de fluorescência na presença de ferro, C - Estabilização de fluorescência após adição

de ferro, neste ponto, adiciona-se o conjugado, D- Recuperação e estabilização de fluorescência após adição do conjugado⁵.

3.5 – Espectroscopia UV-Vis

Soluções estoque de sulfato ferroso amoniacal (FAS) e conjugados foram preparadas em 30% DMSO devido a problemas de solubilidade destes compostos em água, ambas com concentração igual a 1 mM. Em uma microplaca de quartzo de 96 poços, 50 μL de solução de quelante e 50 μL de água deionizada foram adicionados em cada poço e paralelamente, 50 μL de solução de quelante e 50 μL de FAS. Após tempo de 30 min, uma varredura de $\lambda = 200 - 800 \text{ nm}$ foi realizada em um leitor de microplacas SpectraMax M4. Com comprimento de onda correspondente, curvas de calibração foram construídas para determinação do coeficiente de absorvidade molar dos complexos.

3.6 - Método das Variações Contínuas (Job's Plot)

O método das variações contínuas é usado para determinação de estequiometria de complexos formados. A ligação de ferro com os novos quelantes foi investigada a fim de se determinar se haveria alteração no ambiente de coordenação da DFO após conjugação com os ácidos carboxílicos. Soluções estoque foram preparadas de acordo com descrito no tópico 4.5 e proporções variadas de ferro e quelantes foram usadas neste estudo (**Tabela 2**), o tempo de equilíbrio é igual a 40 min.

Tabela 2 - Diferentes proporções metal-ligante utilizadas neste estudo.

Fe (μL)	Conjugado (μL)	[Fe] (M)	[Conjugado] (M)	[Fe]/([Fe] + [Conjugado])
0	100	0	0,0010	0
10	90	0,00011	0,0090	0,012
20	80	0,00025	0,0040	0,059
30	70	0,00043	0,0023	0,16
40	60	0,00067	0,0015	0,31
50	50	0,0010	0,0010	0,50
60	40	0,0015	0,00067	0,69
70	30	0,0023	0,00043	0,84
80	20	0,004	0,00025	0,94

90	10	0,009	0,00011	0,98
100	0	0,001	0	1,0

3.7 – Estudos Anti-Oxidantes

3.7.1 – Sistema Ferro Ascorbato

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser geradas em meio fisiológico pela interação de ferro e ascorbato. A sonda dihidrorodamina (*dihydrorhodamine*; DHR) não apresenta fluorescência enquanto reduzida, entretanto, as ERO's podem convertê-la à sua forma fluorescente.

Em uma microplaca de 96 poços, 10 μL de uma solução de nitrilotriacetato de ferro (Fe(NTA); 40 μM) foram adicionados em cada poço, e posteriormente 10 μL de soluções dos conjugados (0 – 300 μM) dissolvidos em DMSO foram adicionados. Um volume de 180 μL da mistura fluorogênica (50 μM de DHR e 40 μM de ácido ascórbico em tampão HBS) foi acrescentado em cada poço. As concentrações finais de Fe(NTA) e conjugados são 2 μM e 0-15 μM respectivamente com percentual final de DMSO igual a 5%. A leitura de fluorescência foi efetuada no *BMG Fluostar Optima*; $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emt}} = 485/520$ nm durante 1 hora a 37°C. Dois ensaios independentes foram realizados, cada um em duplicata. A taxa de oxidação de DHR é diretamente proporcional à quantidade de ferro presente, os resultados são representados em função da oxidação da sonda por quantidade de tempo (**Figura 22**):

Figura 22 - Oxidação da sonda DHR. (a) Com a concentração de ferro fixa, variou-se a concentração do quelante, observando redução da fluorescência. (b) A taxa de oxidação diminui com o aumento da concentração do quelante que provoca redução da geração de ROS.

3.7.2 - Sistema DPPH

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é um radical livre de intensa coloração violeta ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), que uma vez neutralizado perde sua coloração. É bastante usado na avaliação antioxidante de diferentes moléculas candidatas a fármacos^{51,52}.

Em microplacas de 96 poços foram transferidos 10 μL de soluções dos conjugados (0 - 2 mM) dissolvidos em DMSO. Em seguida, 190 μL de uma solução de DPPH (0,1 mM) dissolvida em metanol foram adicionados em cada poço. A concentração final dos conjugados varia de 0 – 100 μM e o percentual final de DMSO é igual a 5%. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas *SpectraMax M4* em $\lambda = 520 \text{ nm}$. A atividade antioxidante (AA(%)) foi calculada de acordo com a seguinte relação⁵³.

$$AA(\%) = \frac{(Abs \text{ DPPH} - Abs \text{ Amostra})}{(Abs \text{ DPPH})} \times 100 \text{ (Equação 7)}$$

3.8 – Experimentos usando nematóide *Caenorhabditis elegans*

3.8.1 – Preparação de Meio para Placas de Petri e Manutenção do Verme.

Nos experimentos envolvendo o nematóide *C. elegans*, foi usada a linhagem Bristol N2 (selvagem). As cepas dos vermes foram adquiridas do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – University of Minnesota, Twin Cities, EUA). Para cultura do nematóide⁵⁴, placas de Petri de plástico (150 mm de diâmetro) foram utilizadas com ágar tipo NGM (*Nematode Growth Media*, 3 g NaCl; 17 g ágar e 2,5 g peptona para 1 L de água deionizada). O meio foi autoclavado durante 45 min e então colocado sob agitação para arrefecimento e em seguida, esterilizado utilizando colesterol (5mg/mL; 1 mL), CaCl₂ (1 M; 1mL), MgSO₄ (1 M; 1 mL), KPO₄ (pH 6,0; 1 M; 1 mL ; 108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄, H₂O para 1 litro;), niastina (armazenada a -20 °C, 1,25 mL) e sulfato de estreptomicina (100 mg/mL, 0,5 mL). O meio foi espalhado nas placas e posteriormente deixadas em repouso por 24 horas (**Figura 23**). No mesmo dia, bactérias (*E. coli* OP50) foram cultivadas para servir como alimento para o animal. O meio utilizado para desenvolvimento da bateria foi do tipo *Luria broth* (12,5 g LB broth em 500 mL de água deionizada, autoclavado durante 30 min e após refriamento, adicionando-se estreptomicina com concentração final igual 50 µg/mL). Seis gotas de bateria são adicionadas a 40 mL de meio, deixado sob agitação a temperatura de 37 °C durante 24 horas. No dia seguinte, as bactérias foram adicionadas as placas, aguardou-se um período de 24 horas. Após isso, o *Shank* (**Figura 24**) foi executado e os vermes foram armazenados em uma temperatura de 20°C.

Figura 23 - Preparação das placas Petri

Figura 24 - "Shank" entre duas placas Petri. Este procedimento consiste em retirar um pedaço do meio colonizado pelos vermes e coloca-lo em uma nova placa em posição invertida. A nova placa deve ser monitorada diariamente para se verificar o aparecimento de ovos.

3.8.2 – Sincronização

Sincronização (**Figura 25**) é um procedimento que se consiste em extrair os ovos dos vermes utilizando meio alcalino para obtê-los em seu estágio larval L1⁵⁵. Ovos e adultos prenhes foram transferidos para tubos falcon através de lavagem das placas com água esterilizada. Os tubos são centrifugados (1600 rpm durante 1 min) e a água suja é removida, este procedimento é realizado até se remover as bactérias presentes na água. A água límpida foi removida e se adicionaram 5 mL da solução de extração (0,25 M NaOH; 1% NaOCl). Em seguida, os tubos foram encaminhados para agitação contínua durante 4 min. Após esse tempo, tampão M9 (22 mM KH_2PO_4 ; 42 mM Na_2HPO_4 ; 86 mM NaCl; 1 mM MgSO_4) foi adicionado

em cada tubo para lavagem e remoção do meio alcalino. Dez mililitros de uma solução de sacarose (30%) foram adicionados aos tubos e os mesmos centrifugados (700 rpm durante 8 min) para separação dos ovos (**Figura 26**). Após novas lavagens com água esterelizada e centrifugação (2000 rpm durante 1 min), os tubos com ovos extraídos em tampão M9, sofrem agitação contínua a temperatura de 20°C durante 16 horas para eclodirem e finalmente, obter vermes no estágio L1.

Figura 25 - Esquema geral da sincronização

Figura 26 - Ovos permanecem na superfície da solução de sacarose devido a sua menor densidade. Eles são transferidos para outro tubo falcon para lavagem.

3.8.3 - Toxicidade Induzida por Ferro: Ensaio de Letalidade

Os vermes foram tratados com diferentes dosagens de FeSO_4 para se determinar o LC_{50} . FAS não foi utilizado nos experimentos com *C. elegans* devido à toxicidade do íon amônio⁵⁵. Dezesesseis horas após a sincronização, lavagem e centrifugação (1600 rpm durante 1 min) foi realizada com os vermes usando solução de NaCl 0,5% para remoção do tampão M9. Em tubos eppendorf, adicionaram-se 200 μL da mesma solução com 2500 vermes, e em seguida 300 μL de padrões de ferro foram acrescentados, com concentrações finais variando de 0 – 100 mM. Os tubos sofreram agitação durante 1 hora em uma temperatura de 20°C. Após exposição ao ferro, os vermes sofreram novas lavagens (tampão M9) e centrifugação (7000 rpm durante 2 min) 3 vezes consecutivas. Transferiram-se vermes (30 a 50) para placas Petri de 35 mm semeadas com bactérias *E. coli OP 50* e após 48 horas, contou-se o número de nematóides vivos. Três experimentos independentes foram realizados, cada um em triplicata (**Figura 27**)⁹¹.

Figura 27 - Esquema geral do ensaio de letalidade.

3.8.4 - Tratamento para Sobrecarga de Ferro: Ensaio de Sobrevida

Após determinar LC_{50} (12,5 mM), decidiu-se trabalhar com uma concentração de ferro fixa (6,2 mM) nos experimentos posteriores. Foi necessário, avaliar diferentes concentrações de DFO e percentuais de DMSO para aumentar a taxa de sobrevivência dos vermes. Em geral, todos os experimentos com *C. elegans* envolvem o mesmo tratamento descrito no tópico 3.8.3. Contudo, após a adição de ferro, adicionaram-se alíquotas de soluções dos quelantes de interesse, neste caso, DFO. Ferro e Quelantes foram co-administrados, sequencialmente, sem intervalos de tempo entre dosagens nos vermes. Três concentrações de DFO foram estudadas (1- 2,5 μ M com DMSO 0,015%; 2 -5 μ M com DMSO 0,03%; 3 - 10 μ M com DMSO 0,06%). Melhora na taxa de sobrevivência foi observada usando a condição 2. Neste trabalho, para tratamento dos vermes no estágio L1 com DFO e os demais quelantes foram adotadas as seguintes condições: Fe (6,2 mM) e Conjugado (2).

3.8.5 - Estudo de especiação de Fe(II) com software CHEAQS NEXT

CHEAQS NEXT é um software computacional utilizado para cálculos de equilíbrios químicos em sistemas aquosos. Inserindo as informações referentes ao sistema em estudo, obtém-se informações referentes às espécies químicas de interesse (**Figura 28**). Este software é baseado em uma base de dados com constantes termodinâmicas, de adsorção, precipitação, formação de complexos e reações de oxirredução, para indicar a formação de espécies químicas. Com concentração de cátions e ânions, força iônica temperatura e pH, o software em sua base de dados sugere a concentração das espécies químicas de interesse⁵⁶, sendo muito utilizado em estudos geológicos e ambientais^{57,58,59}.

O interesse neste estudo é verificar as possíveis espécies que influenciem diretamente na mortalidade dos vermes, uma vez que se observou aumento na taxa de sobrevivência dos nematoides mesmo com ferro em concentração elevada. O cálculo de especiação foi realizado considerando a força iônica (0,09 M), pE (0,9128; 54 mV), FeSO₄ (6,2 mM), H (1,1 µM; *free activity*) com a formação de precipitados⁶⁰.

Figura 28 - Cálculo de especiação usando software CHEAQS NEXT

3.8.6 – Estudo da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) com *Amplex Red*

3.8.6.1 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em *C. elegans* (Ensaio *In Vivo*)

É possível estudar a ação de candidatos a fármacos anti-Alzheimer no verme *C. elegans*, uma vez que ele apresenta sistema colinérgico similar ao de mamíferos. Para isso, o Kit Amplex Red (acetilcolina/acetilcolinesterase) foi aplicado. Este método promove o monitoramento da atividade da AChE oriunda da *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) ou detecção da acetilcolina utilizando fluorimetria, onde o reagente resofurina (não fluorescente) é convertido em *Amplex red* (fluorescente). Neste ensaio, uma solução de trabalho (400 μ M Amplex red; 0,1 mM acetilcolina; sem AChE) foi preparada de acordo com instruções do fabricante e armazenada em freezer a -20°C ⁶¹. O procedimento (**Figura 29**) realizado foi baseado nas metodologias descritas por Zamberlan, D. C. et al⁴⁴ e Sashidhara, K. V. et al⁴². Após tratamento dos vermes com os conjugados na presença ou ausência de Fe (20000 vermes por tubo eppendorf), as amostras foram congeladas 4 vezes consecutivas em banho de acetona/gelo seco. Cada tubo em gelo foi sonificado 3 vezes durante 15 s com pausa de 10 s entre cada amostra com amplitude igual a 40%. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 min. Para o ensaio do *Amplex red*, transferiram-se 100 μ L do sobrenadante para microplacas negras de 96 poços e em seguida 100 μ L da solução trabalho. A microplaca foi incubada no escuro durante 30 min a temperatura ambiente e a fluorescência foi medida utilizando *BMG Fluostar Optima*; $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 544/590\text{ nm}$. A fluorescência final foi normalizada em relação à quantidade de proteína utilizando o método de Bradford⁶². Dez microlitros de sobrenadante coletados foram diluídos em 90 μ L de solução salina (0,5%). Prepararam-se padrões de albumina (BSA) previamente (25 – 2000 μ g/mL), e transferiram-se 10 μ L de padrões ou das amostras diluídas para microplaca de 96 poços e o volume completados com 200 μ L de solução trabalho de BCA mix. A microplaca foi incubada no escuro durante 30 min a 37°C e a leitura de absorbância feita em leitor *SpectraMax M4* em $\lambda = 562\text{ nm}$.

Figura 29 - Extração da AChE dos nematóides para determinação da atividade da enzima com Amplex Red

3.8.6.2 - Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) (Ensaio in Vitro)

Em microplacas negras de 96 poços foram transferidos 10 μL de soluções dos conjugados (0 - 300 μM) dissolvidos em HBS (DMSO 6,7%). Em seguida, 10 μL de FeSO_4 (300 μM), 10 μL de acetilcolina (300 μM), 70 μL de tampão HBS foram adicionados em cada poço, finalmente 100 μL de solução trabalho (400 μM amplex red; 1 U/mL AChE; sem acetilcolina) transferidos para os poços. A concentração final dos conjugados varia de 0 – 15 μM e o percentual final de DMSO é igual a 0,1%. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos e a fluorescência foi medida utilizando *BMG Fluostar Optima*; $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 544/590 \text{ nm}$.

3.8.7 – Estudo de Análise Comportamental - *Body bend*

O comportamento do nematóide reflete a atividade do seu sistema nervoso central, que depende de diversos fatores como estímulos externos, estrutura neuronal e mudanças no ambiente interior do animal. Ensaio comportamentais são importantes para melhor compreensão da função neuronal⁶³. *Body Bend* ou número de curvaturas corporais (**Figura 30**) é definido como a propagação da mudança de direção da parte do verme correspondente ao bulbo posterior da faringe no eixo y enquanto seu músculo se desloca ao longo do eixo x⁴⁴.

Figura 30 - Locomoção do *C. elegans* mediado pelo seu sistema motor.

Dois tipos de tratamento (**Figura 31**) foram usados após exposição dos vermes no estágio L1 à Fe e quelantes. No tratamento 1, transferiram-se vermes para placas Petri de 60 mm sem comida e as curvaturas corporais foram contadas por um período de 20 s. No tratamento 2, vermes foram transferidos para placas Petri de 60 mm com comida, e após tempo de 2 horas, novamente transferidos para placas sem comida para contagem das curvaturas pelo mesmo período.

Figura 31 - Esquema geral do estudo comportamental de *C.elegans*.

3.9 - Estudo do Efeito dos Conjugados na Agregação do Peptídeo β – Amilóide

Para investigar a inibição da agregação do peptídeo βA_{1-42} pelos conjugados de DFO na presença e ausência de Fe, foi realizado ensaio utilizando a sonda fluorescente Tioflavina – T (*Thioflavin T*; ThT). Quando ThT se liga a estrutura do peptídeo, a sonda fluoresce, espera-se que o candidato a fármaco Anti-alzheimer interrompa a agregação do peptídeo, liberando a sonda para o meio aquoso e suprimindo sua fluorescência. De acordo com o procedimento descrito por Guzior, N. et al⁶⁴, fragmento de βA_{1-42} foi solubilizado em DMSO para se obter uma solução estoque de 100 μM e diluída posteriormente em PBS pH = 7,4 para uma concentração igual a 5 μM (DMSO 5%). Os compostos escolhidos para este ensaio foram dissolvidos em DMSO (15 mM) e diluídos em PBS (100 μM ; com percentual de DMSO desprezível). Finalmente, volumes de 20 μL de $A\beta_{1-42}$ (5 μM), 20 μL de conjugado (100 μM) e 4 μL de $FeSO_4$ (50 μM) foram transferidos para microplaca negra de 96 poços. Cada poço foi preenchido com PBS completando-se o volume para 100 μL . A microplaca foi incubada no escuro, sob agitação constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Após incubação, 2 μL de uma

solução de ThT (44,4 μM em PBS) foram transferidos para cada poço. A microplaca foi encaminhada para um leitor *Spectra Max M4*; $\lambda_{exc}/\lambda_{ems} = 446/490 \text{ nm}$. As concentrações finais de βA_{1-42} , conjugado, FeSO_4 e ThT foram 1; 20; 2 e 1 μM respectivamente e o percentual final de DMSO igual a 1%. Ademais, o percentual de inibição de agregação foi calculado de acordo com a seguinte relação⁶⁵:

$$I(\%) = (1 - (F_i/F_0)) \times 100 \text{ (Equação 8)}$$

Onde F_i = Fluorescência do βA_{1-42} tratado com composto, F_0 = Fluorescência do βA_{1-42} .

3.10 – Experimentos Envolvendo Células HeLa

3.10.1 - Cultura Celular

Células de câncer cervical (HeLa) foram cultivadas em meio *Dulbecco Modified Eagle* (DMEM) com glutamina, soro fetal bovino (10%), antibióticos (1%) em CO_2 a 37°C . Após serem tripsinizadas e transferidas para microplacas de 96 poços esterilizadas ($0,5 \times 10^4$ células/poço com volume de 100 μL), foram deixadas na incubadora durante 48 horas para aderência e confluência.

3.10.2 - Estudos de Permeabilidade

3.10.2.1 - Permeabilidade Celular com Acetometoxi Calceína (CAL-AM)

Para investigação da capacidade de permeabilidade de membrana celular, utilizou-se a sonda CAL-AM (acetometoxicalceína, forma permeável da sonda calceína). Após permear a célula e entrar em contato com o citosol, CAL-AM (não-fluorescente) é convertida em calceína (fluorescente) pela ação de esterases. Sobrecarga de Fe é induzida nas células com o

complexo Fe-8-hidroxiquinolina (Fe(8HQ)) suprimindo a fluorescência e somente os quelantes de alta afinidade e capazes de permear a membrana celular podem recuperar a fluorescência da sonda.

Neste experimento, o conteúdo da placa foi removido e adicionaram-se em cada poço 100 μL de CAL-AM (3 μM) em DMEM incolor pré aquecido a 37°C e a microplaca encaminhada para incubadora (5% CO_2 ; 37°C; 20 min). O meio foi retirado e a placa lavada com 100 μL de HBS pré-aquecido a 37°C, e se adicionaram aos poços 100 μL de HBS contendo probenecid (0,5 mM). A fluorescência foi registrada (*BMG Fluostar Optima*; $\lambda_{exc}/\lambda_{ems} = 485/520\text{ nm}$) por 10 minutos. Sequencialmente, foram transferidos 2 μL de Fe(8HQ) (125 μM) aos poços e a leitura prosseguida até a estabilização. Realizou-se uma nova lavagem com HBS e o completando-se o volume dos poços com 100 μL de HBS com probenecid (0,5 mM). Em seguida transferiram-se 1 μL de DTPA (10 mM). Prosseguiu-se com a leitura até a estabilização. Por fim, transferiram-se 1 μL de solução de conjugado (7,5 mM em DMSO) para cada poço e a última leitura foi realizada, observando se ocorreu ou não recuperação de fluorescência. A concentração final dos conjugados é igual a 75 μM com percentual de DMSO igual a 1%.

3.10.2.2 – Determinação do log P utilizando software Marvin Sketch

A lipofilicidade é a tendência de um composto de se dissolver preferencialmente em uma fase apolar em relação a uma fase aquosa. Essa informação é geralmente apresentada como coeficiente de partição (P). O valor de logP dos conjugados foi obtido através de simulação computacional utilizando o software Marvin Sketch 16.6.27.0 (<https://chemaxon.com/products/marvin>). O método padrão do software foi empregado para os cálculos, sendo baseado na contribuição de todos os átomos para gerar o log P⁶⁶. As concentrações dos cátions Na^+ , Cl^- e K^+ foram definidas como 0,1 M. Compararam-se resultados obtidos com a capacidade de recuperação de fluorescência dos quelantes. Este software já foi usado pelo nosso grupo⁶⁷.

3.10.3 – Estudo de Viabilidade Celular com Células HeLa

Desidrogenases mitocondriais de células viáveis provocam clivagem do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) formando azul de formazan. Após se constatar confluência de células nos poços, trocou-se o meio e após aplicação do meio novo 1 μL de solução do conjugados (7,5 mM em DMSO) e 1 μL de FAS (7,5mM), foram transferidos para cada poço. A concentração final dos conjugados é igual a 75 μM com percentual de DMSO igual a 1%. A microplaca foi incubada por 24 horas, depois disso, o meio foi aspirado e 100 μL de MTT (1,5 mM em HBS) foram adicionados e a placa incubada por 2 horas. Em seguida, o meio foi aspirado, 100 μL de DMSO adicionados e agitou-se a placa durante 2 min.. A absorbância foi medida no Spectra Max M4; $\lambda = 570 \text{ nm}$.

3.11 - Estatística

No caso dos ensaios biológicos, análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 6.0 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) com ANOVA de uma via (para um grupo) seguido do teste de Tukey. Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (SD) e considerados significantes quando $p < 0,05$.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4- Resultados e Discussão

4.1. – Síntese e Caracterização dos Ácidos Carboxílicos

4.1.1. - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos ácidos são apresentados nas figuras A1 a A8 nos anexos desta tese. Observa-se nos espectros de RMN ^1H dos ácidos, um próton (-NHCO) singlete com deslocamento em 9,92 ppm; e um próton (-COOH) singlete com deslocamento próximo a 12,1 ppm⁴⁵. Verifica-se na integração, o número esperado de prótons em cada ácido sintetizado. Os picos do grupo (-NHCO) da amida são deslocados para campo baixo devido ao efeito de anisotropia dos elétrons π dos anéis aromáticos. Já no caso do grupo -COOH, a troca de próton com deutério reduz a intensidade de sinal do próton do grupo carboxila, encontrado entre 11 e 12 ppm. Nos espectros de ^{13}C RMN, apresentaram deslocamentos em 174,1 ppm (-NHCO) e 170 ppm (-COOH). O carbono do grupo amida apresenta maior intensidade devido ao efeito nuclear overhauser. Os grupos (-CH₂) da cadeia alifática apresentam deslocamentos entre 29 e 31 ppm. Essa diferença se refere à maior proximidade de um dos grupos (-CH₂) ao grupo (-COOH), em função da eletronegatividade dos átomos de oxigênio que provocam maior desblindagem dos prótons comparado com átomo de nitrogênio do grupo amida.

Ácido 4-oxo-4-(fenilamino)butanóico (ROD003) - RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 12,10 (s, 1H); 9,92 (s, 1H); 7,61 – 7,51 (m, 2H); 7,33 – 7,20 (m, 2H); 7,06 – 6,94 (m, 1H); 2,61 – 2,47 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO-d₆): δ 174,25 ; 170,48 ; 139,72 ; 129,09 ; 123,33 ; 119,32 ; 31,47 ; 29,24.

Ácido 4-oxo-4-((sufamoilfenil)amino)butanóico(ROD007)- RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 12,14 (s, 1H); 10,29 (s, 1H); 7,72 (s, 4H); 7,22 (s, 2H); 2,65 – 2,47 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO-d₆): δ 174,19; 171,17; 142,58; 138,47; 127,12; 118,84; 31,55; 29,07.

Ácido 4-oxo-4-(naftalen-2-fenilamino)butanóico (ROD020) -RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12,17 (s, 1H); 10,18 (s, 1H); 8,30 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H); 7,88 – 7,73 (m, 3H); 7,56 (dd, $J_1 = 8,9$; $J_2 = 2,1$ Hz; 1H); 7,41 (dddd, $J_1 = 6,9$; $J_2 = 8,0$; $J_3 = 6,8$; $J_4 = 1,3$ Hz; 2H); 2,69 – 2,50 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 174,34 ; 170,86 ; 137,28 ; 133,90 ; 130,03 ; 128,75 ; 127,87 ; 127,66 ; 126,82 ; 124,88 ; 120,25 ; 115,27 ; 31,12 ; 29,23 .

Ácido 4-oxo-4-(quinolin-6-fenilamino)butanóico (ROD021) - RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12,14 (s, 1H); 10,33 (s, 1H); 8,75 (dd, $J_1 = 4,2$, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H); 8,38 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 8,24 (dd, $J = 8,3$; 1,7 Hz, 1H); 7,94 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H); 7,76 (dd, $J_1 = 9,1$, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H), 7,45 (dd, $J = 8,3$; 4,2 Hz, 1H), 2,69 – 2,50 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 174,32; 171,09; 149,29; 144,96; 137,58; 135,89; 129,87; 128,80; 123,62; 122,19; 115,04; 31,55; 29,20.

4.1.2. - Análise por ESI/MS.

Espectros de massa dos ácidos carboxílicos são apresentados nas figuras B1 a B6 nos anexos desta tese. Foi comparado a massa molar teórica com pico do íon molecular encontrado. Identificou-se a presença dos picos dos íons moleculares dos ácidos carboxílicos. Os compostos sintetizados apresentam um importante padrão de fragmentação comum⁶⁸, que envolve a perda de H_2O ($M - 18$) (**Tabela 3**), através de uma segmentação, como no caso do composto A (**Figura 32**):

Tabela 3 - Massa molar e os respectivos picos dos íons moleculares dos compostos

Composto	Massa	Pico do	M-18 (m/z)
	molar (g/mol)	íon molecular (m/z)	
ROD003	193,07	192 (M - H) ⁻	174
ROD007	272,05	273 (M+H) ⁺	255
ROD020	243,09	244 (M + H) ⁺	226
ROD021	244,08	245 (M + H) ⁺	227

Figura 32 - Saída de uma molécula de água através de uma segmentação α no composto A. O mesmo perfil de fragmentação ocorre com os outros ácidos carboxílicos aromáticos sintetizados⁶⁸.

4.1.3. - Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

O fatores de retenção (R_f) dos materiais de partida foram determinados utilizando como eluente clorofórmio:metanol:ácido acético nas proporções 85:10:5 (**Figura 33**):

Figura 33 - Fatores de retenção dos ácidos carboxílicos sintetizados. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido acético (85:10:5)

A diferença entre os fatores de retenção sugere a formação dos ácidos carboxílicos. As aminas aromáticas serão protonadas devido a presença de ácido acético na fase móvel, provocando aumento do R_f o que por sua vez não ocorrerá com os ácidos carboxílicos que terão seu R_f reduzido.

4.1.4. - Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos ácidos carboxílicos (**Tabela 4**) foram determinados:

Tabela 4 - Temperatura de fusão dos ácidos carboxílicos

Material de Partida	Ponto de Fusão (°C)	Composto	Ponto de Fusão (°C)
Anilina	-6,3	ROD003	144-146
Benzosulfanilamida	165	ROD007	204-205
2-aminonaftaleno	113	ROD020	194-195
6-aminoquinolina	119	ROD021	230-232

Verifica-se que os pontos de fusão dos ácidos e de seus materiais de partida são muito distintos. Ácidos carboxílicos são substâncias polares e suas moléculas podem formar ligações de hidrogênio umas com as outras. Isso, como consequência, faz com que esses compostos possuam pontos de fusão elevados.

4.1.5. - Rendimento Químico

O rendimento percentual das reações (**Tabela 5**) foi determinado:

Tabela 5 - Rendimento percentual das reações para obtenção dos ácidos carboxílicos

Composto	Rendimento (%)
ROD003	70
ROD007	50
ROD020	35
ROD021	82

Observa-se que houve uma redução de 20% do rendimento ao se comparar compostos ROD003 e ROD007. Isso ocorreu devido à presença do grupo sulfanilamida que se comporta como grupo retirador de elétrons, reduzindo densidade eletrônica do anel aromático e consequentemente a nucleofilicidade do grupo amino. No caso do composto ROD020, o rendimento foi baixo devido à baixa solubilidade do 2-aminonaftaleno em água.

4.1.6 - Mecanismo da Reação

Todos os ácidos carboxílicos sintetizados envolvem o uso de um nucleófilo neutro e anidrido succínico. O mecanismo de reação (**Figura 34**) é descrito a seguir: na primeira etapa, ocorre um ataque nucleofílico da amina a um dos carbonos da carbonila do anidrido, provocando a formação de um intermediário tetraédrico (zwitterion)⁶⁹. Na segunda etapa, o zwitterion é desprotonado por uma segunda molécula da amina, havendo a formação de um íon alcóxido. Na terceira etapa devido à instabilidade do íon alcóxido, o par de elétrons no átomo de oxigênio retornará, provocando abertura do anel (isso ocorrerá devido a estabilidade do grupo de saída ^-OCOR) e a ligação $C=O$ é reestabelecida⁶⁹.

Figura 34 - Mecanismo da reação explicando a formação dos ácidos carboxílicos⁶⁹

4.2. - Síntese e Caracterização dos Conjugados

4.2.1 - Análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos conjugados são apresentados nas figuras A9 a A16 nos anexos desta tese. Em função de sua semelhança estrutural com DFO, os espectros de RMN dos conjugados foram avaliados baseando-se nos resultados de caracterização deste quelante, realizado por Borgias et al.⁷⁰. As hidroxilas dos conjugados apresentaram simetria nos espectros de ^1H , sendo encontrados entre 9,6 e 9,7 ppm, os grupos metila presentes entre os hidroxamatos (1,54 e 1,12 ppm), também mostram o mesmo padrão simétrico⁷⁰. As metilas que encontram entre os hidroxamatos e as amidas (2,43 e 2,57 ppm) sofrem pequena desblindagem devido ao efeito indutivo provocado por estes grupos. Os sinais correspondentes aos anéis aromáticos são identificados 7,00 e 8,00 ppm. Deslocamentos de sinais foram observados no caso do conjugado DFOQUN. Não é possível, por exemplo, ver os sinais dos 3 protons

grupos hidroxamatos em uma mesma região onde um deles apresenta deslocamento para campo baixo (8,85 ppm). Além disso, ocorre um deslocamento de um hidrogênio de uma das amidas de uma região de campo baixo para para campo alto (em 2,26 ppm). Estes desvios acontecem em função da ligação intramolecular dos hidrogênios presentes do conjugado com o átomo de nitrogênio do anel quinolínico⁷¹. É necessário destacar que os deslocamentos químicos em uma molécula são afetados pelos campos elétricos e campos magnéticos presentes em grupos polarizáveis. Consequentemente mudanças nas correntes magnéticas irão acontecer e a depender da conformação adotada pela molécula, desblindagem ou blindagem de prótons específicos podem acontecer⁷².

DFOANI: RMN ¹H (500 MHz; DMSO) δ 9,92 (s; 1H); 9,66 (s; 1H); 9,61 (s; 2H); 7,84 (t; J = 5,4 Hz; 1H); 7,78 (t; J = 5,3 Hz; 2H); 7,57 (d; J = 7,7 Hz; 2H); 7,27 (t; J = 7,9 Hz; 2H); 7,01 (t; J = 7,4 Hz; 1H); 3,45 (t; J = 6,4 Hz; 6H); 3,05 – 2,96 (m; 6H); 2,58 (t; J = 7,1 Hz; 3H); 2,54 (dd; J = 9,4; 5,1 Hz; 3H); 2,39 (t; J = 7,3 Hz; 2H); 2,27 (t; J = 7,2 Hz; 4H); 1,97 (d; J = 5,0 Hz; 3H); 1,51 (dd; J = 22,7; 16,1 Hz; 6H); 1,37 (d; J = 6,8 Hz; 6H); 1,22 (d; J = 6,7 Hz; 6H). **RMN ¹³C** (126 MHz; DMSO) δ 172,44; 171,78; 171,49; 170,96; 139,80; 129,11; 123,33; 119,37; 47,55; 47,25; 38,90; 32,23; 30,80; 30,37; 29,28; 28,03; 26,49; 23,96; 20,82.

DFOBAN: RMN ¹H (500 MHz; DMSO) δ 10,28 (s; 1H); 9,66 (s; 1H); 9,61 (s; 2H); 7,85 (t; J = 5,5 Hz; 1H); 7,77 (t; J = 5,3 Hz; 2H); 7,74 (d; J = 9,5 Hz; 4H); 7,23 (s; 2H); 3,45 (t; J = 7,0 Hz; 6H); 3,06 – 2,95 (m; 6H); 2,63 – 2,53 (m; 6H); 2,43 – 2,36 (m; 2H); 2,27 (t; J = 7,1 Hz; 4H); 1,96 (s; 3H); 1,55 – 1,44 (m; 6H); 1,42 – 1,34 (m; 6H); 1,22 (d; J = 6,8 Hz; 6H). **RMN ¹³C** (126 MHz; DMSO) δ 172,44; 171,61; 171,37; 142,68; 138,44; 127,13; 118,84; 47,55; 47,25; 32,21; 30,51; 30,37; 29,28; 28,03; 26,50; 23,96; 20,82.

DFONAF: RMN ¹H (500 MHz; DMSO) δ 10,14 (s; 1H); 9,65 (s; 1H); 9,61 (s; 2H); 8,29 (s; 1H); 7,89 – 7,75 (m; 6H); 7,59 – 7,54 (m; 1H); 7,49 – 7,42 (m; 1H); 7,41 – 7,35 (m; 1H); 3,45 (t; J = 7,0 Hz; 6H); 3,01 (td; J = 13,2; 6,6 Hz; 6H); 2,64 – 2,52 (m; 6H); 2,43 (t; J = 7,2 Hz; 2H); 2,27 (t; J = 6,6 Hz; 4H); 1,97 (s; 3H); 1,49 (d; J = 6,3 Hz; 6H); 1,39 (dq; J = 14,8; 7,5 Hz; 6H); 1,22 (d; J = 6,2 Hz; 6H). **RMN ¹³C** (126 MHz; DMSO) δ 172,44; 171,78; 171,49; 171,28; 137,38; 133,93; 130,05; 128,74; 127,89; 127,68; 126,82; 124,87; 120,33; 115,28; 47,55; 47,25; 38,92; 38,89; 32,29; 30,79; 30,37; 29,28; 28,03; 26,50; 23,96; 20,82.

DFOQUN: RMN ¹H (500 MHz; DMSO-d6) δ 10,38 (s; 1H); 9,63 (s; 2H); 8,85 (dd; J = 4,4; 1,5 Hz; 1H); 8,52 – 8,37 (m; 2H); 8,01 (d; J = 9,1 Hz; 1H); 7,85 (dd; J = 9,1; 2,3

Hz; 2H); 7,77 (t; J = 5,4 Hz; 2H); 7,60 (dd; J = 8,4; 4,5 Hz; 1H); 3,01 (dq; J = 13,2; 6,7 Hz; 8H); 2,67 – 2,53 (m; 8H); 2,42 (q; J = 6,9 Hz; 4H); 2,26 (t; J = 7,1 Hz; 5H); 1,95 (s; 3H); 1,54 – 1,44 (m; 6H); 1,41 – 1,33 (m; 6H); 1,26 – 1,12 (m; 6H). **RMN ^{13}C** (126 MHz; DMSO) δ 172,43; 171,79; 171,67; 171,42; 147,89; 138,31; 129,11; 128,42; 128,00; 124,84; 122,32; 114,99; 47,53; 47,24; 38,89; 32,25; 30,64; 30,39; 29,28; 28,02; 26,48; 23,94; 20,79.

4.2.2- Análise por LC-ESI/MS

Espectros de massa dos conjugados purificados por LC-ESI/MS são apresentados nas figuras B1 a B6 nos anexos desta tese. Estes foram obtidos a fim de se comparar a massa molar teórica com pico do íon molecular encontrado (**Tabela 6**). O perfil cromatográfico dos produtos impuros foram monitorados por espectrofotometria UV-Vis em 210 nm e após se obter estas informações, os novos quelantes foram purificados. Cromatogramas UV-vis, espectro de íons e espectro de massas foram obtidos para cada conjugado: Para DFOANI, o perfil cromatográfico mostra a presença de um pico entre 20,1 e 20,5 min; 15,1 e 15,4 min para DFOBAN; 21,9 e 22,3 min para DFONAF e 13,9 e 14,1 min para DFOQUN. Os novos quelantes de ferro apresentam padrão de fragmentação comum⁷³, envolvendo a perda de uma parte do esqueleto da DFO ((M+H) – 243), através de uma transferência de próton (**Figura 35**):

Tabela 6 - Massa molar e os respectivos picos dos íons moleculares dos conjugados

Composto	Massa	Pico do	
	molar (g/mol)	íon molecular (m/z)	(M + H) – 243
DFOANI	735,37	736 (M + H) ⁺	494
DFOBAN	814,95	815 (M+H) ⁺	573
DFONAF	785,94	786 (M + H) ⁺	544
DFOQUN	786,97	787 (M + H) ⁺	545

Figura 35 - Padrão de fragmentação dos conjugados de DFO⁷³

4.2.3 - Análise Elementar

Os compostos purificados foram encaminhados para análise elementar (%CHN) a fim de se determinar sua composição, os dados são apresentados nas **Tabelas 7 e 8**:

Tabela 7 - Dados de Análise Elementar (%CHN) dos Conjugados, o limite de variação é 0,4%. teor. = teórico, exp. = experimental, Δ = diferença entre o valor teórico e experimental

Composto	Carbono			Hidrogênio			Nitrogênio		
	%teor.	%exp.	$ \Delta\% $	%teor.	%exp.	$ \Delta\% $	%teor.	%exp.	$ \Delta\% $
DFOANI	57,13	55,64	1,49	7,81	7,85	0,04	13,32	12,87	0,45
DFOBAN	51,58	50,81	0,77	7,17	7,21	0,04	13,75	13,21	0,54
DFONAF	59,60	59,95	0,35	7,57	7,89	0,32	12,48	12,01	0,47
DFOQUN	58,00	58,28	0,28	7,43	7,53	0,09	14,24	14,11	0,13

Tabela 8 - Comparativo entre as fórmulas moleculares teóricas e experimentais dos conjugados.

Composto	Fórmula molecular teórica	Fórmula molecular experimental
DFOANI	$C_{35}H_{57}N_7O_{10}$	$C_{35}H_{57}N_7O_{10} \cdot 0,4CH_3OH \cdot 0,95H_2O$
DFOBAN	$C_{35}H_{58}N_8O_{12}S$	$C_{35}H_{58}N_8O_{12}S \cdot 0,55CH_3OH \cdot 0,45H_2O$
DFONAF	$C_{39}H_{59}N_7O_{10}$	$C_{39}H_{59}N_7O_{10} \cdot 0,1CH_3OH$
DFOQUN	$C_{38}H_{58}N_8O_{10}$	$C_{38}H_{58}N_8O_{10}$

O software Jasper 2.0 foi utilizado para identificação de impurezas e solventes nas amostras. Verificou-se a presença de metanol e água nos conjugados, o que não é surpreendente, pois estes solventes, foram usados na etapa de lavagem dos produtos brutos. Nosso grupo de pesquisa já lidou com situação semelhante no trabalho de Alta, E.C P et al³⁸, durante a purificação e caracterização do quelante DFCAF.

4.2.4 – Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

O fatores de retenção (R_f) dos conjugados foram determinados utilizando como eluente clorofórmio:metanol nas proporções 80:20 (**Figura 36**):

Figura 36 - Fatores de retenção dos conjugados sintetizados. Eluente: clorofórmio:metanol (80:20)

Percebe-se que os conjugados apresentaram maior tempo de retenção na fase móvel que a DFO, isso sugere que lipofilicidade dos quelantes aumentou em função da presença dos anéis aromáticos em sua estrutura. Este aumento é um fator essencial para que os quelantes consigam permear membranas celulares tendo acesso aos depósitos de ferro intracelulares LIP, além de aumentar a possibilidade de acesso ao cérebro, transpondo a BBB.

4.2.5 - Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos conjugados (**Tabela 9**) foram determinados:

Tabela 9 - Temperatura de fusão dos conjugados. *Desferrioxamina apresenta ponto de fusão entre 138-140°C⁷⁴

Quelante	Ponto de Fusão (°C)
DFOANI	180-182
DFOBAN	184-185
DFONAF	180-182
DFOQUN	143-145

O ponto de fusão da DFO é em média 40°C menor que os conjugados DFOANI, DFOBAN e DFONAF. DFOQUN possui ponto de fusão reduzido com relação aos demais conjugados, isso se deve a sua conformação adotada devido ao nitrogênico presente no anel quínolínico.

4.2.6. - Rendimento Químico

Para purificação, 250 mg de composto bruto foi dissolvido em 14 mL de DMSO, para purificação em RP- HPLC, obtendo-se rendimento percentuais isolados das reações (**Tabela 10**) :

Tabela 10 - Rendimento percentual das reações para obtenção dos conjugados

Composto	Rendimento Químico(%)
DFOANI	26,7
DFOBAN	24,9
DFONAF	43,8
DFOQUN	24,3

Um dos pontos a se destacar neste trabalho, é a dificuldade de se obter grandes quantidades de material purificado com o uso de HPLC. As etapas de lavagem, bem como variação de gradientes aumentam a perda do produto. Além disso, não se pode purificar grandes quantidades de material utilizando HPLC, neste caso a quantidade limite foi 250 mg de produto bruto. Embora durante a síntese dos conjugados, obteve-se quantidades de produtos bruto variando entre 0,4 a 0,6 g de material

4.2.7 - Mecanismo da Reação

O mecanismo de reação envolve o acoplamento da DFO ao ácido carboxílico (**Figura 37**). Na primeira etapa, EDC abstrai um hidrogênio do grupo hidroxila, o oxigênio negativamente carregado realiza um ataque nucleofílico ao carbono do EDC formando um éster⁶⁹. Na segunda etapa, HOBt forma um intermediário tetraédrico promovendo a saída de EDC que adquire uma estrutura semelhante à uréia, formando um segundo éster. Na etapa final, o grupo amino da DFO realiza um novo ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do éster promovendo a saída do HOBt, formando uma ligação peptídica e se acoplando a fração remanescente do ácido⁶⁹. O reagente EDC é utilizado na transformação de ácidos carboxílicos em ésteres, comportando-se como melhor grupo abandonador que hidroxila, ativando o carbono da carbonila, possibilitando acoplamento com outras moléculas. O grupo amino da DFO pode atacar diretamente este primeiro éster formado, contudo, existe um problema na formação de produtos não desejados em função de sua cinética lenta. O HOBt é adicionado com o intuito de se interceptar o primeiro éster formado⁶⁹. O par de elétrons π do grupo azida se encontra em ressonância com os elétrons π do anel aromático, o que conferirá maior estabilidade ao HOBt ao se comportar como grupo de saída na etapa final no mecanismo descrito. Essa estabilidade diminui a energia livre de Gibbs de ativação, aumentando a cinética da reação.

Figura 37 - Mecanismo que descreve a formação dos conjugados de DFO⁶⁹

4.3. - Estudos de Competição com Calceína

A afinidade dos conjugados de DFO por ferro foi avaliada utilizando-se a sonda fluorescente calceína através de fluorimetria. Calceína é uma sonda fluorescente que possui elevada afinidade por Fe(III) ($\log K_{ML} = 24$)⁷⁵, constituída por um fragmento de fluoresceína como fluoróforo e dois iminodiacetatos como complexantes. Sua interação com o metal provoca supressão de fluorescência, apresentando proporção 1:1 (**Figura 38**). A complexação de ferro pela calceína ocorre devido aos átomos de oxigênios da sonda que atuam como bases duras, ligando-se a ferro em sua forma ferrosa que rapidamente se oxida a Fe(III) se comporta como ácido duro, de acordo com a teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson. O complexo formado apresenta simetria octaédrica⁷⁶.

Figura 38 - Complexação da Sonda Calceína com Fe(III)⁷⁵

Acredita-se que a supressão de fluorescência ocorra devido à natureza paramagnética de Fe(III) com orbitais d incompletos, possibilitando transferência de elétrons do ligante para o metal, promovendo decaimento não radiativo do estado excitado⁷⁷.

Ao se adicionar um quelante, a tendência é que haja uma competição entre ele e a calceína pelo ferro. Se a afinidade do quelante for elevada o suficiente (o que é interessante para a terapia de quelação), a calceína deve tornar a fluorescer. Um equilíbrio de competição ocorre entre a calceína e o quelante DFO que removerá Fe(III) da sonda em função de sua maior afinidade pelo íon metálico ($\log K_{ML} = 30,6$)⁷⁸. Diferentes anéis aromáticos foram acoplados ao grupamento amino terminal da DFO, através da formação de amidas. A fluorescência da sonda

com conjugados (sem Fe) e curvas de recuperação de fluorescência foram obtidas de acordo com as Figuras 39, 40, 41 e 42 :

Figura 39 - Fluorescência da sonda calceína após 1 hora na ausência de Ferro. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N = 2 experimentos realizados em duplicata

Figura 40 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 30 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N = 2 experimentos realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%

Figura 41 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 60 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de N=2 realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%

Figura 42 - Fluorescência da sonda calceína suprimida pela presença de ferro. O gráfico mostra a recuperação de fluorescência da sonda 120 minutos após a adição dos conjugados de DFO. Os valores de recuperação de fluorescência correspondem a média $\pm$ desvio padrão de $N = 2$ realizados em duplicata. O percentual final de DMSO é igual a 5%

Os quelantes em pH fisiológico apresentam diferentes perfis cinéticos de acordo com os resultados mostrados, o que indica que os anéis aromáticos alteram os sítios de ligação dos conjugados de DFO. Por exemplo, o conjugado DFONAF não apresenta recuperação de fluorescência devido às características eletrônicas do anel naftalênico. O efeito indutivo negativo no conjugado é observado, prejudicando a interação dos grupos hidroxamatos e Fe(III) no ambiente de coordenação⁷⁹. A hidrofobicidade reduzirá a liberação de moléculas de água que solvatam o íon metálico para o meio aquoso, o que não é favorável termodinamicamente para a formação do complexo⁷⁹. O conjugado DFOANI apresenta aumento de recuperação de fluorescência, como apresenta um anel aromático a menos que DFONAF, a interação entre os grupos hidroxamatos e Fe(III) não é gravemente comprometida. É válido ressaltar que Fe(III) se encontra em um ambiente de coordenação hidrofílico, neste caso com os grupos iminodiacetatos da calceína. O anel benzênico presente alterará o equilíbrio competitivo entre o conjugado e a sonda de forma que o complexo demore mais tempo para encontrar sua conformação mais estável⁷⁹. Comparado com DFOANI, o quelante DFOBAN apresenta um maior percentual de recuperação de fluorescência na concentração de 15 μM . Possivelmente devido a participação do átomo de nitrogênio da benzosulfanilamida. Entretanto, a coordenação dos pares de elétrons do átomo de nitrogênio não é efetiva, em função do mesmo encontrar em ressonância com o oxigênio ligado ao enxofre do grupo sulfanilamida. O quelante DFOQUN apresenta uma cinética de recuperação de fluorescência similar a DFO, a presença do átomo de nitrogênio da quinolina deve favorecer a formação de uma conformação mais estável. Este átomo, diferentemente do nitrogênio do grupo benzosulfanilamida, não se encontra em ressonância com o anel aromático, em função da não sobreposição dos orbitais p do anel com orbital p do nitrogênio com os pares de elétrons isolados⁶⁹. Como consequência, o quelante DFOQUN deve apresentar um ponto de coordenação a mais que os outros conjugados. A razão quelante metal e propriedades eletrônicas serão discutidas no próximo tópico.

4.4 - Espectroscopia no Ultravioleta e Visível

Espectros eletrônicos foram obtidos, a fim de se avaliar, transições eletrônicas presentes em DFO e seus conjugados. Máximos de absorção dos complexos foram avaliados para verificar a presença da coordenação octaédrica com ferro. O espectro UV-VIS da DFO e conjugados (**Figura 43**) mostram uma intenso pico de absorção em 230 nm. Esta banda está relacionada a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da conjugação entre par de elétrons do nitrogênio e oxigênio da carbonila presente nos grupos hidroxamatos⁸⁰. A absorbância dos conjugados na

mesma região é mais intensa devido ao grupo amida dos *linkers*, que apresentam transições $\pi \rightarrow \pi^*$ entre 194-210 nm⁸⁰. Os conjugados possuem bandas de mais alargadas em seu espectro, em função dos anéis benzênicos que apresentam picos de absorção entre 184 e 256 nm⁸¹. No conjugado DFOQUN, o grupo quinolina, apresenta transições $\pi \rightarrow \pi^*$ associadas a dois picos em 263 e 330 nm⁸¹. É possível verificar a formação dos complexos nos espectros eletrônicos (**Figura 44**), devido a uma banda característica com máximo de absorção em 430 nm⁸². Crumbliss, A.L. et al⁸². atribuem esta banda a transições de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM) e permitidas por spin, neste caso, o íon Fe(III) com configuração eletrônica d^5 em complexos de geometria octaédrica. Conhecendo-se o pico de absorção correspondente a formação dos complexos, curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de absortividade molar foram determinados (**Figura 45**). Todos os complexos dos conjugados apresentam um ϵ menor que o complexo [Fe(DFO)]. Uma possível explicação seria a geometria associada a cada complexo, prejudicando sobreposição entre os orbitais associados aos ligantes e metais e interferindo nas transições eletrônicas, consequentemente reduzindo ϵ .⁸³.

Figura 43 - Espectros UV-VIS de DFO e seus conjugados (0,5 mM em 30% DMSO)

Figura 44 - Espectros eletrônicos dos complexos (0,5mM em 30% DMSO). A banda de formação do complexo se encontra em 430 nm.

Figura 45 - Curvas de calibração para DFO e conjugados (30% em DMSO)

Neste estudo, não foi observado a formação do complexo [Fe(DFONAF)], em função do ambiente altamente hidrofóbico criado pelo grupo naftalênico, que não favorece a coordenação entre o quelante e o ferro.

4.5 - O Método das Variações Contínuas (Job's Plot)

O Método das Variações Contínuas conhecido como Job's Plot é o método mais comumente usado na determinação estequiométrica dos coeficientes n e m em uma reação química:

Onde A e B representam as espécies livres no equilíbrio e A_nB_m , os complexos moleculares de A e B⁸⁴. Neste método, parâmetros proporcionais a concentração do complexo A_nB_m são plotados contra a fração molar de um dos reagentes, enquanto a soma das concentrações dos reagentes é mantida constante⁸⁴. Em termos de equilíbrio, a mais alta concentração do complexo A_nB_m e portanto o máximo do Job's Plot é dada por:

$$X = \frac{n}{n + m} \text{ Equação 2}$$

Sendo X a fração molar de A no ponto máximo da curva. Por causa de sua utilidade e simplicidade, Job's Plot tem sido utilizado em uma variedade de sistemas, incluindo complexos metálicos⁸⁴. Neste estudo, a concentração máxima dos complexos formados é igual a 0,5 mM; variando-se volumes de Fe e quelantes para se obter informações sobre a razão metal:ligante (M:L). A **Figura 46**, mostra o diagrama de Job's Plot para os sistemas [Fe(DFO)] e [Fe(DFOANI)]. Verifica-se em ambos diagramas, uma absorbância máxima com uma fração molar do metal igual a 0,5 indicando uma razão **1:1** de acordo com a literatura⁸². O caso do complexo [Fe(DFOANI)] é curioso que a estequiometria é 1:1, mesmo com a presença dos grupos carbonílicos do *linker*. É necessário averiguar que o anel benzênico é um substituinte do nitrogênio do grupamento amidico. O efeito estérico neste caso será determinante e não permitirá a coordenação dos átomos de oxigênio das carbonilas com ferro. A fração molar de ferro na presença dos quelantes DFOBAN e DFOQUN é igual a 0,33 (**1:2**) (**Figura 47**); isso

sugere presença de um ambiente de coordenação extra. Possivelmente os grupos quinolina e benzosulfanilamida, que são ligantes capazes de se coordenar ao metal. O acoplamento de outras moléculas que se comportam como ligantes a DFO, podem aumentar a razão metal ligante, promovendo bloqueio nos sítios de coordenação do ferro e principalmente evitando a geração de ROS⁴⁷. Esta é uma característica importante de um quelante para o tratamento de sobrecarga de ferro e será discutida nos próximos tópicos.

Figura 46 - Estudo da estequiometria dos complexos formados entre Ferro e (a) DFO, (b) DFOANI variando-se o nº de mol de cada reagente. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata, o percentual de DMSO é igual a 30%. As cores azul e laranja correspondem a duas retas, cada qual com seu próprio r quadrado e linearidade. Quanto maior a linearidade, menor o erro associado a determinação da razão estequiométrica dos complexos.

Figura 47 - Estudo da estequiometria dos complexos formados entre Ferro e (a) DFOBAN, (b) DFOQUN variando-se o n° de mol de cada reagente. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata, o percentual de DMSO é igual a 30%. As cores azul e laranja correspondem a duas retas, cada qual com seu próprio r quadrado e linearidade. Quanto maior a linearidade, menor o erro associado a determinação da razão estequiométrica dos complexos.

4.6 - Ensaio Anti-Oxidantes

4.6.1 - Sistema Ferro Ascorbato

Dihidrorodamina (DHR) comporta-se como bom marcador fluorescente devido à sua pouca seletividade por oxidantes, ao mesmo tempo que tem elevada sensibilidade para a detecção da atividade oxidante causada por ferro. A taxa de oxidação na presença de ascorbato e Fe(III) (**Figura 48**) é medida de acordo com o aumento da fluorescência no decorrer do tempo. A reação entre Fe(III) e ascorbato origina ROS que converterá DHR (não fluorescente) em rodamina (fluorescente)⁸⁵. A oxidação da sonda DHR pode ser impedida na presença de ligantes que bloqueiam os sítios de coordenação de Fe(III).

Figura 48 - Oxidação do DHR (não-fluorescente) a rodamina (fluorescente) na presença de Fe(III) e ascorbato

Complexos de ferro de baixo peso molecular como Fe(NTA), são redox-ativos na presença de níveis fisiológicos de ascorbato. Um quelante que apresenta inibição da oxidação como DFO, poderá ter boas chances de ter sucesso clínico.

A presença de ferro não heme, oxigênio e ascorbato no plasma sanguíneo, representam uma fonte potencial de ROS. Essas reações indesejáveis são combatidas pelo nosso organismo por moléculas de transporte protetoras como a transferrina e antioxidantes como a Vitamina E⁵⁰. Contudo, em uma situação de sobrecarga de ferro, ocorrerá desbalanço nas atividades pro e antioxidantes, promovendo complicações clínicas em um paciente devido a fração LPI do grupo NTBI⁵⁰.

A redução da capacidade antioxidante provocada pelo excesso de ferro em nosso organismo, pode ser combatida com o uso de quelantes como a DFO. Os resultados (**Figura 49**) mostram que atividade antioxidante dos conjugados (exceto DFONAF), apresenta comportamento similar ao da DFO, o que era esperado em função do ambiente de coordenação envolvido (1:1 para Fe:DFO e Fe:DFOANI e 1:2 para Fe:DFOBAN e Fe:DFOQUN). Na química de coordenação, quelantes hexadentados formam complexos inertes, devido a sua habilidade de saturar a esfera de coordenação do metal. Essa característica do complexo, provocará restauração do balanço redox do ferro e redução de danos a moléculas biológicas⁸⁶.

Figura 49 - Atividade antioxidante de DFO e seus conjugados contra a oxidação de ascorbato catalisada por ferro. Fe(NTA) = 2 μM, Ascorbato = 40 μM, DHR = 50 μM. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicata (O percentual final de DMSO é igual a 5%).

4.6.2 – Sistema DPPH

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre que apresenta deslocalização de carga ao longo da molécula. Essa deslocalização leva a coloração violeta da solução metanólica de DPPH, monitorada em 520 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com alguma substância que se comporte como doador de hidrogênio, ele sofre redução (**Figura 50**). A coloração do DPPH muda de violeta para amarelo⁸⁷.

Figura 50 - Conversão do DPPH radicalar em sua forma não radicalar

No desenvolvimento do estresse oxidativo, ocorre a formação do chamado ânion superóxido através da transferência de um elétron para o oxigênio molecular. Este processo é promovido, principalmente pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e pela nicotina adenina dinucleotideo fosfato (NADPH)⁹. Entre 1 a 3% dos elétrons deixam a cadeia de transferência para formação de superóxido. O superóxido por sua vez é convertido em peróxido pela ação das superóxido dismutases, níveis elevados de ambos levam a formação de radicais hidroxila através da reação de Haber-Weiss⁸⁸. Desferrioxamina é um poderoso agente antioxidante capaz de interromper este processo danoso ao nosso organismo^{89,90}. Neste experimento, verifica-se que os grupos hidroxamatos em sua estrutura são responsáveis pela doação de prótons convertendo DPPH em sua forma não radicalar. A atividade antioxidante dos conjugados de DFO

(Figura 51) é reduzida pelos anéis benzênicos em suas estruturas devido a promoverem bloqueio parcial de seus sítios de coordenação⁹⁰.

Além do fator conformacional, deve-se considerar o efeito do solvente. Metanol é um solvente polar com constante dielétrica igual a 32,6⁸³; suas moléculas formarão ligações de hidrogênio com a molécula de DFO. Diferentemente, os conjugados possuem frações apolares, provocando maior solvatação dos grupos hidroxamatos, prejudicando a transferência de prótons para a molécula de DPPH. Neste experimento, verifica-se que DFO e conjugados podem promover proteção contra o estresse oxidativo, independente de se comportarem como quelantes de ferro.

Na primeira parte desta tese, foram avaliadas atividade quelante, estequiometria e ação antioxidante dos conjugados, que se mostraram promissores. Isso possibilita o uso destas moléculas no combate a toxicidade induzida por ferro. O modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) foi escolhido para estes estudos, realizados no durante doutorado sanduíche no Albert Einstein College of Medicine (Cidade de Nova York – EUA) e serão discutidos a seguir.

Figura 51 - Atividade Antioxidante dos conjugados contra DPPH. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicata (DPPH = 0,1mM em metanol, o percentual final de DMSO é igual a 5%).

4.7 - Toxicidade induzida por ferro: Ensaio de Letalidade

C. elegans é um organismo de vida livre que habita os solos, utilizado como modelo para estudo sobre sistemas biológicos. Este modelo possui processos celulares e moleculares similares a outros animais que cruzam a linha de evolução do tempo (metabolismo, estrutura e funcionamento de organelas, regulação de genes, etc). Isso faz com que este nematóide seja usado em diferentes estudos envolvendo farmacologia, biologia e toxicologia deste seu estágio inicial (L1) até seu estágio adulto (L4)⁴⁰. Diferentes dosagens de ferro foram avaliadas nos vermes no estágio L1 (**Figura 52**), considerado mais sensível. Após tratamento, foi possível verificar dois aspectos comportamentais importantes: 1- O excesso de ferro promoveu redução no desenvolvimento do *C. elegans* em seu estágio L4; 2- A locomoção dos vermes tratados com ferro era mais lenta comparado ao controle.

Os resultados mostram aumento de mortalidade dos vermes conforme aumento da concentração de ferro, sugerindo geração de ROS. Utilizando o software Graphpad Prism, uma curva de dose-resposta foi construída, obtendo-se o valor de LC₅₀ igual a 13,6 mM. Sendo uma concentração elevada para efeito agudo, não significa que doses menores em tempos prolongados também não sejam prejudiciais. Pelo parâmetro comportamental, indícios de danos a neurônios neste modelo animal pela exposição de ferro foram observados, o que do ponto de vista molecular, pode ser verificado de acordo com a literatura:

FAGUNDEZ e colaboradores⁹¹ investigaram a possibilidade de neurônios dopaminérgicos sofrerem danos devido a exposição aguda de ferro, usando *C. elegans* linhagem BY200 que expressa a proteína GFP (*green fluorescent protein*) em diferentes neurônios. Os resultados mostram decaimento de fluorescência após exposição com ferro, indicando presença de neurodegeneração.

Ferro promove produção de ROS, um elemento chave no processo de envelhecimento. O estresse oxidativo provoca danos ao grupo Fe-S, levando a proteína IRP-1 (*iron regulatory protein 1*) a entrar em colapso, alterando a homeostase do ferro, prejudicando a expressão de proteínas de estocagem e transporte para este metal tais como ferritina e transferrina⁹². A sobrecarga de ferro nos vermes, provoca danos aos fenótipos e mudanças no comportamento dos vermes. Estes efeitos adversos induzem uma ruptura na função sináptica dos vermes, interrompendo a comunicação entre os neurônios e células dos músculos, reduzindo sua locomoção e posteriormente induzindo a morte⁹².

Figura 52 - Ensaio de letalidade de Ferro em linhagem *C. elegans* Bristol N2. OS resultados mostram o% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$)

4.8 - Tratamento para Sobrecarga de Ferro: Ensaio de Sobrevivência

No ensaio de letalidade, dosagens de Fe foram aplicadas aos vermes a fim de se adquirir informações sobre o LC₅₀. Diferentes concentrações de DFO e percentuais de DMSO foram usadas, fixando-se a concentração de Fe em 13,6 mM, buscando aumentar o percentual de sobrevivência dos vermes. Entretanto, devido à elevada concentração de Fe, não houve sucesso. Consequentemente, optamos por trabalhar com a menor concentração de Fe (6,2 mM) que apresenta uma taxa de mortalidade igual a 27,2 %, um valor de $p < 0,05$ com diferença estatística significativa em relação ao controle, para induzir mortalidade ao *C. elegans*.

Os resultados (**Figura 53**) mostram um aumento do percentual de sobrevivência dos vermes utilizando DFO (5 μ M) e percentual de DMSO igual a 0,03%. No estágio L1, o SNC do animal não está completamente desenvolvido, tornando-o sensível a qualquer tipo de perturbação externa, o que justifica o uso de baixas concentrações de DFO. Desferrioxamina apresentou proteção contra a sobrecarga de Fe induzida neste modelo. Com as condições estabelecidas no ensaios de sobrevivência com DFO, os conjugados foram avaliados (**Figuras 54 e 55**). Os quelantes DFOANI e DFONAF reduziram o percentual de sobrevivência dos vermes, mesmo bloqueando pontos de coordenação do Fe. Uma possível explicação para isso, seria a inibição da enzima ATP sintase que catalisa a fosforilação de ADP em ATP na cadeia de transporte de elétrons⁹³. Os anéis benzênico e naftaleno dos quelantes podem atuar no sítio catalítico desta enzima através de interações hidrofóbicas, interrompendo a síntese de ATP⁹³. Neste ensaio, somente o quelante DFOQUN reduziu a mortalidade de vermes provocada pelo ferro. Este conjugado possui um ponto de coordenação a mais comparado com os demais, reduzindo a ação de ROS. Sendo assim, será a única molécula a ser avaliada nos próximos estudos com *C. elegans*.

Figura 53 - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFO (2,5 μ M;% DMSO igual a 0,015), (b) DFO (5 μ M;% DMSO igual a 0,03); (c) DFO (10 μ M;% DMSO igual a 0,06). Ferro e o quelante foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. Os resultados mostram o% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

Figura 54 - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFOANI (5 μM) e (b) DFONAF(5 μM) com% DMSO igual 0,03 . Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. Os resultados mostram 0% de sobrevivência 48 horas após exposição com metal . Cada barra representa a Média ± Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001), NS = Não significante

Figura 55 - Tratamento da linhagem *C. elegans* Bristol N2 contra sobrecarga de Ferro (6,2 mM) com (a) DFOBAN (5 μ M) e (b) DFOQUN (5 μ M) com % DMSO igual 0,03.. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. Os resultados mostram o % de sobrevivência 48 horas após exposição com metal. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), NS = Não significante

4.9 - Estudo de especiação de Fe(II) com software CHEAQS NEXT

Nos ensaios de letalidade e sobrevivência, doses dos conjugados em faixa de concentração na escala micromolar, foram empregadas para se obter melhora na taxa de sobrevivência dos vermes. A concentração de Fe(II) no entanto, não se encontra em na escala de concentração milimolar, em função do seu elevado potencial de oxidação, sendo oxidado rapidamente a Fe(III). Para se obter informações consistentes sobre a concentração de ferro livre presente, utilizou-se o software CHEAQS NEXT, usado para calcular equilíbrios químicos em sistemas aquosos. Atráves de um *input*, ele fornece dados de especiação química ao usuário. De acordo com a análise realizada pelo software (ANEXO), Fe(II) na forma livre, apresenta uma concentração igual a 0,89 μM . Um resultado coerente com a dosagem dos quelantes (5,0 μM) escolhida para tratamento dos vermes.

4.10 - Estudo da Atividade da Acetilcolinesterase com *Amplex Red*

Acetilcolinesterase é uma enzima que promove a interrupção da neurotransmissão do sistema nervoso colinérgico, catalisando a hidrólise da acetilcolina. Este neurotransmissor apresenta papel importante na cognição, contudo sua atividade é interrompida durante o desenvolvimento da DA⁹⁴.

Com auxílio do kit *Amplex Red*, foi possível determinar a atividade da AChE *in vitro* (somente a enzima) e *in vivo* (empregando *C. elegans* como modelo). A atividade da AChE é monitorada (**Figura 56**) indiretamente usando 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina (*Amplex Red*). A AChE converte o substrato acetilcolina em colina, que é então oxidada pela colina oxidase em betaína e H_2O_2 . Na presença de Horseradish Peroxidase, o peróxido reage com o reagente *Amplex Red* em uma razão estequiométrica de 1:1 para gerar a resorufina (fluorescente).

Figura 56 - Ensaio do Amplex red para medir a atividade da AChE⁹⁵

O uso de inibidores bloqueia o sítio catalítico da AChE, impedindo a conversão de Acetilcolina em Colina e consequentemente a produção de Resorufina. É comprovado que a liberação de Acetilcolina, promove melhora no déficit colinérgico em um paciente com DA 96,28,36.

O principal fundamento da estratégia MTDL é o ligante em estudo atacar diferentes alvos simultaneamente. Neste caso, a inibição da atividade da AChE pelos conjugados foi realizada a fim de se comprovar a natureza bifuncional destas moléculas. DFOQUN apresentou significativo aumento no percentual de inibição de atividade da AChE, comparado com DFO ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ em 15 e 60 minutos) e demais conjugados (**Figuras 57 e 58**). Tacrina (controle positivo) e DFOQUN apresentam similaridade estrutural devido ao anel quinolínico em seus esqueletos. Este núcleo liga DFOQUN ao CAS por meio das interações do tipo π - π stacking com o anéis benzênicos de fenilalanina e indólicos de triptofano^{97,98}. O nitrogênio protonado do anel quinolínico estabelece uma ligação de hidrogênio com histidinas⁹⁹. Nos primeiros 15 minutos com adição de Fe, Tacrina apresenta sua capacidade de inibição reduzida significativa, comparado com DFOQUN ($p < 0,001$). Após 60 minutos, não foi observada diferença estatística entre DFOQUN e Tacrina na presença de Fe. É possível que o complexo formado entre DFOQUN e Fe seja um metalofármaco. As **Figuras 59 e 60** mostram os resultados da atividade da AChE em *C. elegans*.

DFO e DFOQUN comparadas com Tacrina não apresentaram diferença significativa na inibição da AChE em *C. elegans* em 60 minutos, demonstrando a capacidade dos Conjugados e da própria DFO para atuarem como anti-AChE. Além disso, os ensaios *in vitro* mostram que não seria possível DFO e DFOQUN apresentarem mesmo percentual de inibição que a Tacrina. Entretanto, assim como os vertebrados, *C. elegans* apresenta expressão gênica da

AChE, neste caso quatro genes codificados são responsáveis por este processo (ace-1, ace-2 ace-3 e ace-4)¹⁰⁰. A inibição da expressão destes genes pode desencadear desbalanço na atividade colinérgica do nematoide, isso poderia ser um efeito da ação dos conjugados no verme, contudo, estudos de PCR seriam necessários para se confirmar esta suposição.

Figura 57- Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE em 15 minutos. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativa

Figura 58 - - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE em 60 minutos. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

Figura 59 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE da linhagem *C. elegans* Bristol N2 em 15 minutos. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

Figura 60 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na atividade da AChE da linhagem *C. elegans* Bristol N2 em 60 minutos. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

4.11 - Estudo de Análise Comportamental - *Body Bend*

Este teste comportamental tem como objetivo avaliar a função motora de um verme pela contagem do número de curvaturas corporais durante um período de 20 segundos⁴⁴. O número de curvaturas permite estudar possíveis danos aos neurônios motores colinérgicos relacionados à locomoção do animal¹⁰¹. No tratamento 1 (**Figura 61**), houve aumento significativo do número de curvaturas dos vermes tratado com Fe na presença de DFO e DFOQUN ($p < 0,001$) comparado com aqueles expostos somente a Fe. Não foi observado diferença estatística entre DFO e DFOQUN. No tratamento 2 (**Figura 62**), DFOQUN promoveu aumento no número de curvaturas dos vermes expostos ao Fe ($p < 0,01$), o que não foi observado no caso da DFO. Não houve diferença significativa entre os vermes expostos a Tacrina, DFO e DFOQUN na ausência de Fe. É necessário destacar que a falta de alimentação no tratamento 1, provoca estresse no verme, desregulando os neurônios motores no SNC pela falta de ATP e produção de ROS.

O neurotransmissor acetilcolina possui papel importante nas funções cognitivas como processo de memorização e aprendizagem em nosso cérebro, ademais, é o responsável por atuar nas junções neuromusculares no SNC. Em *C. elegans*, acetilcolina possui a mesma função de induzir a locomoção do animal pela contração dos músculos¹⁰². As espécies reativas de oxigênio induzem destruição do sistema colinérgico, interrompendo as sinapses, ou seja, a comunicação entre os neurônios motores e as células musculares no verme. O aumento do número de curvaturas pelo conjugado DFOQUN em conjunto com os resultados de inibição da AChE, comprova sua eficácia para manter os níveis de acetilcolina na presença e ausência de Fe.

Figura 61 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na locomoção da linhagem *C. elegans* Bristol N2 no Tratamento 1. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com percentual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

Figura 62 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na locomoção da linhagem *C. elegans* Bristol N2 no Tratamento 2. Ferro e os quelantes foram adicionados ao mesmo tempo em cada amostra. A concentração de Conjugados, Tacrina e Ferro = 15 μ M com per-centual final de DMSO igual a 0,03%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significante

4.12 - Estudo do Efeito dos Conjugado DFOQUN na Agregação do Peptídeo β – Amilóide .

DFOQUN apresentou melhores resultados na inibição da atividade da AChE *in vitro* e *in vivo* em *C. elegans*, o que o torna um potencial candidato ao tratamento da DA. Optamos nesta tese para utilizá-lo na avaliação da agregação do peptídeo β -amilóide. A capacidade do conjugado DFOQUN de interferir na formação das fibrilas do peptídeo βA_{1-42} foi estudada pela medida de intensidade da fluorescência da sonda Tioflavina-T (ThT). Em meio aquoso, a rápida rotação em torno da ligação C-C (**Figura 63**) que liga o grupo benzotiazol à porção N,N dimetilanelina da molécula provoca decaimento não radiativo do estado excitado¹⁸. Este processo irá ocorrer através do chamado *twisted internal charged transfer process* (TICT) no estado excitado pelo aumento do ângulo de torção de 37° para 90°¹⁸. A interação das fibrilas com ThT irá restringir a rotação da ligação C-C tornando a sonda fluorescente.

Figura 63 - Supressão de fluorescência de ThT que ocorre em meio aquoso e emissão de fluorescência da sonda na presença das fibrilas do peptídeo βA ¹⁸.

Espera-se que uma molécula neste estudo possa se ligar às fibrilas e reduzir a fluorescência de ThT. Os resultados (**Figura 64**) mostram que DFOQUN promove significativa inibição de agregação comparado com DFO ($p < 0,01$) devido ao anel quinolínico em sua estrutura. O efeito do núcleo quinolínico é comprovado pela tacrina, que foi empregada como con-

trole positivo, apresentando capacidade inibitória (15,4%) de agregação do peptídeo. Entretanto, o esqueleto da DFO, reduz o efeito inibição de DFOQUN (11,5%). Isso pode ser explicado pela diferença estrutural entre os quelantes e ThT. Tioflavina T é uma molécula planar e altamente hidrofóbica, o que favorece sua interação com as fibrilas, diferentemente de DFO e DFOQUN que comparados a sonda, são hidrofílicos⁵².

Os compostos avaliados apresentam similar capacidade de inibição de agregação de βA_{1-42} comparado com outros derivados de Tacrina descritos na literatura¹⁰³. Contudo, na presença de Fe, não há diferença significativa na inibição de formação das fibrilas entre DFO, DFOQUN e Tacrina, em função da competição com o peptídeo βA_{1-42} por Fe. A agregação do peptídeo será reduzida, devido ao aumento da capacidade de inibição dos quelantes⁶⁵.

Figura 64 - Efeito dos compostos testados na presença ou ausência de ferro na inibição de βA_{1-42} . A concentração de DFO, DFOQUN e Tacrina = 20 μM , Ferro = 2 μM e ThT = 1 μM com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra é representada a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 4 experimentos realizados em Quadruplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$), NS = Não significativo

4.13 - Estudo Comparativo de Permeabilidade entre os Conjugados em Células HeLa e Software Marvin Sketch

Uma característica importante no que tange ao uso de novas fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas é o perfil farmacocinético dos conjugados e seu potencial para permear barreiras celulares como a barreira hemato encefálica. Para este estudo, o monitoramento de ferro intracelular foi realizado com o auxílio da sonda acetometoxi calceína (CAL-AM – não fluorescente). CAL-AM permeia membranas celulares e no interior da célula, é hidrolisada por esterases intracelulares tornando-se fluorescente (**Figura 65**), apresentando supressão de fluorescência na presença de ferro:

Figura 65 - CAL-AM (hidrofóbico) permeia membranas celulares, sofrendo hidrólise na presença de esterases, se convertendo em Calceína e emitindo fluorescência esverdeada.

Os resultados (**Figura 66**) demonstram diferença significativa na permeabilidade entre DFO e DFOANI ($p < 0,01$); DFO e DFOQUN ($p < 0,05$). Não há diferença significativa entre DFO e DFOBAN que neste caso, não possui capacidade de permeabilidade. Para complementação dos estudos de permeabilidade, simulação computacional da lipofilicidade dos conjugados foi realizada utilizando o software Marvin Sketch da Chem Axon. O logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) foi determinado para cada quelante (**Tabela 11**). Os valores

observados mostram que log P de DFOANI (-0,94) e DFOQUN (-0,78) é superior ao da DFO (-2,02). Isso significa que a adição de anéis aromáticos a DFO aumentam seu caráter hidrofóbico comprovando os resultados observados nos estudos de permeabilidade com CAL-AM. Contudo, quando um anel benzênico apresenta heteroátomos, a hidrofilicidade irá aumentar. Isso é verificado no conjugado DFOBAN com log P igual a -2,34 devido ao grupo benzossulfonilamida.

A permeabilidade de candidatos a fármacos é avaliada de acordo com as regras estabelecidas por Lipinski:

- 1- massa molar menor que 500 Da,
- 2- não deve haver mais que 5 átomos de doadores de hidrogênios
- 3- numero de átomos receptores de hidrogênios deve ser menor do que 10
- 4 - log P deve ser menor do que 5

Os candidatos que obedecem estas normas apresentam boa absorção e permeabilidade. Os conjugados violam as regras 1, 2 e 3, o que inviabiliza seu uso para consumo oral, em função da não absorção dos fármacos pelas células epiteliais presentes nas paredes no intestino delgado ¹⁰⁴.

Tabela 11 - Quelantes de Ferro e os valores correspondentes ao log P.

Quelantes de Ferro	log P
DFO	-2,02
DFOANI	-0,94
DFOBAN	-2,34
DFOQUN	-0,78
DFONAF	0,05
SIH	1,44

Neste trabalho, conjugado DFONAF não apresentou capacidade de quelação, nem proteção antioxidante nos ensaios *in vitro* e não foi empregado nos estudos de permeabilidade e viabilidade celular, a qual será discutida no próximo tópico.

Figura 66 - - Ensaio de Permeabilidade celular com CAL-AM. A concentração de DFO, Conjugados e SIH = 75 μ M, Fe(8HQ) = 2,5 μ M e Cal-AM = 3,1 μ M com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) , NS = Não significante

4.14 - Estudo de Viabilidade Celular com Células HeLa.

A viabilidade celular dos conjugados, na presença e ausência de ferro foi determinada com o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). O metabolismo mitocondrial pode ser monitorado por meio da atividade de moléculas como NADH e NADPH que se comportam como agentes redutores, convertendo MTT em Formazan (**Figura 67**):

Figura 67 - Conversão de MTT a Formazan. O produto em forma de cristais, rompe a membrana celular, levando a morte celular, possibilitando determinação da atividade metabólica celular por espectrofotometria¹⁰⁴

Os conjugados DFOANI e DFOQUN mostram melhora significativa na viabilidade celular comparado ao controle positivo SIH (**Figura 68**; $p < 0,001$) após 24 horas de exposição. O quelante SIH é uma molécula lipofílica capaz de sequestrar ferro intracelular, entretanto apresenta citotoxicidade¹⁰⁵. Além disso, não há diferença significativa de viabilidade celular entre conjugados na presença de ferro e controle. É importante que o complexo formado não provoque danos ao funcionamento das células presentes em nosso corpo. É válido ressaltar que Fe atua na regulação da biosíntese do DNA, promovendo aumento da viabilidade celular, entretanto este processo é interrompido quando o metal se liga a DFO¹⁰⁶. Neste caso, pode-se destacar que Fe tem acesso ao núcleo celular das células HeLa, onde 17% de Ferro tem acesso a esta organela¹⁰⁶.

Figura 68 - Ensaio de Viabilidade Celular com MTT. A concentração de DFO, Conjugados e SIH = 75 μ M, Ferro = 75 μ M e MTT = 0,84 mM com percentual final de DMSO igual a 1%. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão de n= 3 experimentos realizados em triplicata. * indica a diferença estatística do grupo de controle pela ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) , NS = Não significante

Capítulo 5

Conclusões

5- Conclusões

A síntese dos conjugados de DFO foi bem sucedida, e o processo de purificação utilizando cromatografia ocorreu com êxito, embora com perda de material. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C evidenciam a presença de sinais característicos dos grupos hidroxamatos do esqueleto da DFO presente nos conjugados. Sinais entre 7,00 – 9,00 ppm mostram a presença dos anéis aromáticos, correspondentes às aminas conjugadas com o quelante. Análise por LC-ESI/MS possibilitou detectar o pico do íon molecular dos conjugados sintetizados.

Na avaliação de atividade quelante, DFOQUN demonstrou padrão de ligação a ferro similar a DFO, enquanto os demais conjugados apresentaram menor afinidade. DFOQUN possui um ponto de coordenação a mais devido ao átomo de nitrogênio em sua estrutura, o que foi comprovado através do método das variações contínuas. Embora também com um ponto de coordenação a mais, o conjugado DFOBAN não apresentou a mesma eficiência da atividade quelante, devido à ressonância dos pares de elétrons do grupo amino com átomo de oxigênio. A espectroscopia UV-VIS comprova a capacidade de quelação dos conjugados (exceto DFO-NAF, devido ao bloqueio dos sítios de coordenação pelo anel naftalênico, impedindo quelação com ferro). Os resultados de atividades antioxidantes (DHR e DPPH) demonstraram eficiência dos conjugados em evitar ROS em função de sua similaridade estrutural com DFO.

Nos estudos envolvendo *C. elegans*, embora DFOQUN tenha apresentado toxicidade com o verme no estágio L1 na presença de Fe, observou-se aumento na taxa de sobrevivência nos nematoides. Com o nematóide, a inibição da AChE não apresenta diferença estatística entre a atividade da enzima tratada com Tacrina e com DFOQUN. O que não ocorreu com os estudos *in vitro*; neste caso, DFOQUN mostra inibição superior à da fármaco, na presença de ferro. A avaliação comportamental do verme sugere melhora do deficit colinérgico com a exposição a DFOQUN. A inibição de agregação de βA_{1-42} de DFOQUN (11,5%) é maior que de DFO (8,6%) e na presença de Fe, não há diferença estatística entre DFO, DFOQUN e Tacrina.

Estudos de permeabilidade com CAL-AM e o programa Marvin Sketch comprovaram a capacidade de permeabilidade de DFOQUN e DFOANI e a viabilidade celular mostra a não toxicidade dos conjugados com Fe. Por fim, os resultados apresentados ratificam DFOQUN como possível candidato a fármaco anti-DA.

Capítulo 6

Perspectivas

6- Perspectivas

- Estudos computacionais utilizando teoria funcional da densidade para compreender melhor a conformação e estrutura dos complexos Fe: conjugados. Estes dados poderiam ajudar a confirmar a estequiometria metal:ligante determinada pelo método de Jobs Plot.
- Estudos computacionais utilizando a relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) entre os conjugados e a AChE. Estes estudos possibilitariam verificar em quais aminoácidos específicos da enzima estão interagindo com os candidatos a fármacos. Seria de grande importância principalmente para o conjugado DFOQUN
- Determinação do tipo de inibição enzimática envolvendo DFOQUN e a enzima AChE.
- Ensaios de permeabilidade e viabilidade celular utilizando células neuronais saudáveis. Utilizamos células HeLa neste trabalho devido à vantagem de se replicar facilmente em laboratório e apresentar bom fator de resposta à sonda CAL-AM, contudo não é o modelo ideal. Neurônios saudáveis poderiam fornecer mais informações sobre o comportamento dos conjugados em uma situação sobrecarga de ferro e estresse oxidativo relacionados à problemática do trabalho.
- Busca por novos procedimentos de purificação dos conjugados, uma vez que se observou grande perda de material utilizando RP-HPLC
- Estudos sintéticos envolvendo outras estratégias de conjugação entre DFO e aminas aromáticas.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7- Referências Bibliográficas

1. WARD, R.J., *et al.* Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. *J. Trace Elem. Med. Biol.***31**: 267-273, (2015).
2. RIZZARELLI, D.M.E., Neurodegeneration : Metallostasis and Proteostasis 1st Edition ed. Drug Discovery ed. PUBLISHING, R. 2011: Royal Society of Chemistry. 270.
3. ANDREWS, N.C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet.***1**(3): 208-217, (2000).
4. TOMA, H.E., Química de Coordenação, Organometálica e Catálise. Vol. 4. 2013. 388.
5. KNUTSON, M.D. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radical Biol. Med.***133**: 101-111, (2019).
6. BREUER, W., *et al.* The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfusion science.***23**(3): 185-192, (2000).
7. EVANS, R.W., *et al.* Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry.***13**(1): 57-74, (2008).
8. CABANTCHIK, Z.I., *et al.* The molecular and cellular basis of iron toxicity in Iron Overload (IO) disorders. *TR.***3**(1): 6, (2013).
9. BARBOSA, L.F., *et al.* Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quím. Nova.***29**: 1352-1360, (2006).
10. ZHOU, T., *et al.* Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton transactions.***41**(21): 6371-6389, (2012).
11. HIDER, R.C., *et al.* The potential application of iron chelators for the treatment of neurodegenerative diseases. *Metallomics.***3**(3): 239-249, (2011).
12. NOGUEIRA, R.F.P., *et al.* Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. *Quím. Nova.***30**: 400-408, (2007).
13. RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, C., *et al.* The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases. *Coord. Chem. Rev.***256**(19-20): 2308-2332, (2012).
14. FALCO, A.D., *et al.* DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. *Quím. Nova.***39**: 63-80, (2016).

15. TODDAYAN, N. Professor Alois Alzheimer (1864–1915): Lest we forget. *J. Clin. Neurosci.***31**: 47-55, (2016).
16. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.***7**(2): 208-244, (2011).
17. AL., V.E. Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo-Neuroinflamatório. *Revista Virtual de Química*,**3**(4)(2011).
18. HAYNE, D.J., *et al.* Metal complexes designed to bind to amyloid-[small beta] for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.***43**(19): 6701-6715, (2014).
19. TIIMAN, A., *et al.* The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – Metal ions. *Neurochem Int.***62**(4): 367-378, (2013).
20. KOZLOWSKI, H., *et al.* Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.***256**(19): 2129-2141, (2012).
21. HUANG, X., *et al.* The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. *ACS Biochem.***38**(24): 7609-7616, (1999).
22. GALANTE, D., *et al.* Effect of ferric citrate on amyloid-beta peptides behavior. *Biopolymers*.**109**(6): e23224, (2018).
23. JAMES, S.A., *et al.* Iron, Copper, and Zinc Concentration in A β Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil. *ACS Chem. Neurosci.***8**(3): 629-637, (2017).
24. AYTUN, S., *et al.* Evidence that iron accelerates Alzheimer's pathology: a CSF biomarker study. *J. Neurol.***89**(5): 456-460, (2018).
25. BERG, L., *et al.* Targeting Acetylcholinesterase: Identification of Chemical Leads by High Throughput Screening, Structure Determination and Molecular Modeling. *PLOS ONE*.**6**(11): e26039, (2011).
26. SOREQ, H.;SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.***2**: 294, (2001).
27. COLOVIĆ, M.B., *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropsychopharmacol.***11**(3): 315-335, (2013).
28. SANTOS, M.A., *et al.* Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. *Coord. Chem. Rev.*
29. WAGSTAFF, A.J.;MCTAVISH, D. Tacrine. *Drugs Aging*.**4**(6): 510-540, (1994).
30. NORDBERG, A.;SVENSSON, A.-L. Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Drug Saf.***19**(6): 465-480, (1998).

31. KERI, R.S., *et al.* New Tacrine Hybrids with Natural-Based Cysteine Derivatives as Multitargeted Drugs for Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Chem. Biol. Drug. Des.***87**(1): 101-111, (2016).
32. PIEMONTESE, L., *et al.* Donepezil structure-based hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's drug candidates. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.***33**(1): 1212-1224, (2018).
33. QUINTANOVA, C., *et al.* Design, synthesis and bioevaluation of tacrine hybrids with cinnamate and cinnamylidene acetate derivatives as potential anti-Alzheimer drugs. *MedChemComm.***6**(11): 1969-1977, (2015).
34. KERI, R.S., *et al.* Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine–benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.***21**(15): 4559-4569, (2013).
35. MAIR, S.M.;WEISS, G. New pharmacological concepts for the treatment of iron overload disorders. *Curr Med Chem.***16**(5): 576-590, (2009).
36. NATALIA, G., *et al.* Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.***22**(3): 373-404, (2015).
37. SCHERRMANN, J.M. Drug delivery to brain via the blood–brain barrier. *Vasc.Pharmacol.***38**(6): 349-354, (2002).
38. ALTA, E.C.P., *et al.* Desferrioxamine-caffeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload. *Biometals.***27**(6): 1351-1360, (2014).
39. GOSWAMI, D., *et al.* Cell Penetrating Peptide (CPP)-Conjugated Desferrioxamine for Enhanced Neuroprotection: Synthesis and in Vitro Evaluation. *Bioconjugate Chem.***25**(11): 2067-2080, (2014).
40. CORSI, A.K., *et al.* A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.***200**(2): 387-407, (2015).
41. MA, L., *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. *Eur. J. Pharmacol.***819**: 169-180, (2018).
42. SASHIDHARA, K.V., *et al.* Benzofuran–Chalcone Hybrids as Potential Multifunctional Agents against Alzheimer's Disease: Synthesis and in vivo Studies with Transgenic *Caenorhabditis elegans*. *ChemMedChem.***9**(12): 2671-2684, (2014).
43. SASHIDHARA, K.V., *et al.* Discovery of 3-Arylcoumarin-tetracyclic Tacrine Hybrids as Multifunctional Agents against Parkinson's Disease. *ACS Med. Chem. Lett.***5**(10): 1099-1103, (2014).

44. ZAMBERLAN, D.C., *et al.* Diphenyl-diselenide suppresses amyloid- β peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*.**278**: 40-50, (2014).
45. BALAKRISHNA, D., *et al.* Catalyst / Surfactant Free Chemoselective Acylation of Amines in Water. *Curr. Green Chem.***1**(1): 73-79, (2014).
46. SINHA, S.K.;SHRIVASTAVA, S.K. Design, synthesis and evaluation of some new 4-aminopyridine derivatives in learning and memory. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***23**(10): 2984-2989, (2013).
47. LIU, J., *et al.* Conjugates of Desferrioxamine B (DFOB) with Derivatives of Adamantane or with Orally Available Chelators as Potential Agents for Treating Iron Overload. *J. Med. Chem.***53**(3): 1370-1382, (2010).
48. ALTA, R.Y.P., *et al.* Mitochondria-penetrating peptides conjugated to desferrioxamine as chelators for mitochondrial labile iron. *PLOS ONE*.**12**(2): e0171729, (2017).
49. BACCAN, M.M., *et al.* Quercetin as a shuttle for labile iron. *J Inorg Biochem.***107**(1): 34-39, (2012).
50. ESPOSITO, B.P., *et al.* Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*.**102**(7): 2670-2677, (2003).
51. GYAMFI, M.A., *et al.* Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.***32**(6): 661-667, (1999).
52. CHAND, K., *et al.* Tacrine–deferiprone hybrids as multi-target-directed metal chelators against Alzheimer's disease: a two-in-one drug. *Metallomics*.**10**(10): 1460-1475, (2018).
53. WRÓBLEWSKA, K., Comparative study of the antioxidant and anticholinesterase potential of four medicinal plants: *Cochlospermum angolensis* Welw., *Jacaranda caroba*(Vell.) DC., *Gelsemium sempervirens* L. and *Grindeliarobusta* Nutt. Porto.Chemistry Department- O'Porto University, 2012.de Master.
54. AU - PORTA-DE-LA-RIVA, M., *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *JoVE*(64): e4019, (2012).
55. ADLIMOGHADDAM, A., *et al.* Ammonia excretion in *Caenorhabditis elegans*: mechanism and evidence of ammonia transport of the Rhesus protein CeRhr-1. *J. Exp. Biol.***218**(5): 675-683, (2015).
56. PEDROBOM, J.H., ESPECIAÇÃO DE URÂNIO EM ÁGUAS TRATADA DE DRENAGEM ÁCIDA DE MINA USANDO A TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT). Rio Claro - SP. Instituto de Geociências e Ciências Exatas- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2016.de Mestrado.

57. ŠESTAN, I., *et al.*, Inorganic Speciation of Lead, Copper and Zinc in the Water of Modrac Lake by Application of DPASV. Vol. 6. 2016. 564-568.
58. AHMED ELHABIRI, S.; A. DIDI, M., Design optimization of extraction procedure for terbium (III) by supported liquid membrane using D2EHPA and TOPO as a carrier. Vol. 19. 2018.
59. WALASZEK, M., *et al.* Sorption behavior of copper, lead and zinc by a constructed wetland treating urban stormwater. *Appl. Geochem.***97**: 167-180, (2018).
60. XIE, R.J., *et al.* Oxidation-reduction potential in saline water reverse osmosis membrane desalination and its potential use for system control. *Desalin. Water Treat.***3**(1-3): 193-203, (2009).
61. *Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217)*. 2018 [cited 2018 17/10/2018]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A12217>.
62. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.***72**(1): 248-254, (1976).
63. HART, A.C. *Behavior*. 2006 [cited 19/11/2018; Available from: http://www.worm-book.org/chapters/www_behavior/behavior.html].
64. GUZIOR, N., *et al.* Isoindoline-1,3-dione derivatives targeting cholinesterases: Design, synthesis and biological evaluation of potential anti-Alzheimer's agents. *Bioorg. Med. Chem.***23**(7): 1629-1637, (2015).
65. HIREMATHAD, A., *et al.* Tacrine-allyl/propargylcysteine-benzothiazole trihybrids as potential anti-Alzheimer's drug candidates. *RSC Adv.***6**(58): 53519-53532, (2016).
66. VISWANADHAN, V.N., *et al.* Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J Chem Inf Comput Sci.***29**(3): 163-172, (1989).
67. ARNDT, A., *et al.* New iminodibenzyl derivatives with anti-leishmanial activity. *J Inorg Biochem.***172**: 9-15, (2017).
68. VYVAN, D.L.P.G.M.L.G.S.K.J.R., *Introdução a Espectroscopia*. 4ª Edição ed. 2012.
69. WARREN, J.C.N.G.S., *Organic Chemistry*. 2nd Edition ed. 2012. 1234.
70. BORGIAS, B., *et al.*, Isomerization and solution structures of desferrioxamine B complexes of Al³⁺ and Ga³⁺. Vol. 28. 1989.

71. BALLBIO, M., *et al.* Evidence for strong intramolecular hydrogen bonding in some quinoline derivatives. *ORG MAGN RESONANCE*.**14**(6): 538-539, (1980).
72. HORE, P.J., Nuclear Magnetic Resonance, ed. PRIMERS, O.C. 1995.
73. SIMIONATO, A.V.C., *et al.* Tandem mass spectrometry of coprogen and deferoxamine hydroxamic siderophores. *Rapid Commun. Mass Spectrom.***20**(2): 193-199, (2006).
74. INFORMATION, N.C.F.B. *Deferoxamine*, CID=2973. [cited 2019 Mar. 28]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2973>.
75. VITORINO, H.A., *et al.* Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. *PLOS ONE*.**10**(4): e0121997, (2015).
76. THOMAS, F., *et al.* Calcein as a Fluorescent Probe for Ferric Iron: APPLICATION TO IRON NUTRITION IN PLANT CELLS. *J Biol Chem*.**274**(19): 13375-13383, (1999).
77. SAHOO, S.K., *et al.* Iron(III) selective molecular and supramolecular fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.***41**(21): 7195-7227, (2012).
78. GOODWIN, J.F.;WHITTEN, C.F. Chelation of Ferrous Sulphate Solutions by Desferrioxamine B. *Nature*.**205**(4968): 281-283, (1965).
79. IHNAT, P.M., *et al.* Solution equilibria of deferoxamine amides. *J. Pharm. Sci.***91**(7): 1733-1741, (2002).
80. EDWARDS, D.C., *et al.* Experimental and theoretical vibrational spectroscopy studies of acetohydroxamic acid and desferrioxamine B in aqueous solution: Effects of pH and iron complexation. *Geochim. Cosmochim. Acta*.**69**(13): 3237-3248, (2005).
81. CORREIA, F.C., *et al.* Synthesis and Characterization of a New Semiconductor Oligomer Having Quinoline and Fluorene Units. *J. Braz. Chem. Soc.***26**: 84-91, (2015).
82. MONZYK, B.;CRUMBLISS, A.L. Kinetics and mechanism of the stepwise dissociation of iron(III) from ferrioxamine B in aqueous acid. *J. Am. Chem. Soc.***104**(18): 4921-4929, (1982).
83. TOMA, H.E., Química Bioinorgânica e Ambiental. Vol. 5. 2015. 269.
84. OLSON, E.J.;BÜHLMANN, P. Getting More out of a Job Plot: Determination of Reactant to Product Stoichiometry in Cases of Displacement Reactions and n:n Complex Formation. *J. Org. Chem.***76**(20): 8406-8412, (2011).
85. CERQUEIRA, F.M., *et al.* Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova*.**30**: 441-449, (2007).

86. CHASTON, T.B.;RICHARDSON, D.R. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: Relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am. J. Hematol.***73**(3): 200-210, (2003).
87. MOLYNEUX, P., The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Vol. 26. 2003.
88. BIRBEN, E., *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.***5**(1): 9-19, (2012).
89. HARTLEY, A., *et al.* Desferrioxamine as a lipid chain-breaking antioxidant in sickle erythrocyte membranes. *FEBS Lett.***264**(1): 145-148, (1990).
90. SHIMONI, E., *et al.* Antioxidant properties of deferoxamine. *J Am Oil Chem Soc.***71**(6): 641-644, (1994).
91. FAGUNDEZ, D.D.A., *et al.* Behavioral and dopaminergic damage induced by acute iron toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Res.***4**(4): 878-884, (2015).
92. KLANG, I.M., *et al.* Iron promotes protein insolubility and aging in *C. elegans*. *Aging.***6**(11): 975-988, (2014).
93. HONG, S.;PEDERSEN, P.L. ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.***72**(4): 590-641, (2008).
94. TALITA, H.F.-V., *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuroparmacol.***14**(1): 101-115, (2016).
95. F SANTILLO, M.;LIU, Y., A fluorescence assay for measuring acetylcholinesterase activity in rat blood and a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). Vol. 76. 2015.
96. OUBERAI, M., *et al.* Clicked tacrine conjugates as acetylcholinesterase and β -amyloid directed compounds. *Org. Biomol. Chem.***9**(4): 1140-1147, (2011).
97. CHAND, K., *et al.*, Tacrine-deferiprone hybrids as multi-target-directed metal chelators against Alzheimer's disease: a two-in-one drug. Vol. 10. 2018.
98. MCKENNA, M.T., *et al.* Novel Tacrine Analogues for Potential Use against Alzheimer's Disease: Potent and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors and 5-HT Uptake Inhibitors. *J. Med. Chem.***40**(22): 3516-3523, (1997).
99. ALMEIDA, J.R.D., *et al.* Discovery of novel dual acetylcholinesterase inhibitors with antifibrillogenic activity related to Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.***10**(9): 1037-1053, (2018).
100. COMBES, D., *et al.*, Acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*, IN: *Int Rev Cytol.* 2001, Academic Press. p. 207-239.

101. RAND, J.B. *Acetylcholine*. 2007 [cited 2018; Available from: http://www.worm-book.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.html].
102. BIRON, D., *et al.* Neurobiology of *Caenorhabditis elegans* Locomotion: Where Do We Stand? *BioScience*. **64**(6): 476-486, (2014).
103. QUINTANOVA, C., *et al.*, Copper(II) Complexation of Tacrine Hybrids with Potential Anti-Neurodegenerative Roles. Vol. 151. 2015.
104. ARNOTT, J.; LOBO, S., The influence of lipophilicity in drug discovery and design. Vol. 7. 2012. 863-875.
105. HAŠKOVÁ, P., *et al.* Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radical Biol. Med.* **50**(4): 537-549, (2011).
106. ROBBINS, E., *et al.* Intracellular iron-binding macromolecules in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **69**(12): 3708-3712, (1972).

8- Súmula Curricular

1-Dados Pessoais

Nome: Rodrigo Rodrigues Victor de Carvalho

Local e Data de Nascimento: Governador Valadares-MG, 13/04/1989

2-Formação:

Graduação em Química (2007-2012), Universidade Federal da Bahia – ICADS, UFBA, Brasil

Mestrado em Química (2013-2015), Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil

Título: Emprego de Imagens Hiperespectrais e Espectrometria de Emissão em Plasma Induzido por Laser na Análise Direta de Amostras de Lixo

Orientador: Edenir Rodrigues Pereira Filho

Doutorado em Química (2015-2019), Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Título: Quelantes Bifuncionais para o Tratamento de Neurodisfunções Associadas ao Ferro

Orientador: Breno Pannia Espósito

Doutorado Sanduíche (2017), Albert Einstein College of Medicine – Yeshiva University

Título: The Use of Iron Chelators in Alzheimer's Disease

Orientador: Dr. Michael Aschner

Estágio em Docência (2016):

Participou em Estágio Supervisionado em Docência com carga horária total de 120 horas na disciplina de Química Inorgânica II no Programa de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (PAE) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo sob supervisão do Prof. Dr. Vitor de Moraes Zamarion.

3-Apresentação de Trabalhos e Participação em Congressos

CARVALHO, RODRIGO; SILVA, G. S. ; ESPOSITO, B. P. . NEOFLAVONIDS AND CHLOROGENIC ACID AS CANDIDATES FOR THE TREATMENT OF IRON OVERLOAD. 2017. (46th World Chemistry Congress, São Paulo-SP).

SANTOS, J. M. ; COELHO, JOMARC ; **CARVALHO, RODRIGO** ; AQUINO, F. W. B. ; PEREIRA FILHO, E. R. . Uso de Ferramentas Quimiométricas na Avaliação de Elementos Químicos em Amostras de Placas de Circuito Impresso. 2015. (II Escola de Inverno de Quimiometria, Campinas-SP).

CARVALHO, R. R. V.; SANTOS, J. M. ; AQUINO, F. W. B. ; CARNEIRO, RENATO L. ; PEREIRA FILHO, E. R. . Emprego de Imagens Hiperespectrais e Espectrometria de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS) na Análise Direta de Circuitos Eletrônicos. 2014. (5º Workshop de Quimiometria, Camaçari-BA).

SANTOS, J. M. ; **CARVALHO, R. R. V.** ; COELHO, J. A. O. ; PEREIRA FILHO, E. R. . Avaliação Preliminar de Elementos Tóxicos em Amostras de PCI (Placas de Circuito Impresso) Empregando ICP-OES. 2013. (17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte-MG).

4-Artigos Publicados em Periódicos

CARVALHO, RODRIGO R.V.; COELHO, JOMARC A.O. ; SANTOS, JOZEMIR M. ; AQUINO, FRANCISCO W.B. ; CARNEIRO, RENATO L. ; PEREIRA-FILHO, EDENIR R. . Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) combined with hyperspectral imaging for the evaluation of printed circuit board composition. Talanta (Oxford), v. 134, p. 278-283, 2015.

PEREIRA-FILHO, EDENIR RODRIGUES ; AQUINO, FRANCISCO ; SANTOS, JOZEMIR **CARVALHO, RODRIGO**; COELHO, JOMARC . Obtaining information about valuable metals in computer and mobile phone scraps using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences, v. 5, p. 67001-67010, 2015.

9- Anexos

A – Espectros de RMN ^1H E RMN ^{13}C

A 1 - Espectro de RMN ^1H de ROD003

A 2 - Espectro de RMN ^{13}C de ROD003

A 3 - Espectro de RMN ^1H de ROD007

A 4- Espectro de RMN ^{13}C de ROD007

A 5 - Espectro de RMN ^1H de ROD020

A 6 - Espectro de RMN ^{13}C de ROD020

A 7 - Espectro de RMN ^1H de ROD021

A 8 - Espectro de RMN ^{13}C de ROD021

A 9 - Espectro de RMN ^1H de DFOANI

A 10 - Espectro de RMN ^{13}C de DFOANI

A 11 - Espectro de RMN ^1H de DFOBAN

A 12 - Espectro de RMN ^{13}C de DFOBAN

A 13 - Espectro de RMN ^1H de DFONAF

A 14 - Espectro de RMN ^{13}C de DFONAF

A 15 - Espectro de RMN ^1H de DFOQUN

A 16 - Espectro de RMN ^{13}C de DFOQUN

B - Espectros de Massa

B 1 - Espectro de Massas de ROD003

B 2 - Espectro de Massas de ROD003 (pico do íon molecular)

B 3 - Espectro de Massas de ROD007

B 4 - Espectro de Massas de ROD007 (pico do íon molecular) **B 5** - Espectro de Massas de ROD020 **B 6** - Espectro de Massas de ROD020 (pico do íon molecular)

B 7 - Espectro de Massas de ROD021

B 8 - Espectro de Massas de ROD021 (pico do íon molecular).

B 9 - DFOANI purificado: cromatograma UV-Vis (A1), cromatograma de íons (A2) e espectro de massas do composto desejado eluído entre 20,1 e 20,5 min (B). Condição de Análise no LC: Gradiente de 5 a 95% de B em 30 min (Solvente B = 60% de ACN/0,09%/TFA. Condição de Análise no MS: Voltagem do Capilar (4500V) e Temperatura (220°C)

B 10 - DFOBAN purificado: cromatograma UV-Vis (A1), cromatograma de íons (A2) e espectro de massas do composto desejado eluído entre 15,1 e 15,4 min. Condição de Análise no LC: Solvente A (0,1% TFA/H₂O); Solvente B = 60% de ACN/0,09%/TFA/H₂O. Gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, 5 µL de amostra. Condição de Análise no MS: Voltagem do Capilar (4500V) e Temperatura (220°C)

B 11 - DFONAF purificado: cromatograma UV-Vis (A1), cromatograma de íons (A2) e espectro de massas do composto desejado eluído entre 21,9 e 22,3 min. Condição de Análise no LC: Solvente A (0,1% TFA/H₂O); Solvente B = 60% de ACN/0,09% TFA/H₂O. Gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, 5 µL de amostra. Condição de Análise no MS: Voltagem do Capilar (4500V) e Temperatura (220°C)

B 12 - DFOQUN purificado: cromatograma UV-Vis (A1), cromatograma de íons (A2) e espectro de massas do composto desejado eluído entre 13,9 e 14,4 min. Condição de Análise no LC: Solvente A (0,1% TFA/H₂O); Solvente B = 60% de ACN/0,09% TFA/H₂O. Gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, 5 µL de amostra. Condição de Análise no MS: Voltagem do Capilar (4500V) e Temperatura (220°C)

C - Relatório Fornecido pelo Programa CHEAQS NEXT

CHEAQS Next output

Program version: P2019.1.

Print date (mm-dd-yyyy): 03-22-2019.

Sample description: (not specified).

Contents

Below you will find output of the following cation(s): H; Fe(II).

Below you will find output of the following ligand(s): S.

Both summary and details are printed.

Fractions / species below 0.10% are not displayed (but free species are always displayed).

Intrinsic and conditional K's are displayed as log-10-values.

Additional info follows cations and ligands and consists of: general results; saturation solids; gases; input data.

Cations

Results of H

Summary of results

Fraction	Concentration	Unit
Dissolved H	-4.960E-002	M
Solid H	-1.860E-002	M
Total H	-6.819E-002	M

Details of results

Species	Concentration	Unit	Percentage	Activity	Unit	Intrinsic K	Conditional K	Literature reference
free H +	1.396E-006	M		1.100E-006	M			
free (OH) -	1.162E-008	M		9.154E-009	M	13.997	13.790	NIST Database 46 Version 8.0
free (SO3) 2-	5.112E-020	M		1.971E-020	M	-3.341	-3.755	Lide (Handbook)
free (SO4) 2-	6.199E-003	M		2.390E-003	M	20.120	18.464	Morel
Fe(III)2O3 (s)	3.099E-003	M				85.400	82.916	NIST Database 46 Version 8.0
Total H	-6.819E-002	M						

Fraction	Concentration	Unit	Percentage
Dissolved Fe(II) / Fe(III)	1.091E-006	M	0.02%
Solid Fe(II) / Fe(III)	6.199E-003	M	99.98%
Total Fe(II) / Fe(III)	6.200E-003	M	100.00%

Details of results

Species	Concentration	Unit	Percentage	Activity	Unit	Intrinsic K	Conditional K	Literature reference
free Fe(II) 2+	8.896E-007	M	0.01%	3.430E-007	M			
free Fe(III) 3+	2.222E-018	M	0.00%	2.602E-019	M	13.033	12.412	Lide (Handbook)
Fe(III)2O3 (s)	3.099E-003	M	99.98%			85.400	82.916	NIST Database 46 Version 8.0
Total Fe(II) / Fe(III)	6.200E-003	M	100.00%					

Graphic results

Fractions

Species

Ligands

Results of S / (SO3) / (SO4) / S (s)

Summary of results

Fraction	Concentration	Unit	Percentage
Dissolved S / (SO3) / (SO4) / S (s)	6.200E-003	M	100.00%
Solid S / (SO3) / (SO4) / S (s)	2.970E-020	M	0.00%
Total S / (SO3) / (SO4) / S (s)	6.200E-003	M	100.00%

Details of results

Species	Concentration	Unit	Percentage	Activity	Unit	Intrinsic K	Conditional K	Literature reference
free S 2-	8.732E-038	M	0.00%	3.366E-038	M			
free (SO3) 2-	5.112E-020	M	0.00%	1.971E-020	M	-3.341	-3.755	Lide (Handbook)
free (SO4) 2-	6.199E-003	M	99.99%	2.390E-003	M	20.120	18.464	Morel
S (s)	2.970E-020	M	0.00%			36.240	34.377	Stumm & Morgan
Total S / (SO3) / (SO4) / S (s)	6.200E-003	M	100.00%					

Graphic results

Fractions

Species