

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

JESUS ANTONIO ALVARADO HUAYHUAZ

**Desferrioxamina e desferrioxamina-cafeína
como carregadores de alumínio e gálio para
bactérias e fungos via o “Efeito Cavalo de
Tróia”**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

26/09/2016

JESUS ANTONIO ALVARADO HUAYHUAZ

Desferrioxamina e desferrioxamina-cafeína como carregadores de alumínio e gálio para bactérias e fungos via o “Efeito Cavalo de Tróia”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo

2016

À Ana Victoria Huayhuaz Huaman,
minha mãe, com amor

Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, a meu orientador Breno Pannia Espósito pela oportunidade de trabalhar com seu grupo e desta ideia muito interessante e importante para meu desenvolvimento, pela amizade, pelas experiências compartilhadas e por me ensinar a fazer pesquisa com total liberdade e motivação.

Aos amigos do laboratório LAQBAM, Camila Castro, Hector Aguilar, Yesenia Pastrana, Elizabeth Pastrana e Dibakar Doswami, que fizeram que esta experiência no Brasil seja muito gratificante, em especial a Rodrigo Rodrigues, Faiz Ahmed e Bárbara Lopes com quem compartilhamos muitas experiências inesquecíveis.

À professora Telma Mary Kaneko, pelo apoio total no desenvolvimento dos testes microbiológicos, assim como também à professora Irene Satiko Kikuchi, do Laboratório de Controle microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À professora Silvia Helena Pires Serrano e a Othon Campos pela enorme contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho desde a eletroquímica.

À professora Silvia Uliana e Jenicer Kasumi do laboratório de Leishmanioses no ICB/USP, pela colaboração nos testes antiparasita.

Aos professores Henrique Eisi Toma, Gianluca Camillo Azzellini e Ana Maria da Costa Ferreira pelas sugestões na qualificação e pelo apoio como aluno nas práticas de ensino.

Ao professor Antônio Carlos Borin pela oportunidade de entrar no mundo da química computacional.

Aos professores Rômulo Augusto Ando do Laboratório de Espectroscopia Molecular e Miguel Garay da Escola de Arte, Ciências e Humanidades pela autorização de trabalhar nos seus laboratórios.

Ao pessoal da SPG, Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo, sempre dispostos a apoiar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

A Hamutay: Fernando, Brayan, Mirla, Melisa, Melanie, Victor, Sair, Grover, Lourdes, Yuli, Ricardo, Cesar, amigos pós-graduandos peruanos no São Paulo, pela intensa motivação em divulgar a ciência no Perú.

À Trupicalhada, meus eternos amigos, pelas experiências na música de rua, nas escolas ocupadas, no metrô. A Ivan, Ste, Endi, Gihe, Monã, Nicolás, Ciola, Ramiro, André e Lucas.

À minha mãe e meu pai, que além da distância estão sempre presentes no meu coração.

Aos meus irmãos, Camila e Miguel (Lima), Sofia (Madrid), Gladys (Miami) e Victoria (São Paulo), e a meus sobrinhos Diego, Josué e Ana Gracia, Akemi, Mia e Sebastian, Nicolas e Lucia, e Thais por ser a alegria da família.

Aos meus amigos Ana Sparrow e Pedro Santos por me fazer parte de sua família

E a meu amor Mirella Aguirre, pela loucura que permeia na minha vida.

“Uma criança, um professor, um livro e uma caneta podem mudar o mundo”

Malala Yousafzai

Resumo

Huayhuaz, J.A. Desferrioxamina e desferrioxamina-caféina como carregadores de alumínio e gálio em bactérias e fungos via o “Efeito Cavalo de Tróia”. 2016. (94 p). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Derivados de alumínio e gálio trivalentes com os sideróforos desferrioxamina (dfo) e desferrioxamina-caféina (dfcaf) foram preparados e caracterizados em solução através de espectrometria de massas, voltametria cíclica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton. Confirmações adicionais da formação de MeL (Me = Al^{3+} , Ga^{3+} ; L = dfo ou dfcaf) foram obtidas através de equilíbrios competitivos com as sondas fluorimétricas 8-hidroquinolina e desferrioxamina fluorescente. Observou-se que os complexos MeL são estáveis em solução, e que os derivados de alumínio são mais estáveis do que os de gálio. Também através da interação com o complexo calceína-ferro, observou-se que MeL se formaram em solução.

Estudos de *docking* preliminares mostram que dfcaf pode ter o mesmo mecanismo de entrada em *Escherichia coli* que outros antibióticos transportadores de ferro.

O efeito “cavalo de Tróia” consiste no carregamento seletivo de íons tóxicos através do sistema de absorção de ferro dos microrganismos mediado por sideróforos. A atividade biológica dos complexos MeL foi estudada através da inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Em geral, dfcaf é mais ativo do que dfo, possivelmente devido à sua maior lipofilicidade. Os complexos MeL foram em geral mais ativos do que os metais ou ligantes separadamente, possivelmente pela absorção dos íons tóxicos facilitada pelos sideróforos, demonstrando o efeito “cavalo de Tróia”. A bactéria Gram-positiva *S. aureus* apresentou maior resistência do que as Gram-negativas, e interessante o fungo *C. albicans* foi sensível a esses tratamentos. Esses resultados mostram a possibilidade de usar tais metalofármacos como tratamento para infecções microbianas.

Palavras-chave: Desferrioxamina, alumínio, gálio, caféina, Cavalo de Tróia.

Abstract

Huayhuaz, JA "Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as aluminum and gallium carriers to bacteria and fungi via the "Trojan Horse Effect". 2016. (94 p). Thesis (MSc) - Graduate in Chemistry Program. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo

Trivalent aluminum gallium derivatives with siderophores desferrioxamine (dfo) and desferrioxamine-caffeine (dfcaf) were prepared and characterized in solution using mass spectroscopy, cyclic voltammetry, vibrational spectroscopy and ^1H nuclear magnetic resonance. Further confirmation of the formation of MeL (Me = Al^{3+} , Ga^{3+} , L = dfo or dfcaf) was obtained through competitive equilibria with the fluorimetric probes 8-quinoline and fluorescent desferrioxamine. It was observed that MeL complexes are stable in solution, and that aluminum derivatives are more stable than gallium. Also through interaction with calcein-iron complex, it was observed that MeL formed in solution.

Preliminary docking studies show that complexes derived from dfcaf may have the same internalization mechanism in *Escherichia coli* as other iron-carrier antibiotics.

The "Trojan horse effect" is the selective loading of toxic ions through the iron uptake system of microorganisms mediated by siderophores. The biological activity of MeL complexes was studied by growth inhibition of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. In general, dfcaf is more active than dfo possibly due to its increased lipophilicity. MeL complexes were generally more active than the metals or ligands separately, possibly by absorption of toxic ions facilitated by siderophores, demonstrating the "Trojan horse effect". The Gram-positive bacterium *S. aureus* showed greater resistance than Gram-negative bacteria, and interestingly the fungus *C. albicans* was sensitive to these treatments. These results show the possibility of using such metallodrugs as a treatment for microbial infections.

Keywords: Desferrioxamine, aluminum, gallium, desferrioxamine-caffeine, Trojan Horse.

Lista de Figuras

FIGURA 1. (A) ALUMÍNIO DE ALTA PUREZA, (B) GÁLIO SE FUNDINDO A TEMPERATURA AMBIENTE [3] E (C) O SELO POSTAL (1986) EM HOMENAGEM DE PAUL HÉROULT O DESCOBRIDOR DA ELETROLISE DE ALUMÍNIO [1].....	18
FIGURA 2. (A) ESTRUTURA MOLECULAR DE CICLOPENTADIENILALUMÍNIO $[AlCp]_4$ ($Cp=H^5-C_5ME_5$) [14] E (B) TRIS (8-HIDROXIQUINOLINA) DE ALUMÍNIO [10]	21
FIGURA 3. ALGUMAS ESTRUTURAS REPRESENTATIVAS DOS SIDERÓFOROS. DE TIPO HEXADENTADO: ENTEROBACTINA, CORINEBACTINA, DESFERIOXAMINA B, FERRICROMO, PIOVERDINA, ALTEROBACTINA, AEROBACTINA E ESTAFILOFERRINA; DE TIPO TETRADENTADO: AMONABACTINAS, ÁCIDO RODOTORÚLICO E ALCALIGINA; E DE TIPO BIDENTADO: CEPABACTINA [23].....	28
FIGURA 4. (A) ESTRUTURA DA DESFERIOXAMINA INCLUINDO OS PKA ASSOCIADOS [61]; (B) COORDENAÇÃO DE CÁTIOS TRIVALENTES POR DFO (ME = AL, GA, FE) [55].....	29
FIGURA 5. ESTRUTURA DA DESFERIOXAMINA-CAFÉINA. EM VERMELHO OS GRUPOS ENCARREGADOS DA CONJUGAÇÃO [63].	30
FIGURA 6. FLUXOGRAMA DE TÉCNICAS COMPUTACIONAIS PARA A PREVISÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS EM INTERAÇÕES LIGANTE-RECEPTOR. SOFTWARES EM VERMELHO E BANCO DE DADOS EM AZUL.	34
FIGURA 7. ETAPAS DO DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM ESTRUTURA. UM DELES É RELENZA, REMÉDIO PARA INFLUENZA [91].	35
FIGURA 8. FLUXOGRAMA PARA A SÍNTESE DO DFCAF.	38
FIGURA 9. FLUXOGRAMA PARA A SÍNTESE DOS COMPLEXOS $Al(DFO)$ E $Ga(DFO)$	41
FIGURA 10. FLUXOGRAMA PARA A SÍNTESE DO $Al(DFCAF)$ E $Ga(DFCAF)$	41
FIGURA 11. PROCEDIMENTO PARA A TRANSFERÊNCIA ASSÉPTICA DE CULTIVOS DE MICRÓBIOS: (A) AQUECER A ALÇA ATÉ ALCANÇAR O VERMELHO VIVO PARA ESTERILIZÁ-LA, (B) RETIRAR A TAMPA DO TUBO, (C) FLAMEAR A ENTRADA DO TUBO, (D) COLETAR O MICRORGANISMO SÓ COM A PARTE ESTERILIZADA DA ALÇA E SEM PENETRAR NO ÁGAR, FAZENDO UM CAMINHO DE ZIGUEZAGUE, (E) FLAMEAR NOVAMENTE A ENTRADA DO TUBO, (F) TAMPAR E LOGO DA SEMEADURA NUM NOVO TUBO, ESTERILIZAR A ALÇA NOVAMENTE [93].	46
FIGURA 12. PREPARAÇÃO DE DILUIÇÕES MICROBIANAS PARA A OBTENÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) [94].	47
FIGURA 13. DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS PARA LEITURA NA MICROPLACA. OS POÇOS 3B, 3C E 3D CORRESPONDEM AO ANÁLISE POR TRIPLICATA DO COMPOSTO 1 DE CONCENTRAÇÃO FINAL 125,0 μM . DE FORMA ANÁLOGA OS POÇOS 3E, 3F E 3G PARA UM SEGUNDO COMPOSTO COM A MESMA CONCENTRAÇÃO. DILUIÇÕES SERIADAS DOS COMPOSTOS PERTENCEM A CONCENTRAÇÕES FINAIS DE 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9, 1,9 E 0,9 μM , DESDE A COLUNA 4 ATÉ A 10.	49
FIGURA 14. MECANISMO PROPOSTO DE REAÇÃO DE DESFERIOXAMINA E T7A PARA A SÍNTESE DE DFCAF.	52
FIGURA 15. ESPECTROS ELETRÔNICOS UV/VIS DE DFO E DFCAF EM DMSO.	54
FIGURA 16. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA DESFERIOXAMINA (DFO) E DESFERIOXAMINA-CAFÉINA (DFCAF).	55
FIGURA 17. ESPECTROS 1H -RMN DE DFO E DFCAF ANALISADOS EM $DMSO-d_6$	58
FIGURA 18. VOLTAMETRIA CÍCLICA DO TAMPÃO HBS A PH 7,4, COM $NaCl$ 100 MM COMO SUPORTE ELETROLÍTICO. $E_i = +0.0 V$; $E_{\lambda 1} = -1.0 V$; $E_{\lambda 2} = +1.4 V$; $E_{FINAL} = 0.0 V$ AND $\nu = 100 mVs^{-1}$	62
FIGURA 19. VOLTAMETRIA CÍCLICA DOS COMPLEXOS $Al(DFO)$ E $Ga(DFO)$ EM SOLUÇÃO AQUOSA A PH 7,4, COM $NaCl$ 100 MM COMO SUPORTE ELETROLÍTICO. $E_i = +0.0 V$; $E_{\lambda 1} = 0.0 V$; $E_{\lambda 2} = +0.75 V$; $E_{FINAL} = 0.0 V$ E $\nu = 100 mVs^{-1}$	63

FIGURA 20. VOLTAMETRIA CÍCLICA DOS COMPLEXOS AL(DFCAF) E GA(DFCAF) EM SOLUÇÃO DIMETILSULFÓXIDO COM TTB 100 MM COMO SUPORTE ELETROLÍTICO. $E_i = +0.0\text{ V}$; $E_{\lambda 1} = 0.0\text{ V}$; $E_{\lambda 2} = +0.75\text{ V}$; $E_{\text{FINAL}} = 0.0\text{ V}$ E $\nu = 100\text{ mVs}^{-1}$	65
FIGURA 21. ESPECTROS $^1\text{H-RMN}$ DE DFO E AL(DFO) EM D_2O	67
FIGURA 22. ESPECTROS $^1\text{H-RMN}$ DE DFCAF E AL(DFCAF) EM $\text{DMSO-}d_6$	68
FIGURA 23. ESPECTROS ELETRÔNICOS UV PARA AL(DFO) E GA(DFO), A $310\text{ }\mu\text{M}$ EM PH NEUTRO.	70
FIGURA 24. ESPECTRO ELETRÔNICO UV PARA DFCAF, AL(DFCAF) E GA(DFCAF) A $628,3\text{ }\mu\text{M}$ EM DMSO.	71
FIGURA 25. ESQUEMA DO TESTE COM CALCEÍNA- Fe^{3+} (CAFE): (A) A ALTA AFINIDADE DO LIGANTE L (DFO OU DFCAF) PELO Fe^{3+} LIBERA A Sonda CALCEÍNA E A FLUORESCÊNCIA É AUMENTADA. (B) SE DFO E DFCAF ENCONTRAM-SE COMPLEXADOS A ME (Al^{3+} OU Ga^{3+}), ENTÃO A REGENERAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DEVE SER RETARDADA.	72
FIGURA 26. RECUPERAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE CAFE POR ME, L OU MEL EM TAMPÃO HBS (ME = Al^{3+} OU Ga^{3+} ; L = DFO OU DFCAF)..	73
FIGURA 27. ESQUEMA DO TESTE COM HIDROXIQUINOLINA (8-HQ): (A) A Sonda COMPLEXA ME (Al^{3+} OU Ga^{3+}) E A FLUORESCÊNCIA É AUMENTADA. (B) SE DFO E DFCAF ENCONTRAM-SE COMPLEXADOS, ENTÃO A REGENERAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DEVE SER INALTERADA.	74
FIGURA 28. INTERAÇÃO DE ME, L OU MEL EM TAMPÃO HBS (ME = Al^{3+} OU Ga^{3+} ; L = DFO OU DFCAF) COM 8-HQ $750\text{ }\mu\text{M}$	75
FIGURA 29. ESQUEMA DO TESTE COM (A) FLUORESCÉINA-DESFERRIOXAMINA (FLDFO), (B) A FLUORESCÊNCIA DO LIGANTE É SUPRIMIDA AO SE COMPLEXAR COM O Fe^{3+} . (C) ME (Al^{3+} OU Ga^{3+}) NÃO SUPRIMEM A FLUORESCÊNCIA DA Sonda, LOGO AO SE CONFRONTAR COM O Fe^{3+} , A SUPRESSÃO É DEPENDENTE DA ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS AL(FLDFO) OU GA(FLDFO). A COMPETIÇÃO PELO Fe^{3+} É TAMBÉM AVALIADA COM AL(DFO) E GA(DFO) NESTE SISTEMA.	76
FIGURA 30. EFEITO DE (A) ME LIVRE OU (B) ME(DFO) (ME = Al^{3+} OU Ga^{3+}) NA FLUORESCÊNCIA DE FLDFO. PARA CLAREZA É SUBTRAÍDA A FLUORESCÊNCIA DE FUNDO DA FLDFO ($\sim 0,3\text{ U.R.}$). U.R. = UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCÊNCIA.	78
FIGURA 31. ESQUEMA DO TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O SISTEMA FERRO/ASCORBATO [109].....	79
FIGURA 32. EFEITO DE ME, L OU MEL (ME = Al^{3+} OU Ga^{3+} ; L = DFO OU DFCAF) NA VELOCIDADE DE OXIDAÇÃO DE DHR CATALISADA PELO SISTEMA FERRO/ASCORBATO. U.R. = UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCÊNCIA.....	80
FIGURA 33. VALORES DE IC_{50} PARA OS COMPOSTOS NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS.....	81
FIGURA 34. LOCALIZAÇÃO EM FHUA DE (A) FERRO-FENILFERRICROCINA OU (B) Fe(DFCAF) . PARA FERRO-FENILFERRICROCINA: DADOS DO PROTEIN DATA BANK (CÓDIGO 1QJQ [119]). DESENHO COM MARVIN SKETCH, DOCAGEM EM AUTODOCK E VISUALIZAÇÃO EM CHIMERA 1.10.2. ESTÁ MOSTRADA APENAS A INTERAÇÃO MAIS FAVORÁVEL ENERGETICAMENTE.....	83
FIGURA 35. O APARECIMENTO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS CONTRA ALGUNS PATÓGENOS HUMANOS. (*) CEPAS DOS PATÓGENOS QUE NÃO SÃO TRATÁVEIS COM MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS CONHECIDOS [93].	86
FIGURA 36. ESPECTRO DE MASSAS DE AL(DFO).....	18
FIGURA 37. ESPECTRO DE MASSAS DE GA(DFO).....	21
FIGURA 38. ESPECTRO DE MASSAS DE DFCAF.	24
FIGURA 39. ESPECTRO DE MASSAS DE AL(DFCAF).....	28
FIGURA 40. ESPECTRO DE MASSAS DE GA(DFCAF).....	31
FIGURA 41. VOLTAMETRIA CÍCLICA D CAFEÍNA $100\text{ }\mu\text{M}$ (LINHA VERMELHA) EM SOLUÇÃO ELETROLÍTICA TTB 100 MM (LINHA PRETA). $E_i = +0.0\text{ V}$; $E_{\lambda 1} = -1.0\text{ V}$; $E_{\lambda 2} = 0.0\text{ V}$; $E_{\text{FINAL}} = 0.0\text{ V}$ AND $\nu = 100\text{ mVs}^{-1}$	34
FIGURA 42. VOLTAMETRIA CÍCLICA DE AL(DFCAF) E GA(DFCAF) EM SOLUÇÃO ELETROLÍTICA TTB, PARA METAL-LIGANTE: $50\text{-}200\text{ }\mu\text{M}$ (LINHA VERMELHA), $100\text{-}100\text{ }\mu\text{M}$ (LINHA AZUL), $200\text{-}100\text{ }\mu\text{M}$ (LINHA VERDE) E DFCAF $100\text{ }\mu\text{M}$ (LINHA PRETA). $E_i = +0.0\text{ V}$; $E_{\lambda 1} = 0.0\text{ V}$; $E_{\lambda 2} = +0.75\text{ V}$; $E_{\text{FINAL}} = 0.0\text{ V}$ AND $\nu = 100\text{ mVs}^{-1}$	35

FIGURA 43. ORBITAIS HOMO E LUMO PARA AL(DFO). INPUT PARA GAUSSIAN03® GERADO COM AVOGADRO®: #N B3LYP/6-31G(D) OPT SP POP=REG FORMCHECK.	36
FIGURA 44. DIAGRAMA DA ESPECIAÇÃO DE AL(DFO) A 25 °C, GERADO COM MARVIN SKETCH. AS ESTRUTURAS PREDOMINANTES EM PH NEUTRO SÃO APRESENTADAS.	37
FIGURA 45. DISTRIBUIÇÃO DA CARGA PARCIAL POSITIVA (AZUL), NEUTRA (BRANCO) E NEGATIVA (VERMELHO) DE CADA ÁTOMO EM AL(DFO) EM PH 7,4; ESTRUTURAS OTIMIZADAS COM UFF NO PROGRAMA AVOGADRO E TRATADAS NO PROGRAMA MARVIN SKETCH.....	38
FIGURA 46. CURVAS DOSE RESPOSTA DE AL ³⁺ , AL(DFO), AL(DFCAF), DFCAF, GA ³⁺ , GA(DFO), GA(DFCAF), DFO EM <i>E. COLI</i>	40
FIGURA 47. CURVAS DOSE RESPOSTA DE AL ³⁺ , AL(DFO), AL(DFCAF), DFCAF, GA ³⁺ , GA(DFO), GA(DFCAF), DFO EM <i>P. AERUGINOSA</i>	41
FIGURA 48. CURVAS DOSE RESPOSTA DE AL ³⁺ , AL(DFO), AL(DFCAF), DFCAF, GA ³⁺ , GA(DFO), GA(DFCAF), DFO EM <i>S. AUREUS</i>	42
FIGURA 49. CURVAS DOSE RESPOSTA DE AL ³⁺ , AL(DFO), AL(DFCAF), DFCAF, GA ³⁺ , GA(DFO), GA(DFCAF), DFO EM <i>C. ALBICANS</i>	44
FIGURA 50. (A) FE(DFO). (B-H) ESQUEMA COMPARATIVO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE FE(DFCAF) EM FHUA.	45

Lista de Tabelas

TABELA 1. ESQUEMA COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE FERRO, ALUMÍNIO E GÁLIO E SUS CÁTIOS TRIVALENTES [3, 6, 10, 22, 23].....	22
TABELA 2. REAGENTES E SOLVENTES.....	37
TABELA 3. MODOS VIBRACIONAIS REPRESENTATIVOS DE DFO E DFCAF (cm^{-1}). U: ESTIRAMENTO, Δ : DEFORMAÇÃO.....	55
TABELA 4. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DO ESPECTRO ^1H -RMN DE DFO E DFCAF.....	57
TABELA 5. TABELA RESUMO DOS PICOS NOS ESPECTROS DE MASSA DE Al(DFO), Ga(DFO), DFCAF, Al(DFCAF), Ga(DFCAF).....	60
TABELA 6. ENERGIA DE AFINIDADE Fe(DFCAF) EM FHUA. VALORES OBTIDOS DO DOCAGEM MOLECULAR COM AUTODOCK.	44

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1. Alumínio e gálio	18
1.1.1. Comparação com o ferro	22
1.2. Alumínio e Gálio em metaloterapêuticos.....	23
1.2.1. Hidróxido de alumínio.....	24
1.2.2. Fosfato de alumínio	24
1.2.3. Alúmen.....	25
1.2.4. Glicinato de alumínio	25
1.2.5. Nitrato de gálio	26
1.2.6. Cloreto de gálio	26
1.2.7. Quinolato e Maltolato de gálio	27
1.3. Sideróforos	27
1.3.1. Desferrioxamina B (dfo)	28
1.3.2. Desferrioxamina-cafeína (dfcaf)	30
1.4. Efeito Cavalo de Tróia.....	31
1.5. Bactérias e fungos	32
1.6. Técnicas computacionais	33
2. Objetivos.....	36
2.1 Hipótese	36
2.2 Objetivo geral	36
2.3 Objetivos específicos.....	36
3. Parte Experimental.....	37
3.1. Materiais e Métodos	37
3.2. Síntese do ligante dfcaf	38
3.3. Caracterização do dfcaf	39
3.3.1. Solubilidade do dfcaf	39
3.3.2. Análise elementar	39

3.3.3. Temperatura de fusão	39
3.3.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)	39
3.3.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	40
3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)	40
3.4. Síntese e caracterização dos complexos <i>Al(dfo)</i>, <i>Ga(dfo)</i>, <i>Al(dfcaf)</i>, <i>Ga(dfcaf)</i>.....	40
3.4.1. Síntese de <i>Al(dfo)</i> e <i>Ga(dfo)</i>	40
3.4.2. Síntese de <i>Al(dfcaf)</i> e <i>Ga(dfcaf)</i>	41
3.4.3. Análise quantitativa de Alumínio e Gálio	42
3.4.4. Espectrometria de massas (EM)	42
3.4.5. Voltametria Cíclica (VC)	42
3.4.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)	43
3.4.7. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)	43
3.5. Equilíbrios competitivos com sondas fluorescentes.....	43
3.5.1. Complexos versus calceína-ferro (CAFe)	43
3.5.2. Complexos versus 8-HQ	43
3.5.3. Testes com FLDFO	44
3.6. Atividade antioxidante dos complexos	44
3.7. Testes biológicos	45
3.7.1. Transferência de cultivos e incubação	45
3.7.2. Preparação de diluições microbianas em solução salina	46
3.7.3. Contagem de micróbios	47
3.7.4. Preparação da microplaca	48
3.7.5. Leitura na microplaca	48
3.7.6. Cálculo do IC_{50}	50
3.8. Previsão de propriedades físico-químicas por métodos computacionais.....	50
4. Resultados e Discussão	51
4.1. Síntese e caracterização do ligante <i>dfcaf</i>.....	51
4.1.1. Solubilidade do <i>dfcaf</i>	51
4.1.2. Análise elementar	53
4.1.3. Temperatura de fusão	53
4.1.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)	53
4.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	54
3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)	56
4.2. Síntese e caracterização dos complexos <i>Al(dfo)</i>, <i>Ga(dfo)</i>, <i>Al(dfcaf)</i>, <i>Ga(dfcaf)</i>.....	59
4.2.1. Espectrometria de massas	59

4.2.2. Voltametria cíclica.....	61
4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (¹ H-RMN).....	66
4.2.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)	69
4.3. Equilíbrios competitivos com sondas fluorescentes.....	71
4.3.1. Complexos versus calceína-ferro (CAFe).....	72
4.3.2. Complexos versus 8-HQ	73
4.3.3. Testes com FLDFO	75
4.4. Atividade antioxidante dos complexos	79
4.5. Testes biológicos	81
4.5.1. <i>E. coli</i>	82
4.5.2. <i>P. aeruginosa</i>	84
4.5.3. <i>S. aureus</i>	85
4.5.4. <i>C. albicans</i>	85
5. Conclusões.....	87
6. Perspectivas	88
7. Bibliografia	89
8. Anexos	18
8.1. Mecanismos propostos para os espectros de massa.....	18
8.1.1 Al(dfo)	18
8.1.2. Ga(dfo)	21
8.1.3. dfcaf	24
8.1.4. Al(dfcaf).....	28
8.1.5. Ga(dfcaf)	31
8.2. Voltametria Cíclica	34
8.2.1.Cafeína em DMSO.....	34
8.2.2. Al(dfcaf) e Ga(dfcaf)	35
8.3. ¹H-NMR.....	36
8.3.1. Orbitais HOMO-LUMO em Al(dfo)	36
8.3.2. Diagrama de especiação de Al(dfo)	37
8.3.3. Distribuição de carga parcial no Al(dfo).....	38
8.4. Curvas dose-resposta nos microrganismos.....	39
8.4.1. <i>E. coli</i>	39
8.4.1. <i>P. aeruginosa</i>	40
8.4.1. <i>S. aureus</i>	41

8.4.1. <i>C. albicans</i>	43
8.5. Docagem molecular: Fe(dfcaf) / FhuA	44
9. <i>Súmula curricular</i>	46

1. Introdução

1.1. Alumínio e gálio

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre (~8%), encontra-se em mais de 270 minerais, possui propriedades atrativas como baixa densidade, maleabilidade, resistência a corrosão e boa condutividade térmica e elétrica, justificando o custo de obtê-lo a partir da bauxita, além de obtê-lo mais barato reciclado. Há mais de 150 anos foi considerado um metal nobre junto com o ouro e a prata. Por exemplo, Napoleão III ordenava o uso de talheres de alumínio no jantar dos convidados mais importantes, onde príncipes e duques ordinários tiveram que se conformar com o “simples” ouro [1]. Júlio Verne escreveu sob o alumínio no livro *Da Terra à Lua* (1865): “Este metal precioso possui a brancura da prata, a indestrutibilidade do ouro, a tenacidade de ferro, a fusibilidade de cobre, a leveza do vidro. É facilmente forjado, é muito amplamente distribuído, formando a base da maioria das rochas, é três vezes mais leve que o ferro, e parece ter sido criado com o propósito expresso de fornecer-nos o material para o nosso projétil” (Figura 1) [2].

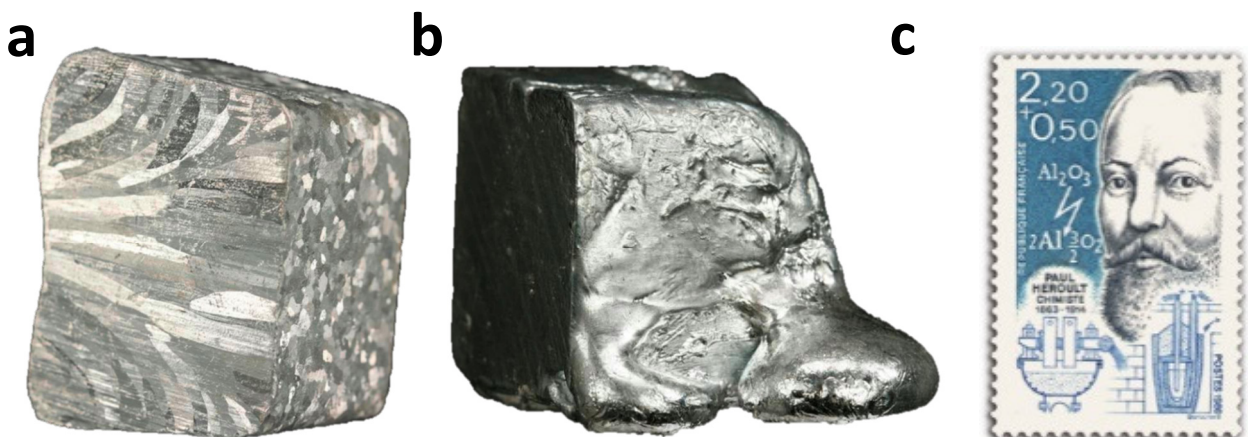


Figura 1. (a) Alumínio de alta pureza, (b) gálio se fundindo a temperatura ambiente [3] e (c) o selo postal (1986) em homenagem de Paul Héroult o descobridor da eletrolise de alumínio [1].

A alta afinidade do alumínio pelo oxigênio e a estabilidade química dos seus óxidos e silicatos fizeram muito difícil o isolamento dele em forma pura por longo tempo. Humphry Davy e Jöns Jakob Berzelius encontravam-se tentando obter os elementos puros de forma independente, contidos na cal, magnésia, barita, sílice e alumina, entre outros, deixados por Antoine Lavoisier, o *Pai da química moderna*. Davy foi descobridor de nada menos que seis elementos químicos entre 1807 e 1808: potássio, sódio, magnésio, cálcio, estrôncio e bário, e também teve como ilustre discípulo a Michael Faraday [4]; Berzelius descobriu o selênio, o silício e o tório e teve como discípulo a Friedrich Wöhler, que foi o primeiro a obter uma amostra pura de alumínio em 1827.

Foi apenas em 1886, que foi desenvolvido o processo de produção de alumínio com base na eletrólise da alumina (Al_2O_3), por Charles M. Hall nos EUA e Paul Louis T. Héroult na França, de forma totalmente independente (Figura 1c) [5]. O nome do principal processo de obtenção na atualidade chama-se, portando, Hall-Héroult, sendo o Brasil o quarto produtor no mundo [6]. O alumínio convive conosco, encontrando-se desde as cozinhas até os aviões. Como o alumínio tem um potencial de redução muito baixo (Tabela 1), o que faz ele se oxidar antes que outro material mas só superficialmente formando uma fina capa de óxido de alumínio que protege ao metal [3], é tão bom quanto o aço inoxidável, com a vantagem de ser mais leve.

Ao falar de alumínio, automaticamente podemos lembrar da história da tabela periódica dos elementos químicos e do russo Dmitri Ivanovich Mendeleev, quem em 1869 publicou uma tabela que previu a existência de três elementos, apoiando-se na valência, termo cunhado pelo inglês Edward Frankland em 1852. As previsões feitas por Mendeleev foram arriscadas e contundentes, corrigindo pesos atômicos para o berílio, o índio e o urânio. Para que a tabela funcionasse deixou vários buracos nela, predizendo o comportamento químico que os elementos faltantes teriam. O eka-alumínio, afirmou Mendeleev, teria propriedades intermediárias entre o alumínio e o índio, devido a que deve se encontrar no meio deles, com um peso atômico de 68, densidade $5,9 \text{ g/cm}^3$ e temperatura de fusão baixa. Ele também previu o eka-silício e o eka-boro. Foi em 1874, quando o jovem químico francês Paul Émile Lecoq achou umas raras linhas espectrais correspondentes a um novo elemento com temperatura de fusão de 30°C , densidade $5,904 \text{ g/cm}^3$ e um peso atômico de 69 que batizou como “gálio”, do antigo nome latim de França (ou talvez pelo sobrenome Lecoq que significa “galo”, que no latim é *gallus*). Depois foram descobertos o escândio e o germânio, por Lars Fredrick Nilson (1878) e Clemens Alexander Winkler (1886) respectivamente, confirmando o êxito das previsões de Mendeleev [5].

O alumínio também serviu para descobrir a radioatividade artificial, quando em 1934 Frédéric Joliot e Irene Curie bombardearam uma fina folha deste elemento com partículas alfa transformando-o em Fósforo-30 [7].

A existência do gálio significou a comprovação da teoria periódica de Mendeleev. Este elemento é extraído do minério bauxita, sendo uma impureza no processo de obtenção de alumínio. Certamente é a bauxita a principal fonte comercial do elemento onde se encontra a 0,01%. Embora o mercúrio é o único metal considerado líquido a temperatura ambiente, o gálio tem uma temperatura de fusão próxima, 29,76°C, o qual tem uma aplicação prática numa liga patenteada como “galinstan”, das sílabas iniciais de gálio, índio e *stannum*, nome latim de estanho, usada no termômetro para febre em substituição ao mercúrio. Porém, o uso mais importante do gálio e outros metaloides encontra-se em semicondutores, chips de computador e emissores de luz (LED), principalmente como arseneto de gálio e nitreto de gálio [3].

A primeira publicação sobre o potencial terapêutico do gálio foi feita em 1931 por *Levaditi et. al.* [8] experimentando com citrato a erradicação da sífilis em coelhos e a eliminação da infecção produzida por *Trypanosoma evansi* em ratos. Uma concentração alta, 750 mg Ga/kg, foi tolerada em ratos, e a partir disso o gálio ganhou a fama de “não tóxico”. Na década de 1950, aproveitando essa tolerância *in vivo* e o tempo de meia-vida (14 h) do isótopo ^{72}Ga , tentou-se utilizar a radioatividade para detecção e tratamento de câncer nos ossos, mas sem êxito [9]. Alumínio e gálio têm em comum a configuração eletrônica ns^2np^1 , sendo o estado de oxidação +3 o mais comum, existindo também estados de oxidação menores [10]. Por exemplo, o hidreto de alumínio (AlH) detectado espectroscopicamente em matrizes de argônio a 14 K [11] e o hidreto de gálio gerado em fase gasosa a altas temperaturas (1200°C) [12], ou o haleto de alumínio como produto da reação de HX (X=Cl, Br ou I) com alumínio fundido a altas temperaturas (800 – 1000°C) [13]. O alumínio(I) também pode formar compostos organometálicos por diferentes rotas sintéticas [14-16], sendo o primeiro composto estável desse tipo isolado e caracterizado estruturalmente o $[\text{AlCp}]_4$ (Cp=ciclopentadienil, $\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$), que possui no centro um tetraedro de Al_4 e quatro ligantes Cp em cada vértice (Figura 2).

A propriedade química mais significativa do alumínio e gálio no estado de oxidação 3+ é a eletrofilicidade ou acidez do centro metálico eletropositivo, com pK_a baixos (Tabela 1) nos cátions hidratados que agem como ácidos de Brønsted, fonte de prótons em solução aquosa [17].

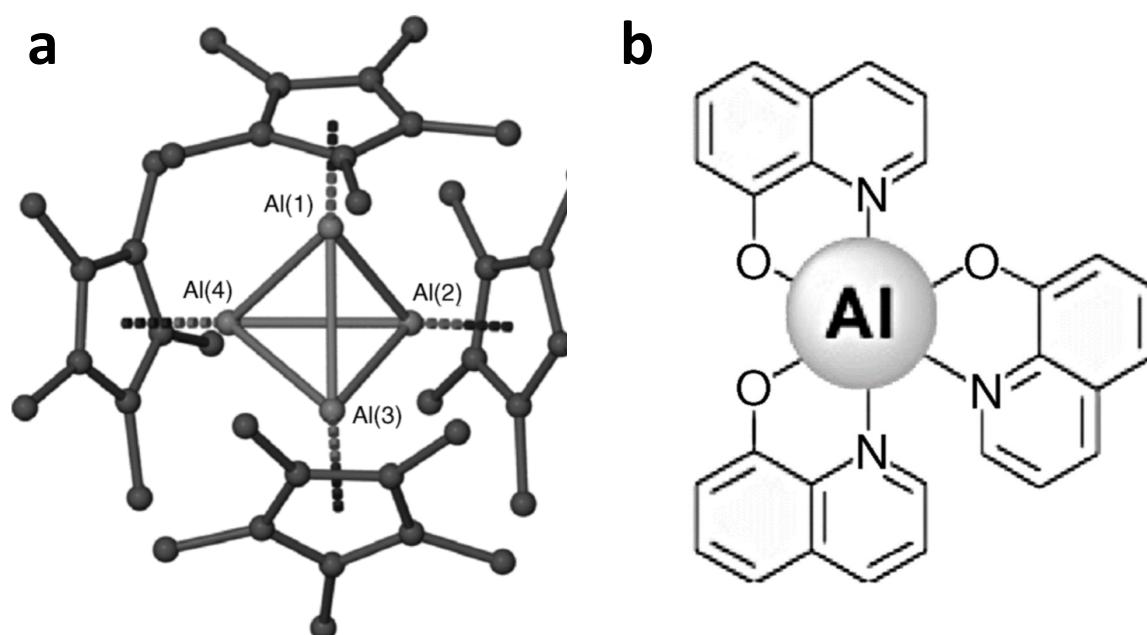


Figura 2. (a) Estrutura molecular de ciclopentadienilalumínio $[AlCp]_4$ ($Cp = \eta^5-C_5Me_5$) [14] e (b) Tris (8-hidroxiquinolina) de alumínio [10]

Como ácidos de Lewis apresentam uma química de coordenação bem parecida com os metais de transição, dependendo sua química da estabilidade com os ligantes na molécula. Os complexos deles têm importantes aplicações como na extração de metais, sínteses em geral, catálise, diagnóstico médico e terapia, e na fabricação de materiais semicondutores, como no caso do tris(8-hidroxiquinolina) de alumínio (Figura 2), um composto de coordenação muito estudado para a fabricação de díodos orgânicos emissores de luz (OLEDs) [18].

1.1.1. Comparação com o ferro

A participação de alumínio e gálio em sistemas vivos encontra-se fortemente relacionada com a do ferro, um metal essencial [19], responsável do transporte de oxigênio [20], transferência eletrônica e processos redox [21] entre outros. Alumínio e gálio, como cátions triplos, têm algumas características bem próximas às do ferro(III) (Tabela 1).

Tabela 1. Esquema comparativo das propriedades físico-químicas de ferro, alumínio e gálio e sus cátions trivalentes [3, 6, 10, 22, 23].

	Alumínio	Gálio	Ferro
Número atômico	13	31	26
Abundância (%)			
Universo	0,005	1×10^{-6}	0,11
Crosta terrestre	8,1	0,0019	6,3
Configuração eletrônica			
Neutro	[Ne] $3s^2 3p^1$	[Ar] $3d^{10} 4s^2 4p^1$	[Ar] $3d^6 4s^2$
Estado de oxidação +3	[Ne]	[Ar] $3d^{10}$	[Ar] $3d^5$
Eletronegatividade de Pauling	1,61	1,81	1,83
$I_1 / I_2 / I_3$ (kJ mol ⁻¹)	577 / 1816 / 2744	579 / 1979 / 2963	762 / 1562 / 2957
Condutividade elétrica (S/m)	$3,8 \times 10^7$ (condutor)	$7,1 \times 10^6$ (condutor)	$1,0 \times 10^7$ (condutor)
Tipo magnético	Paramagnético	Diamagnético	Ferromagnético
Temperatura de fusão (°C)	660,32	29,76	1538
Densidade (g/cm ³)	2,7	5,9	7,8
Potencial padrão de eletrodo (V) {E°, Me ³⁺ + 3e ⁻ → Me}	-1,66	-0,549	+770 (Fe ³⁺ /Fe ²⁺)
Raio iônico trivalente (Å), NC=6	0,54	0,62	0,65 d^5 spin alto 0,55 d^5 spin baixo
Raio covalente em Me ³⁺ (Å)	1,18	1,26	1,25
pK _{a1} do [Me(H ₂ O) ₆] ³⁺	4,99	2,60	2,20
Log K _{ps} (Me(OH) ₃)	-33,5	-37,0	-38,0
Log β (Me ^{III} (dfo))	36,11	38,96	42,33

Dentre elas, destacam-se o raio iônico e alta carga (o que faz deles ácidos duros de Pearson), uma solubilidade extremamente baixa em meios neutros, uma alta estabilidade dos compostos, e uma acidez muito forte em água provocada pelo enfraquecimento da ligação O-H nas águas de complexação em $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, devido à forte atração eletrostática metal-oxigênio [24]. Mas, têm diferenças importantes. Diferentemente do alumínio ou gálio, o ferro tem uma relativa facilidade para mudar de estado de oxidação em sistemas vivos [10, 25]. Os potenciais de redução padrão (mV) são muito diferentes: $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = +770$; $\text{Al}^{3+}/\text{Al} = -1680$; $\text{Ga}^{3+}/\text{Ga} = -530$ (Tabela 1) [26]. *In vivo*, isso se traduz em que eles não podem ser carregados em grupos *heme*, componente fundamental da hemoglobina e mioglobina, ou em citocromos, proteínas ligadas a uma membrana que efetuam o transporte de elétrons, ou em muitas outras enzimas, assim também não favorecem o transporte de oxigênio nem outras funções vitais [27]. Além da forma de se transportar em meios vivos, ferro catalisa a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) mediante a reação de Fenton, sendo potencialmente tóxico na sua forma *lábil*, e é também ativador da morte celular de forma não apoptótica, mediante a ferroptose [28], efeito que é desconhecido ainda para alumínio e gálio.

Essas características outorgam ao alumínio e ao gálio uma gama de possibilidades como metaloterapêuticos.

1.2. Alumínio e Gálio em metaloterapêuticos

O alumínio é um dos principais metais usados em fármacos, para o tratamento de numerosas doenças. É classicamente usado como adjuvante em vacinas, na forma de hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e alúmen ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). A ação do adjuvante consiste na capacidade de ligar ou absorver um grande número de antígenos numa ampla área superficial, melhorando a interação das células do sistema imune com seus antígenos e estimulando a resposta imune [29]. A *US Food and Drug Administration* permite 0,85 - 0,125 mg/dose, que encontra-se praticamente na maioria das vacinas [30]. É também usado como antiácido, em transtornos metabólicos, fármacos antimaláricos, entre outros. Uma breve revisão é apresentada a seguir.

1.2.1. Hidróxido de alumínio

É aprovado o uso do hidróxido de alumínio em vacinas destinadas a humanos e animais, bem como adjuvante isolado ou acompanhado sinergicamente de outro, ou seja, como coadjuvante. Como no caso de T-ginseng que em sinergia com o hidróxido de alumínio melhora potencialmente a resposta de vários antígenos como a *Porcina parvovirus* [31]. Se bem que os mecanismos ainda são desconhecidos, a ação conjunta dos adjuvantes pode estimular um maior número de células imunes que atuando por separado. O hidróxido de alumínio junto ao T-ginseng fornece um jeito simples, barato e seguro de potencializar o efeito nas vacinas, além de diminuir a dose necessária de alumínio na preparação farmacêutica nas vacinas [27]. Outro importante uso do hidróxido de alumínio é como antiácido. Os antiácidos são substâncias que exibem efeitos protetores frente a ataques na mucosa gástrica, podendo também restaurar e curar úlceras por mecanismos ainda em estudo. Para neutralizar o ambiente ácido na mucosa o composto atua em combinação com cálcio para combater a diarreia ou com magnésio para combater a constipação [32]. Uma série de preparações de antiácidos comerciais contendo hidróxido de alumínio são Maalox[®], Di-Gel[®], Mylanta[®], Riopan[®], Roloids[®], Aludrox[®], etc.

1.2.2. Fosfato de alumínio

É usado como adjuvante em vacinas, um exemplo é o *Chiron (Haemophilus influenza tipo b)* uma vacina do conjugado Hib-CRM₁₉₇ contendo AlPO₄, que é mais estável que Al(OH)₃. Estudos em camundongos e porcos da Índia demonstraram um aumento da imunogenicidade, apesar do fato de que o conjugado permanece em grande parte não absorvida nesta formulação particular. A presença de AlPO₄ melhora significativamente a imunogenicidade da vacina Hib-CRM₁₉₇ em comparação com a vacina sem adjuvante. Um estudo piloto demonstrou que a nova formulação foi segura e imunogênica para crianças, incrementando consideravelmente o anticorpo anti-PRP (anti-polyribosyl ribitol fosfato) [33]. O uso de AlPO₄ abre a área de desenvolvimento de vacinas conjugadas com adjuvante em combinação com outras vacinas.

1.2.3. Alúmen

$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ é um adjuvante amplamente usado em produtos farmacêuticos associados com a imunização [34]. Embora o mecanismo de ação é ainda matéria de estudo, o alumínio tem um papel importante na capacidade de neutralizar alvos moleculares carregados negativamente (como a proteína fibrinogênio presente no plasma e componente principal no processo de coagulação), incrementando os efeitos hidrofóbicos que podem levar à precipitação de proteínas em superfícies hidrofílicas, ou provocar mudanças em estruturas terciárias interagindo com superfícies hidrofóbicas/hidrofílicas [27].

1.2.4. Glicinato de alumínio

O 2-aminoacetildihidroxoalumínio, $[Al(NH_2CH_2COO)(OH)_2]$, ou glicinato de alumínio apresenta dois grupos hidroxil que participam junto com o hidróxido de alumínio como um tampão intragástrico [35]. Foi experimental e clinicamente testado [36] como neutralizador da acidez em úlcera péptica, que é uma lesão gástrica ou duodenal provocada pela secreção de ácido após infecção por *Helicobacter pylori*, ou também pelo tabagismo.

Atualmente é usado junto ao trissilicato de magnésio e ao hidróxido de alumínio na formulação comercial Gastralgina® [37] utilizado para o alívio de curto prazo de excesso de gás no trato gastrointestinal, e também é usado para aliviar os sintomas da cólica infantil. Uma outra formulação comercial é a Talcid® cujo componente principal é a hidrotalcita ($Mg_6Al_2(OH)_{10}CO_3 \cdot 4H_2O$) composta de camadas positivas de hidróxidos de alumínio e magnésio (1:3) compensadas com ânions carbonatos. A ação farmacológica ainda não é conhecida completamente, embora os estudos associem o mecanismo bioquímico com a ativação de genes da mucosa gástrica que podem incrementar a migração e proliferação celular na cratera da úlcera, o que permite a reepitelização e restauração da cicatriz [38].

1.2.5. Nitrato de gálio

O nitrato de gálio terapêutico se apresenta de duas formas, livre (GN) ou associado a citrato (CGN). O GCN é comercializado como Ganite[®], uma injeção com 97,8 mM de gálio:citrato (1:1) em pH neutro. A atividade antitumoral de GN em ratos foi reportado por primeira vez em 1971, demonstrando-se mais de 90% de inibição do crescimento de tumores implantados por via subcutânea em roedores [39].

Um efeito antihipercalemico em humanos foi também demonstrado, ao diminuir a excreção urinária de cálcio permitindo sua reabsorção pelos ossos [40]. A deposição de gálio acontece na superfície do osso na forma de fosfato de gálio, que influi eletrostaticamente na atração de cátions de cálcio. Um ponto relevante na bioquímica do gálio aparece neste estudo, porque pode inibir diretamente uma ATPase, chamada ATPase de prótons de tipo vacuolar (V-ATPase), enzima que bombeia prótons na superfície do tecido ósseo [41]. Por outro lado, CGN também apresenta toxicidade, principalmente de tipo renal, como demonstra um estudo feito em ratos com doses de 100 mg/kg, onde o dano é causado pela precipitação de fosfatos de gálio e cálcio nos túbulos renais [42].

1.2.6. Cloreto de gálio

Estudos em animais mostram que o cloreto de gálio (GC) apresenta atividade anticancerígena, principalmente na fase de crescimento exponencial dos tumores [43], sendo a via oral a forma mais efetiva de administração, porque evita a captação renal do fármaco [44]. O tratamento foi feito por 15 dias em 18 pacientes com câncer de pulmão, numa faixa de doses de 100 a 1400 mg/dia (18). Logo depois desse período alcançou-se um nível de concentração estacionário (371 ± 142 ng/mL) no sangue dos pacientes que não desenvolveram metástase, ao contrário daqueles que desenvolveram (nível de gálio no sangue insignificante) [45]. As concentrações reportadas foram consideradas demasiado altas para GC para ser usado como agente único no câncer, por isso estudos posteriores em pacientes com câncer de pulmão utilizaram associações com cisplatina [46].

1.2.7. Quinolato e Maltolato de gálio

O tris(8-quinolato) de gálio(III) foi desenvolvido para fornecer uma elevada biodisponibilidade oral para o uso de gálio no tratamento do câncer. Uma IC_{50} de 2,5 μ M de GQ foi obtida para adenocarcinoma do pulmão humano A549 *in vitro*. Um efeito antihipercalemicó também foi observado em ratos saudáveis, que frente a doses de 62,5 mg/kg/dia experimentaram uma relativa maior concentração de gálio nos ossos (7 μ g/g) sem sofrer transtornos pela toxicidade do GQ [47].

Por outro lado, o tris(3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onato) de gálio(III) ou maltonato de gálio é um complexo moderadamente solúvel em solução aquosa (coeficiente de partição octanol/água 0,41), e estável no intervalo de pH 5,5-8,0, que justifica sua administração oral. O GM demonstrou biodisponibilidade oral de gálio em indivíduos humanos saudáveis, alcançando um nível máximo de gálio sérico de 569 ng/mL quando administrado a 500 mg. Já testes de administração por via intravenosa demonstram que o gálio é quase completamente ligado com a transferrina, sendo somente 2% excretado na urina, o qual provoca toxicidade renal [48].

1.3. Sideróforos

A fisicoquímica do ferro em solução é tão importante para o alumínio e gálio como a química dos ligantes que o transportam de matrizes inorgânicas para meios vivos, tornando-o um dos metais que dá sentido à Química Bioinorgânica. Tais ligantes são os sideróforos.

Sideróforos são moléculas orgânicas sintetizadas por micróbios, como resultado do processo de evolução e transformação da atmosfera redutora para oxidante, que tornam o ferro acessível para microrganismos e plantas [49, 50]. Enterobactina, desferrioxamina B, ferricromo, pioverdina, entre muitos outros, são ligantes com características químicas necessárias para a aquisição de ferro destes ambientes inorgânicos (Figura 3). Os grupos funcionais encarregados da quelação são principalmente: ácido α -hidroxicarboxilato, catecol e ácido hidroxâmico. Nas últimas décadas, sínteses orgânicas envolvendo esses grupos funcionais são intensamente pesquisadas para a produção de sideróforos artificiais com fins biotecnológicos [51-53].

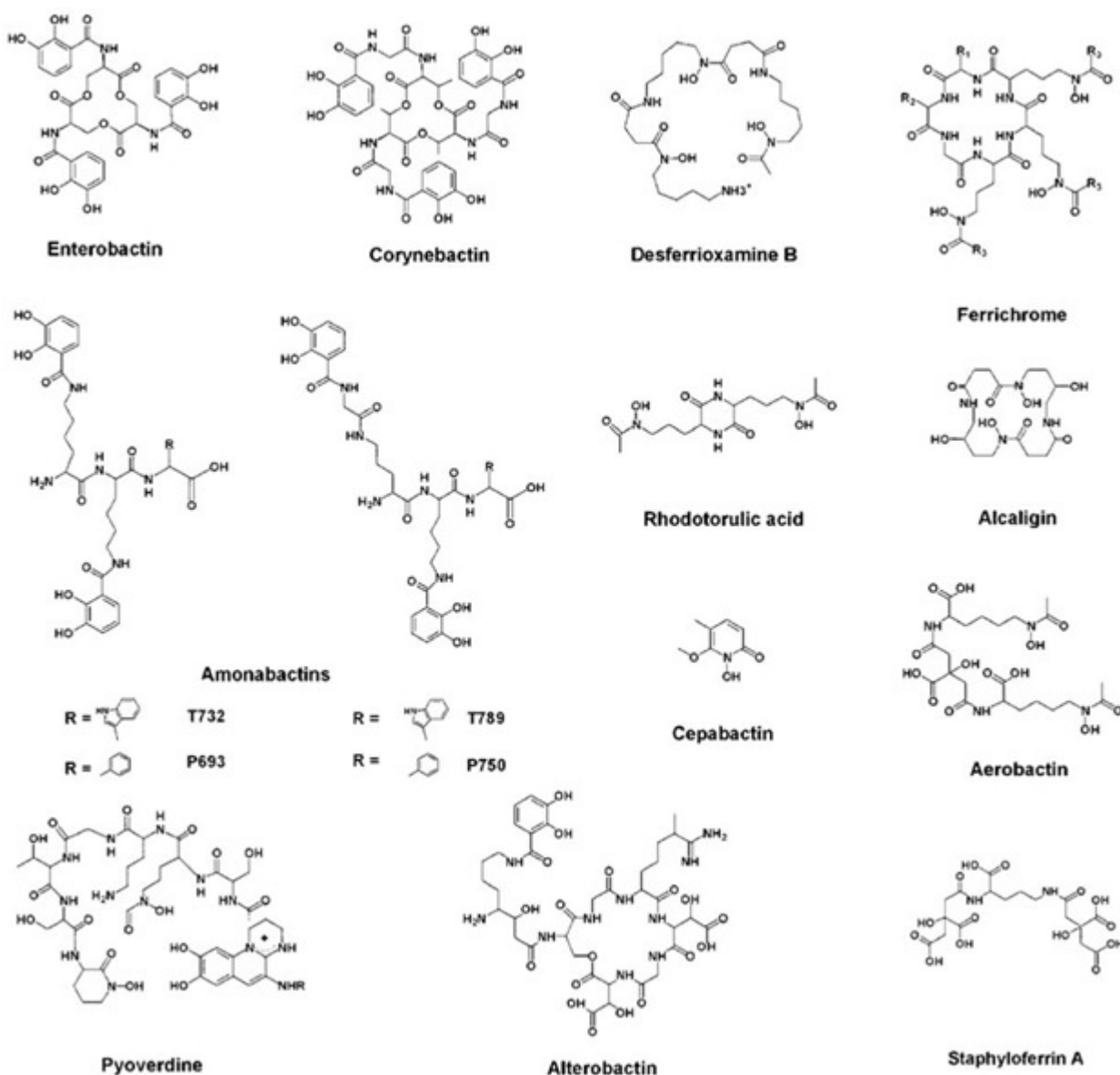
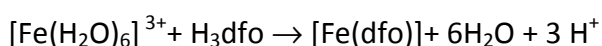


Figura 3. Algumas estruturas representativas dos sideróforos. De tipo hexadentado: enterobactina, corinebactina, desferrioxamina B, ferricromo, pioverdina, alterobactina, aerobactina e estafiloferrina; de tipo tetradentado: amonabactinas, ácido rodotorúlico e alcaligina; e de tipo bidentado: cepabactina [23].

1.3.1. Desferrioxamina B (dfo)

Desferrioxamina B, produzida pela bactéria *Streptomyces pilosus* [54], é um ligante linear hexadentado com três grupos hidroxamato (Figura 4), que o faz um ligante muito mais forte em baixas concentrações frente a ligantes com denticidade menor.

Cada grupo hidroxamato tem duas espécies ressonantes principais, uma estrutura com a carga negativa distribuída no átomo de oxigênio sozinho e outra estrutura com a carga negativa distribuída nos dois átomos de oxigênio, o que explica os valores próximos de dissociação ácida dos três grupos. Se bem que esses hidrogênios não são muito ácidos, o *efeito quelato* pode explicar a preferência a dissociação dos hidrogênios para a quelação do ferro, já que a quelação do metal aumenta a entropia do sistema de dois mols de reagentes para dez mols dos produtos:



A interação eletrostática também é um fator importante na força da ligação metal-oxigênio, governada por interações ácido duro-base dura de Pearson, respectivamente. Assim a desferrioxamina, que é uma molécula linear, torna-se exocíclica para ligar ao ferro (Figura 5), deixando os grupos hidroxamatos na direção do metal (como no caso de Al(dfo) ou aluminoxamina [55]). Essas características fizeram que a dfo seja o ligante mais estudado e usado em doenças por sobrecargas de ferro [56, 57]. Mas, se bem que a dfo demonstra atividade antioxidante [58] e anti-tumoral [59], sua baixa lipossolubilidade restringe sua administração à infusão intravenosa, fazendo o tratamento caro e incômodo para os pacientes [60].

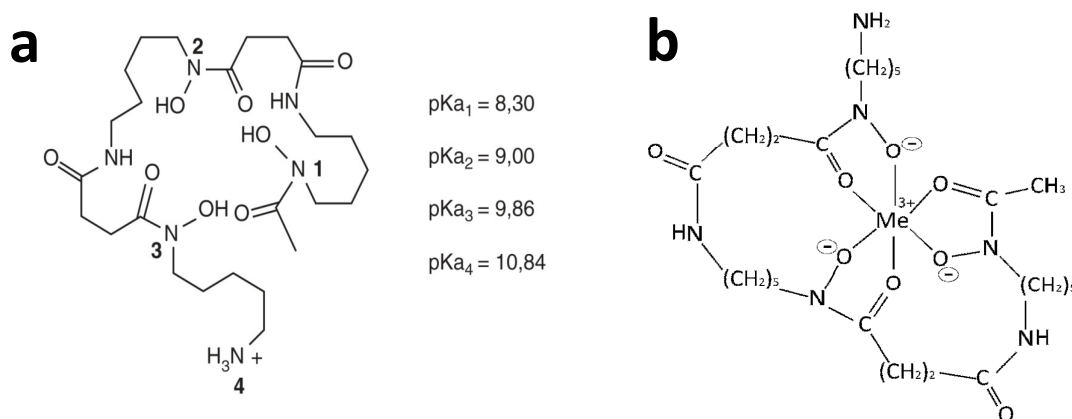


Figura 4. (a) Estrutura da desferrioxamina incluindo os pKa associados [61]; (b) coordenação de cátions trivalentes por dfo (Me = Al, Ga, Fe) [55].

1.3.2. Desferrioxamina-caffeína (dfcaf)

Esse novo ligante (Figura 5) conserva algumas características químicas da desferrioxamina como a idêntica atividade antioxidante, quelação de tipo octaédrica e uma considerável afinidade pelo ferro(III) em condições fisiológicas ($\log\beta$: 42,3 (dfo) [62], 23,0 (dfcaf) [63]). Se bem que a cafeína pode coordenar íons metálicos por seus átomos de nitrogênio e oxigênio, esses complexos são muito pouco estáveis [64], o qual garante que a quelação do dfcaf aos cátions acontece pelos grupos hidroxamatos. A conjugação com a cafeína outorga-lhe ao dfcaf um incremento na lipossolubilidade, facilitando a permeabilidade celular que não possui a desferrioxamina, certamente associado com características próprias da cafeína como a rápida absorção oral através do trato gastrointestinal, e a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Blood Brain Barrier, BBB) [65, 66].

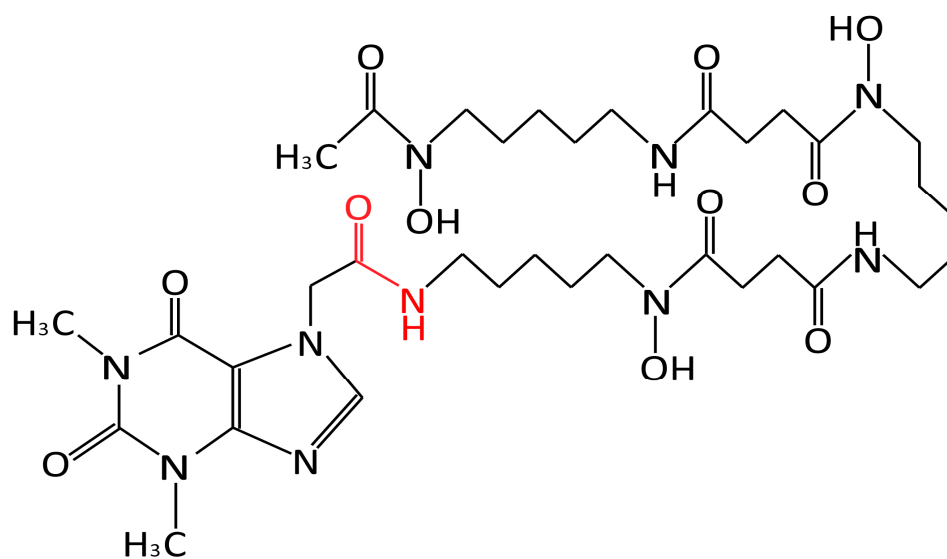


Figura 5. Estrutura da desferrioxamina-caffeína. Em vermelho os grupos encarregados da conjugação [63].

O dfcaf também apresenta propriedades ligantes com cobre(II) e manganês(II), mas a química desenvolvida com o cátion duro ferro(III) cria a expectativa da quelação com outro cátion duro como alumínio(III) e assim pesquisar o chamado efeito cavalo de Tróia.

1.4. Efeito Cavalo de Tróia

O termo cavalo de Troia é tomado da história da Guerra de Tróia, narrada na *Odisséia* de Homero e na *Eneida* de Virgílio, onde o exército grego ao não conseguir invadir Tróia simula o abandono da guerra e dá como oferenda a seus inimigos um monumento gigante de cavalo, que os troianos recebem sem suspeitar que dentro se escondiam os melhores guerreiros gregos. Estes saíram do cavalo à noite, abriram as portas da cidade e, assim, permitiram a entrada do exército grego e a conseqüente vitória.

No contexto científico, as primeiras publicações associadas com este efeito citam o mecanismo “pull and push” (1991) em referência ao poder quelante da desferrioxamina para puxar metais redox ativo como ferro ou cobre e empurrar metais redox inativo como o zinco [67]. Miller *et. al.* (1993) relatam a possibilidade de conjugados de sideróforos seguir o mesmo mecanismo que o sideróforo sozinho, mediante a participação do receptor FhuA para o transporte de ferro, o qual incentiva a pesquisa no efeito [68].

Apenas no ano 2000, Roosenberg *et. al.*, o termo cavalo de Tróia é apresentado numa revisão sobre o sistema já relatado em referência ao uso de [Fe(sideróforo)]-espaçador-droga para permitir a internalização de drogas em microrganismos provocando sua morte [69]. A partir de então a frequência de uso do termo aumentou sempre em referência ao transporte e entrega de compostos tóxicos através de uma barreira [70-73].

Uma adaptação dessa estratégia, usando só o sideróforo (desferrioxamina) e um metal tóxico (cadmio) sem a droga, foi utilizado. Assim, o complexo $[Cd(dfo)_2Cl_4]$ demonstrou maior toxicidade que o $CdCl_2$ nas bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e no fungo *Candida albicans* [74].

O efeito relatado não poderia acontecer sem algumas características bem interessantes da adaptação dos micróbios no processo evolutivo.

1.5. Bactérias e fungos

As bactérias e fungos são parte fundamental da biosfera e permitiram estudar de forma indireta a evolução da vida e as transformações que experimentou a atmosfera terrestre, assim como a procura de condições mínimas de vida em outros planetas [75]. Faz aproximadamente 3,5 bilhões de anos que a vida primitiva apareceu numa provável [76] atmosfera redutora terrestre com abundância de ferro(II) e traços de $O_{2(g)}$, com o qual formaram-se os primeiros esboços de vida unicelular.

Meio bilhão de anos depois, com o desenvolvimento das cianobactérias e a produção de $O_{2(g)}$ pelo processo da fotossíntese, a atmosfera tornou-se oxidativa até alcançar 21% de oxigênio molecular [77]. Nesse cenário os compostos antes ferrosos agora oxidados formam parte de minérios como compostos férricos com uma extrema insolubilidade que diminui sua biodisponibilidade. Esse período de transição demonstrou a capacidade de adaptação e evolução dos microrganismos, como recentemente a *E. coli* demonstrou selecionando resistência *in vitro* a antibióticos em 10 dias [78].

Bactérias e fungos desenvolveram técnicas de síntese de sideróforos [79], como já foi mencionado, mas as ínfimas concentrações de ferro(III) disponíveis em meio vivo, geraram uma alta competição pelo metal. Nessa competição muitos microrganismos se adaptaram, modificando sua membrana celular para a expressão de receptores de sideróforos de organismos competidores.

Essa promiscuidade é apresentada por exemplo em *E. coli*, que produz os sideróforos enterobactina e aerobactina, no entanto é capaz de absorver ferro com a desferrioxamina B [80]. *P. aeruginosa*, patógeno oportunista causador da maioria de infecções em hospitais, produz os sideróforos pioquelina e pioverdina mas também apresenta sistemas de consumo de ferrioxamina, Fe(dfo) [81, 82]. *S. aureus*, produz as estafiloferrinas A e B dentre outros, existindo evidências da aquisição de ferro por sideróforos com hidroxamatos [83, 84]. Além das bactérias nomeadas, o fungo *C. albicans* produz sideróforos com grupos hidroxamato além de sideróforos com grupos fenolato [85].

1.6. Técnicas computacionais

A química, que por excelência é uma ciência experimental, teve um ponto de inflexão no ano 1926 com a equação $\hat{H}\Psi = E\Psi$, concebida por Schroedinger para explicar os resultados experimentais obtidos por Stark no estudo do átomo de hidrogênio na presença de um campo elétrico uniforme [86]. A química teórica permitiu atuar como uma ferramenta de apoio na análise e interpretação de dados experimentais. O crescimento da área foi em paralelo com o desenvolvimento do computador, que tornou possível uma enorme quantidade de operações matemáticas, pelo qual denominou-se química computacional. Sendo em 2013, um ano de reconhecimento na área com o Nobel de química para Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel pelo desenvolvimento de modelos multiescala para sistemas químicos complexos. Com o desenvolvimento de software livre tornou-se possível o planejamento e execução de projetos de pesquisa com baixo custo financeiro, o qual tornou ainda mais popular a química computacional.

A química computacional está dividida em dois grandes campos: a mecânica clássica e a quântica (Figura 6). A quântica, que compreende o uso de métodos *ab initio*, semi-empírico e funcional de densidade, e a clássica, baseado principalmente na mecânica molecular. Uma mistura é possível, com métodos híbridos que permitem fazer o cálculo de dinâmica molecular em macromoléculas, e selecionar regiões geralmente de pequenas moléculas denominadas ligantes, onde se prefere um cálculo quântico.

Uma primeira etapa puramente química consiste no desenho e otimização da estrutura molecular, para o qual existem vários softwares disponíveis, nosso caso usamos Avogadro[®], um software livre compatível com todas os sistemas operacionais e prático para a geração de arquivos de cálculo. Gaussian[®] é um software exclusivo para cálculo (otimização de geometria, grupo de ponto, potencial eletrostático, densidade eletrônica, espectroscopia, etc), uma outra opção é Orca[®]. Moléculas já otimizadas estruturalmente encontram-se depositadas em *Maybridge, Cambridge Structural Database* ou livremente em *Zinc*.

Softwares como Pymol[®] ou Chimera[®] permitem a visualização e manipulação de macromoléculas (receptores proteicos, enzimas, etc.), as quais podem ser obtidas de grandes bancos de estruturas moleculares públicos como, por exemplo, o Protein Data Bank (PDB).

Um tratamento necessário para manipular as proteínas, como a eliminação das águas de cristalização ou a adição de hidrogênios, pode ser feito com o software livre AutoDock Vina®, o qual permite fazer *docking* molecular, uma técnica que começou a ser desenvolvida no início da década de 1980 e está baseada na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante na região de ligação (sitio ativo) de um alvo molecular (receptor), e na quantificação da afinidade dessa ligação. Outros softwares análogos são Eudock®, Dock®, SwissDock®, FlexX®, etc [87]. A maioria dos programas de *docking* utiliza modelos simples de funções de energia potencial baseados em campos de força da mecânica molecular clássica[88].

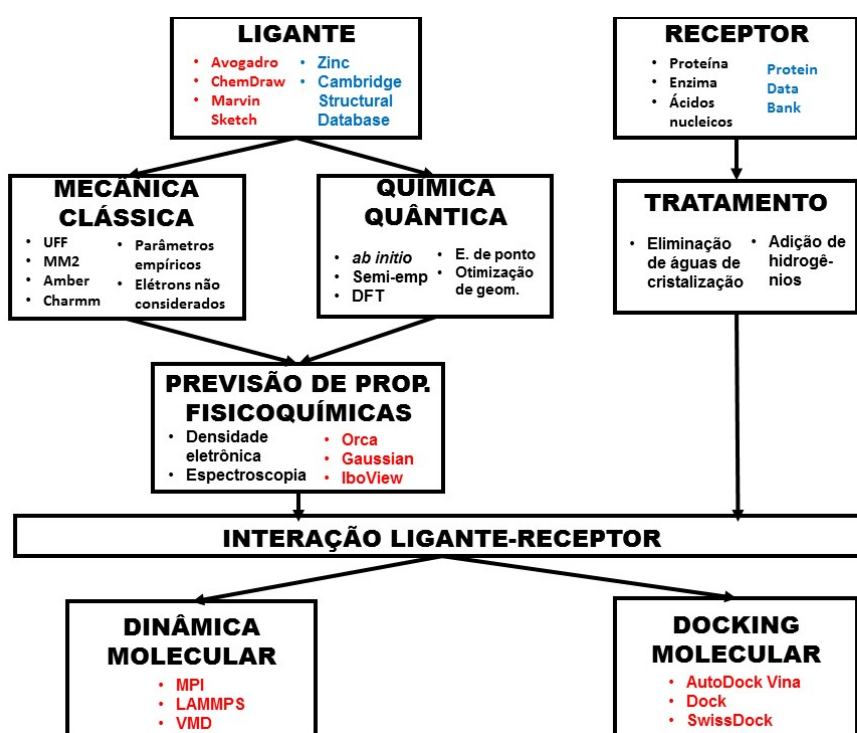


Figura 6. Fluxograma de técnicas computacionais para a previsão de propriedades físico-químicas em interações ligante-receptor. Softwares em vermelho e banco de dados em azul.

Aproximadamente até a década de 1980 os novos medicamentos eram descobertos através de testes de tipo *caixa-preta* em células ou modelos animais, metodologia tradicional chamada de triagem cega [89]. Milhões de compostos foram testados assim, em processos de 15 anos como média.

Metodologias de *docking* receptor-ligante são amplamente utilizadas dentro do desenho racional de fármacos baseado em estrutura (DRBE), chamadas de triagem virtual. A primeira etapa consiste na escolha adequada do alvo terapêutico associado com uma doença (Figura 7), em seguida precisa-se obter a estrutura molecular tridimensional do alvo ou biorreceptor, que pode ser obtida de bancos de estruturas moleculares como PDB, ou se não existe ainda somente pode ser obtida através de técnicas experimentais como difração de raios-X em cristais. A seguinte etapa é a triagem *in silico* ou com métodos computacionais; nesta etapa é efetuado o *docking* podendo se testar milhões de moléculas contra o alvo molecular até encontrar um composto promissor. Testes *in vitro* e *in vivo* são realizados para validar a otimização dos compostos protótipos [90].

Como exemplo, o composto Relenza® foi proposto como um potencial inibidor da replicação do vírus Influenza, mediante uma seleção *in silico* no ano de 1993 [91]. Num tempo curto de seis anos foi comercializado (Figura 7), demonstrando o poder preditivo da triagem *in silico*.

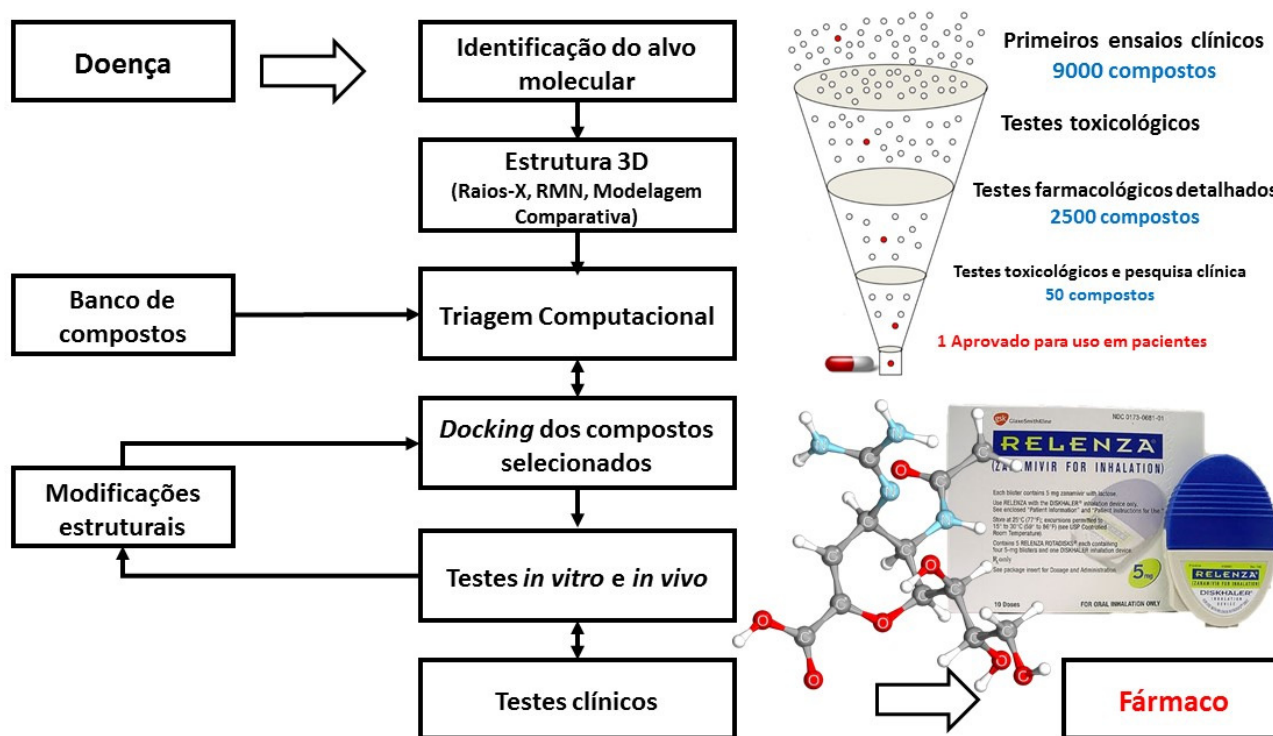


Figura 7. Etapas do Desenho Racional de Fármacos Baseado em Estrutura. Um deles é Relenza, remédio para Influenza [91].

2. Objetivos

2.1 Hipótese

A hipótese de trabalho se apóia em dois pontos cruciais: as características químicas comuns do Al^{3+} e Ga^{3+} com o Fe^{3+} em meio aquoso, e o uso promíscuo de sideróforos por bactérias e fungos para a obtenção de Fe^{3+} . Então, sugere-se que o carregado do sideróforo desferrioxamina e do conjugado desferrioxamina-cafeína com alumínio e gálio pode ser aceitado e absorvido por microrganismos como se fosse $\text{Fe}(\text{dfo})$ e ter um efeito tóxico.

2.2 Objetivo geral

Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de MeL (1:1), $\text{Me} = \text{Al}^{3+}$, Ga^{3+} e $\text{L} = \text{dfo}$, dfcaf) para o estudo do efeito biológico em bactérias e fungos.

2.3 Objetivos específicos

Sintetizar e caracterizar: $\text{Al}(\text{dfo})$, $\text{Ga}(\text{dfo})$, dfcaf , $\text{Al}(\text{dfcaf})$, $\text{Ga}(\text{dfcaf})$,

Investigar a estabilidade por equilíbrios competitivos com sondas fluorescentes

Investigar a atividade antioxidante

Estudar a atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Métodos

Tabela 2. Reagentes e solventes

Procedência	Reagente	Grau
Apotex (Canada)	Deferiprona (L1)	99%
Biotium	Cloreto de dihidrorodamina (DHR)	Analítico
Cristália (Brasil)	Mesilato de desferrioxamina	≥ 99%
Cromoline Química Fina	Cafeína anidra	Analítico
Fluka (USA)	Cloreto de alumínio	≥ 99%
Merck	Sabourand Dextrose Agar (SDA) Difco®	-
	Sabourand Dextrose Broth (SDB) Difco®	-
	Triptic Soy Agar (TSA) Difco®	-
	Triptic Soy Broth (TSB) Difco®	-
	Água deionizada (equipamento Millipore)	Ultra-pura
Sigma Aldrich	Ácido clorídrico	Analítico
	Ácido L-(+) ascórbico	99%
	Ácido teofilina-7-acético (T7A)	≥ 99,0%
	Calceína	Analítico
	Chelex®	-
	Cloreto de crômio (III)	Espectrométrico
	Diclorometano	Analítico
	Dimetilformamida (DMF)	Analítico
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Espectrométrico
	Dimetilsulfóxido deuterado (d_6)	≥ 99,0%
	Etanol	Analítico
	Fluoresceína de sódio	Analítico
	Hepes	≥ 99,5%
	Hidróxido de sódio	Analítico
	8-Hidroxiquinolina	99%
	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	≥ 98,0%
	N-hidroxibenzotriazol (HOBT)	≥ 99,0%
	Nitrato do gálio	≥ 99,0%
	Nitrato do Índio	≥ 99,0%
	Nitilotriacetato de sódio (NTA)	≥ 99,0%
	Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (FAS)	98%
	Tetrabutilamonio tetrafluoroborato	Espectrométrico
Synth	Cloreto de sódio	Analítico
	Clorofórmio	Analítico
	Metanol	Analítico
Vetec Química Fina	Éter dietílico	Espectroscópico

3.2. Síntese do ligante dfcaf

A síntese do ligante dfcaf foi feita em concordância com os protocolos já descritos pelo grupo [92], mediante o acoplamento em refluxo e atmosfera inerte de $N_{2(g)}$, EDC, HOBt, dfo e T7A (Tabela 2). Em um balão de três bocas adicionaram-se 10 mL DMF contendo 0,288 g de EDC (1,5 mmol), 0,203 g de HOBt (1,5 mmol), 0,657g de desferrioxamina (1 mmol) e 0,238 g de T7A (1 mmol), por 5 h a 75°C, seguida de evaporação do solvente até formação de sólido de cor bege que logo se secou a vácuo. Lavou-se cinco vezes com éter dietílico, centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min a 25°C, e secou-se a vácuo. Repetiu-se a lavagem com água e metanol nas mesmas condições. Finalmente registrou-se a temperatura de fusão (Figura 8).

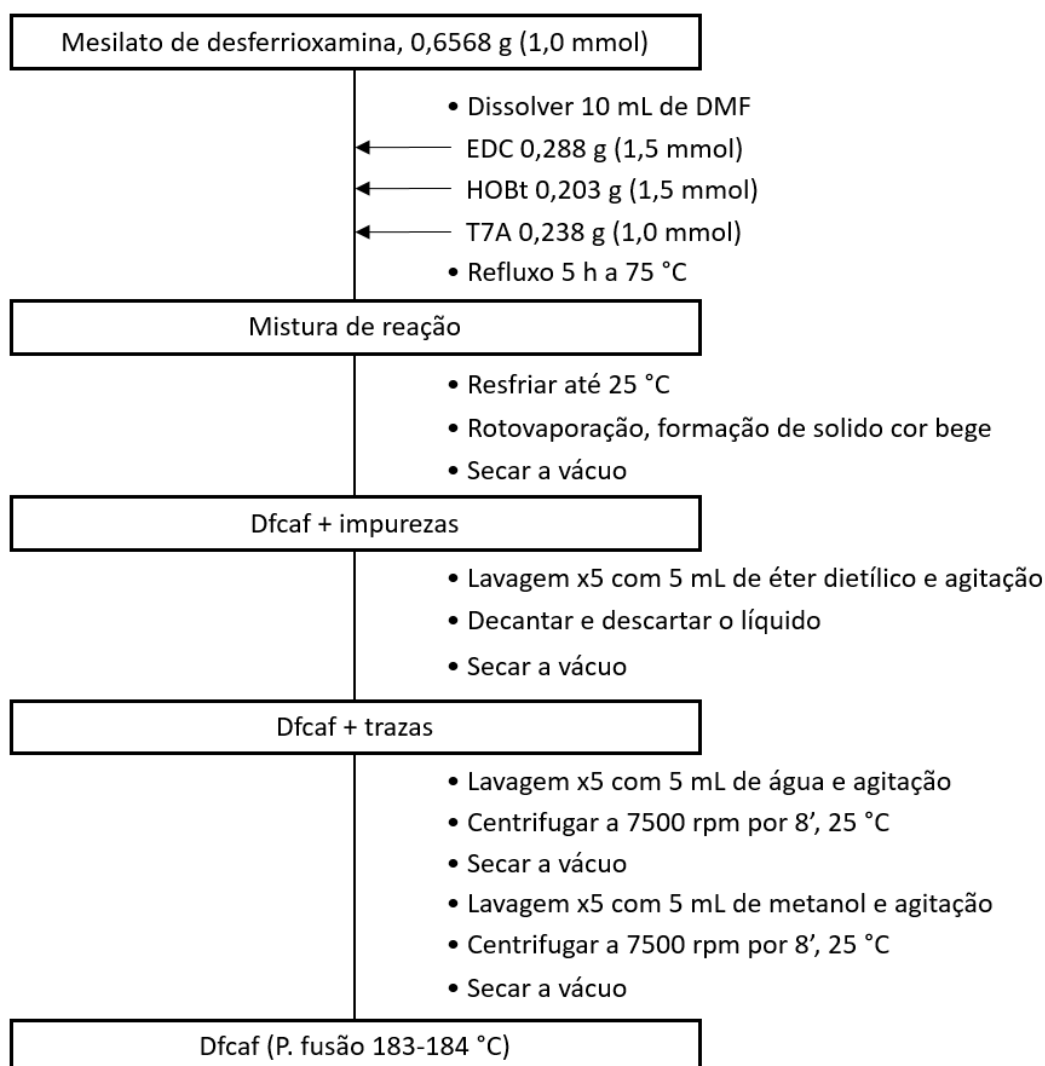


Figura 8. Fluxograma para a síntese do dfcaf.

3.3. Caracterização do dfcaf

3.3.1. Solubilidade do dfcaf

Determinaram-se as solubilidades em água, éter dietílico, metanol, clorofórmio, diclorometano e dimetilsulfóxido. A síntese dos complexos de dfcaf são dependentes da solubilidade do ligante.

3.3.2. Análise elementar

A composição elementar do ligante dfcaf foi determinada no equipamento Perkin Elmer Elemental Analyzer CHN 2400 do IQ-USP.

3.3.3. Temperatura de fusão

Determinaram-se as temperaturas de fusão do dfo e dfcaf no equipamento fornecido pelo Laboratório de Síntese de compostos orgânicos a cargo do professor Claudio Di Vitta do Instituto de Química da USP.

3.3.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)

Os espectros eletrônicos na região UV do dfo e dfcaf foram registrados no leitor de microplacas SpectraMax M4 em placa de quartzo de 96 poços do Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos do IQ-USP.

3.3.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Registraram-se os espectros IV do dfo e dfcaf em estado sólido no intervalo 4000 a 400 cm^{-1} ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) no equipamento Alpha Bruker FTIR, do Laboratório de Espectroscopia Molecular, a cargo do professor Rômulo Augusto Ando do IQ USP, a fim de determinar os grupos funcionais presentes.

3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Registraram-se os espectros de ^1H -RMN do DFO e DFCAF no equipamento Varian 300 MHz (7,05 T) da Central Analítica. Os ligantes foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado e os metais em água deuterada para obter uma proporção 1:1 de metal e ligante a 25°C.

3.4. Síntese e caracterização dos complexos *Al(dfo)*, *Ga(dfo)*, *Al(dfcaf)*, *Ga(dfcaf)*

3.4.1. Síntese de *Al(dfo)* e *Ga(dfo)*

$\text{AlCl}_{3(s)}$ anidro foi secado até massa constante, e preparou-se uma solução padrão em tampão HBS (Hepes (20 mM), NaCl (150 mM), lavado com Chelex[®]-100 (sódica) a 1 g/100 mL, pH 7,4). Adicionou-se, a temperatura ambiente uma solução de desferrioxamina no mesmo tampão, para atingir uma proporção molar metal:ligante 1:1, seguido de agitação vigorosa e um tempo referencial de dez minutos antes de se usar. Um procedimento análogo foi feito com o $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ para a síntese de *Ga(dfo)* (Figura 9).

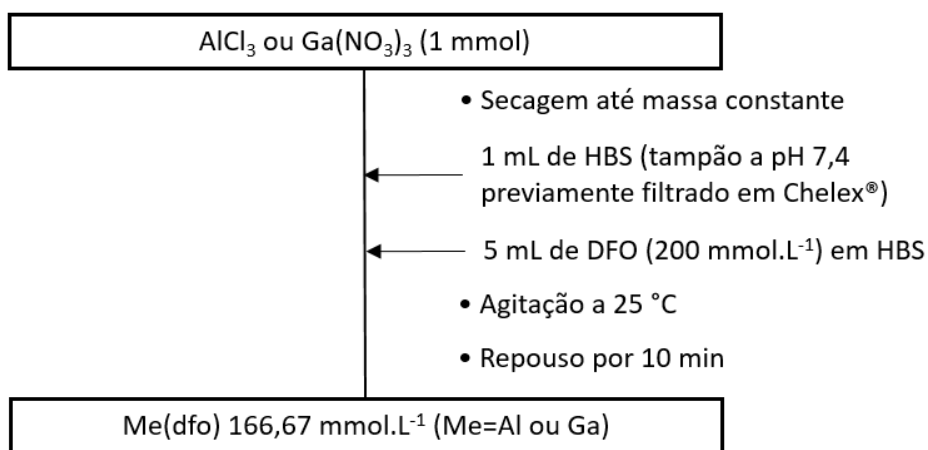


Figura 9. Fluxograma para a síntese dos complexos Al(dfo) e Ga(dfo).

3.4.2. Síntese de Al(dfcaf) e Ga(dfcaf)

O dfcaf sintetizado foi unicamente possível de dissolver em dimetilsulfóxido. 0,02 mmol do ligante foram sonicados nesse solvente a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se uma alíquota de 10 µL de cloreto de alumínio 2 mol.L⁻¹ (em tampão HBS), para atingir uma proporção molar metal:ligante 1:1, seguido de agitação vigorosa a um tempo referencial de dez minutos antes de se usar. Um procedimento análogo foi feito com o sal de gálio para a síntese de Ga(dfcaf) como se indica na Figura 10.

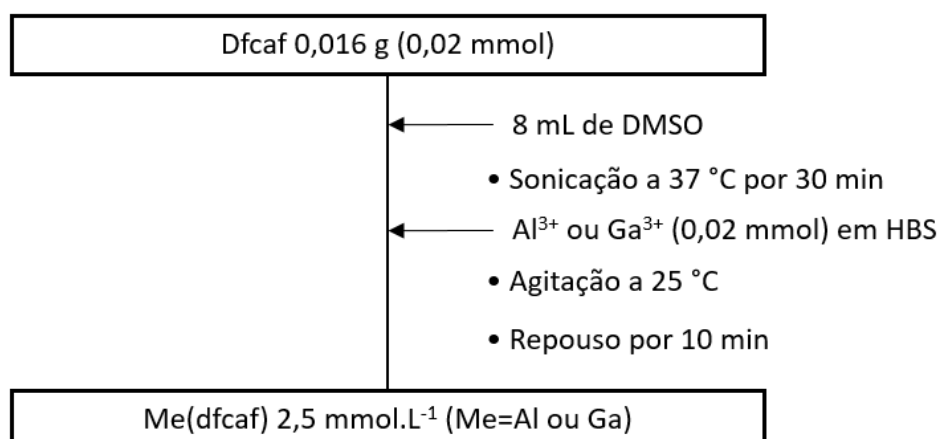


Figura 10. Fluxograma para a síntese do Al(dfcaf) e Ga(dfcaf).

3.4.3. Análise quantitativa de Alumínio e Gálio

Soluções padrão de alumínio e gálio foram analisadas por Espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES) na Central Analítica do IQ-USP.

3.4.4. Espectrometria de massas (EM)

Os compostos Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf), Ga(dfcaf) foram analisados por injeção direta no equipamento Amazon Speed ETD Bruker Daltonics, Ion Trap de Baixa Resolução na Central Analítica do IQ-USP, com nebulizador de 12 psi, fluxo de gás 5 L/min e voltagem do capilar de entrada 4500 V a 300°C.

3.4.5. Voltametria Cíclica (VC)

Registraram-se os voltamogramas cíclicos dos complexos do Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf), Ga(dfcaf) no potenciostato AutoLab do Laboratório de Bioelectroanalítica a cargo da professora Silvia Pires Serrano do IQUSP. Numa cela de três entradas montou-se o sistema eletroquímico: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (lixado com alumina e água em cada medição), eletrodo de referência de Ag/AgCl saturado em KCl e fio de platina como eletrodo auxiliar. Os dados foram processados com o software GPES 4.9. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q® de 18,0 MΩ cm e previamente a cada medição a solução é borbulhada com N_{2(g)}. Para Me(dfo) (com Me=Al ou Ga), se trabalhou com dfo 100 μM (concentração fixa) em pH 7 na presença de íon metálico de concentração suficiente para atingir as proporções metal:ligante de 0,5, 1 e 2. NaCl 100 mmol.L⁻¹ foi o eletrólito suporte. As condições de trabalho foram: velocidade de varredura, 100 mV/s, 25°C no intervalo -1,0 até 1,4 V. Para Me(dfcaf) (com Me=Al ou Ga) as condições foram as mesmas, trocando-se apenas o eletrólito suporte por tetrafluoroborato de tetrabutilamônio 100 mmol.L⁻¹.

3.4.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Registraram-se os espectros de Ressonância magnética nuclear do Al(dfo), Al(dfcaf) no equipamento Varian 300 MHz da Central Analítica. As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado na temperatura 298 K.

3.4.7. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)

Os espectros eletrônicos na região do UV dos complexos Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf), Ga(dfcaf) em solução foram registrados no leitor de microplacas SpectraMax M4, usando uma microplaca de quartzo de 96 poços para as leituras em diferentes concentrações de forma simultânea. O equipamento pertence ao Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos do IQ-USP.

3.5. Equilíbrios competitivos com sondas fluorescentes

3.5.1. Complexos versus calceína-ferro (CAFe)

Numa microplaca transparente de 96 poços adicionaram-se 190 μL de CAFe 2 μM em tampão HBS, e 10 μL dos complexos Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf) e Ga(dfcaf) em concentrações variáveis, 0 até 2 μM . As microplacas foram incubadas por dez minutos e as leituras foram feitas em triplicata com $\lambda(\text{exc/em}) = 485/520$, ganho 500 e 37°C, no equipamento BMG Fluostar Optima do Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos do IQ-USP.

3.5.2. Complexos versus 8-HQ

Uma alíquota de 10 μL dos complexos estudados foram adicionados em diferentes concentrações numa microplaca de 96 poços contendo 190 μL da sonda 750 μM em HBS. A microplaca foi

encubada por dez minutos e as leituras foram feitas em triplicata registrando-se a fluorescência a $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 320/520$ nm, ganho 1000 a 37°C, no leitor de microplacas SpectraMax M4, do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos do IQ-USP.

3.5.3. Testes com FLDFO

Numa microplaca de 96 poços foram adicionados 180 μ L de FLDFO 2 μ M em HBS e a fluorescência foi registrada a $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 485/520$ nm; ganho 1260 e 37°C por triplicata, no equipamento BMG FluoStar do Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos do IQ-USP. Num tempo seletivo (estabilidade da sonda em aproximadamente 15 minutos) adicionaram-se os compostos em estudo: Al^{3+} , Ga^{3+} , Fe^{3+} , $Al(dfo)$, $Ga(dfo)$ e água, para a avaliação da estabilidade mediante equilíbrios competitivos.

3.6. Atividade antioxidante dos complexos

O complexo padrão pró-oxidante $Fe(NTA)$ foi preparado com uma solução aquosa de FAS e ligante NTA (10 mmol.L^{-1}) em proporção molar 1:1 de ferro:ligante. Numa microplaca de 96 poços com 180 μ L de solução fluorogênica (ácido ascórbico 40 μ M e DHR 50 μ M em HBS) foram adicionados 10 μ L de solução $Fe(NTA)$ 200 μ M e 10 μ L dos compostos em avaliação: Al^{3+} , Ga^{3+} , dfo , $dfcaf$, $Al(dfo)$, $Ga(dfo)$, $Al(dfcaf)$ e $Ga(dfcaf)$. As curvas cinéticas de fluorescência foram registradas por triplicata em intervalos de 2 minutos por 1 hora a 37°C em $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 485/520$ nm no equipamento BMG FluoStar, e as velocidades de oxidação foram determinadas a partir das inclinações dessas curvas depois de 15 minutos.

3.7. Testes biológicos

Os testes biológicos consistiram na determinação da concentração inibitória para 50% da população (IC_{50}) provocada por: Al^{3+} , Ga^{3+} , dfo, dfcaf, Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf) e Ga(dfcaf). A técnica foi baseada nos métodos do Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos (NCCLS) [74] e foi aplicada em *E. coli* (ATCC 9739), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. aureus* (ATCC 6538) e *C. albicans* (ATCC 10231). Toda vidraria e soluções foram esterilizadas previamente em autoclave, baseado no procedimento padrão de trabalho no Laboratório de controle microbiológico a cargo da Profa. Dra. Telma Kaneko (FCF-USP).

3.7.1. Transferência de cultivos e incubação

Em tubos com tampa metálica de aproximadamente 20 mL, foram adicionados 10 mL de meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) Difco® (40 g/L) para bactérias, e Sabourand Dextrose Agar (SDA) Difco® (65 g/L) para fungos. Os tubos se deixaram inclinados até se solidificar.

Todos os microrganismos encontram-se armazenados em geladeira independente dos materiais e soluções esterilizadas. A semeadura de micróbios seguiu-se como mostrado na Figura 11, e a incubação de bactérias foi por 24 horas e 37°C e no caso do tubo com fungo 72 horas e 25°C, para permitir o ótimo crescimento microbiano.

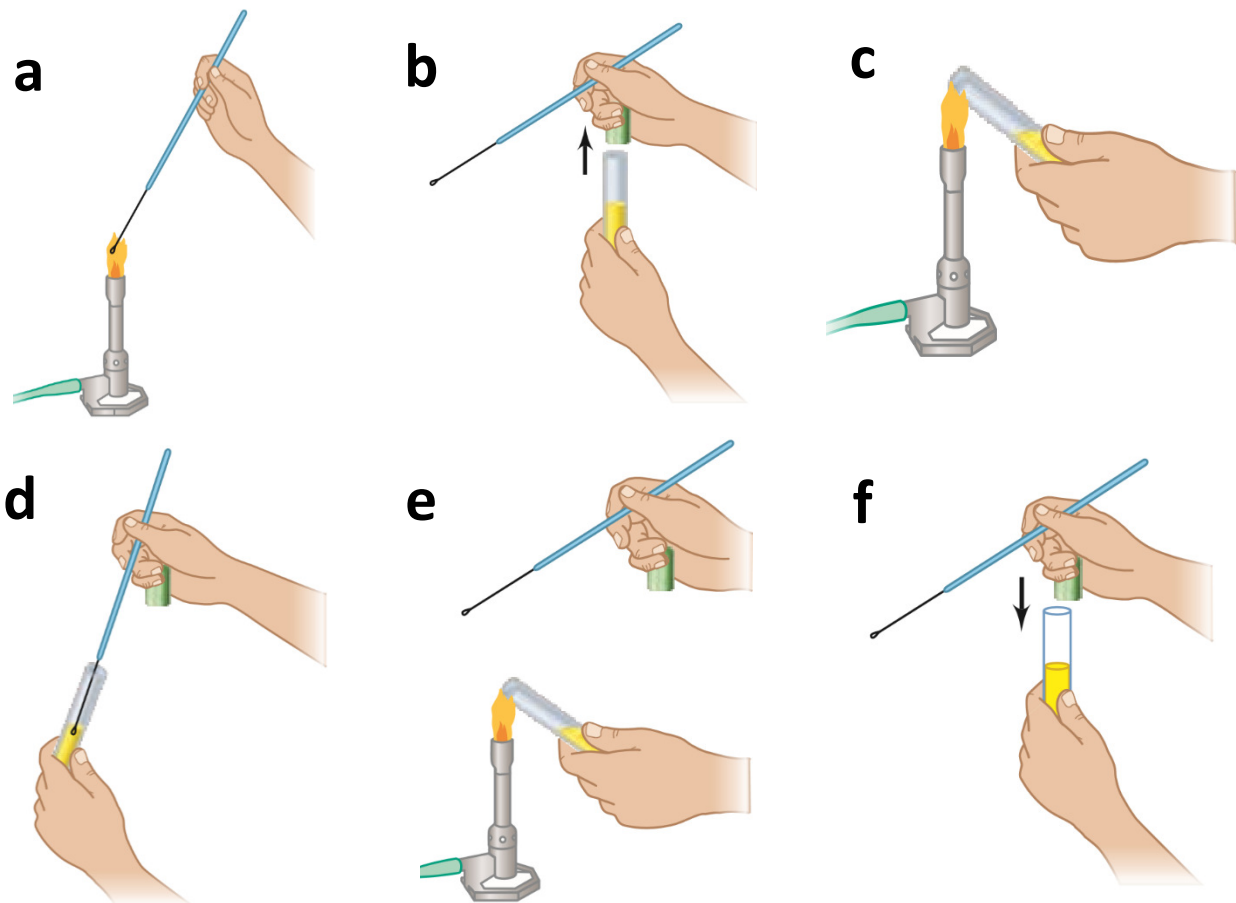


Figura 11. Procedimento para a transferência asséptica de cultivos de micróbios: (a) aquecer a alça até alcançar o vermelho vivo para esterilizá-la, (b) retirar a tampa do tubo, (c) flamear a entrada do tubo, (d) coletar o microrganismo só com a parte esterilizada da alça e sem penetrar no ágar, fazendo um caminho de ziguezague, (e) flamear novamente a entrada do tubo, (f) tampar e logo da sementeira num novo tubo, esterilizar a alça novamente [93].

3.7.2. Preparação de diluições microbianas em solução salina.

Trabalhando na câmara de fluxo, adicionam-se 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% m/V) no tubo inoculado. A suspensão microbiana recuperou-se em um novo tubo rotulado “solução mãe”. Colocou-se num suporte 9 tubos de ensaio com 9 mL de solução salina. Adicionou-se 1 mL da suspensão microbiana no primeiro tubo, agitou-se e rotulou-se com “-1”, correspondente à diluição por 10 ou fator 10^{-1} em relação à solução mãe. 1 mL da solução “-1” é transferido para o tubo “-2” para obter a solução com fator 10^{-2} e assim sucessivamente até preparar a solução “-9”. Imediatamente depois deste procedimento são utilizadas alíquotas de 1 mL dos tubos “-6”, “-7” e

“-8” e foram adicionadas em placas (Figura 12). Aproximadamente 9 mL de meio de cultura TSA para bactérias ou SDA para fungos foram adicionadas em cada placa, a operação foi feita por duplicata. A incubação foi feita por 24 horas e 37°C para bactérias e 72 horas e 25°C para fungo.

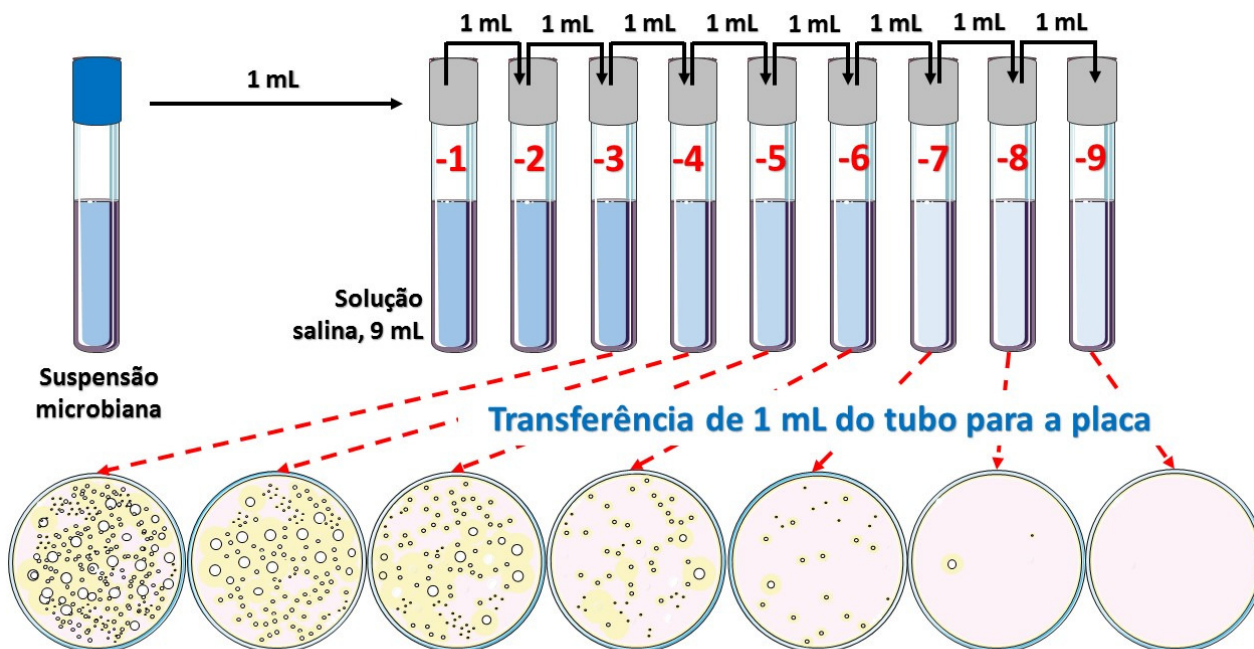


Figura 12. Preparação de diluições microbianas para a obtenção das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) [94].

3.7.3. Contagem de micróbios

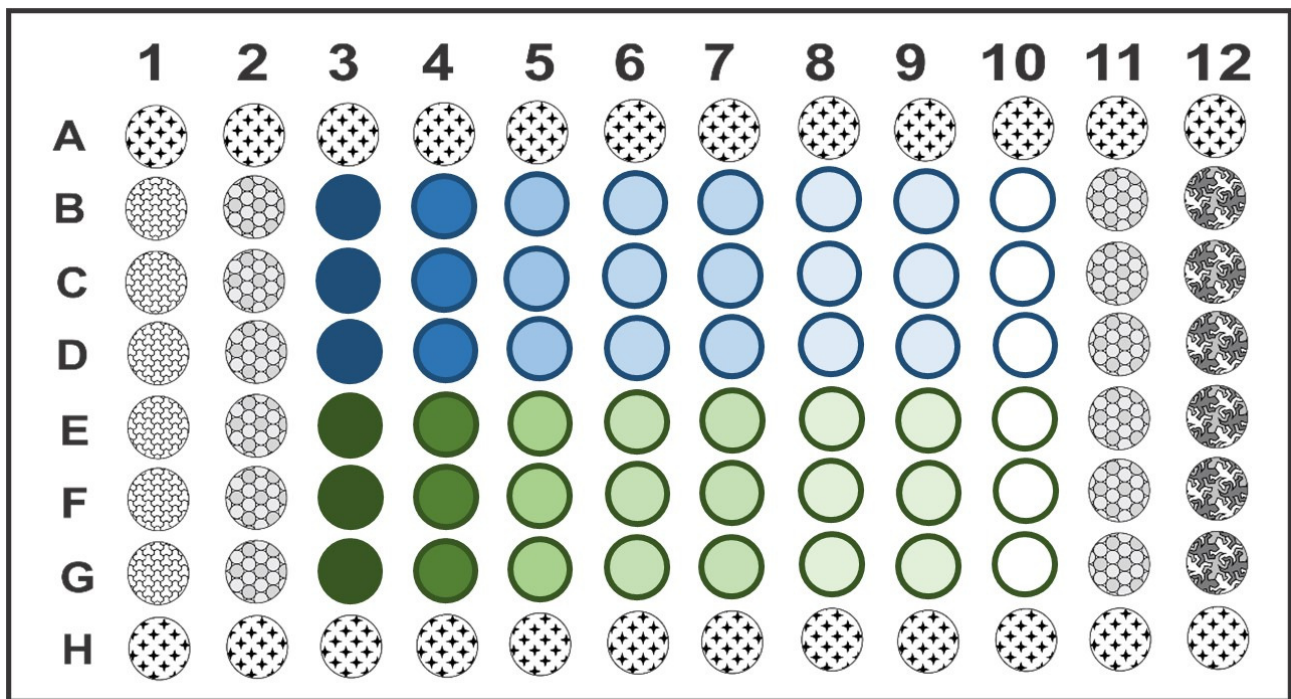
A contagem foi feita usando um contador de micróbios mecânico Phoenix que corresponde diretamente ao número de colônias. Como fez-se por duplicata, a média dos valores multiplicado pelo fator de diluição corresponde às Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL da solução original. Concentrações finais de $10^5 - 10^6$ UFC/mL foram utilizadas para bactérias e 10^4 UFC/mL para fungos.

3.7.4. Preparação da microplaca

Numa microplaca transparente de 96 poços adicionaram-se 190 µL de Tryptic Soy Broth (TSB) para as bactérias ou de Sabourad Dextrose Broth (SDB) para os fungos, na forma estéril ou inoculado na distribuição mostrada na Figura 28. Alíquotas de 10 µL dos compostos em estudo (Al^{3+} , Ga^{3+} , dfo, dfcaf, Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf) e Ga(dfcaf)) em concentrações variadas foram adicionados. Os controles foram cloranfenicol para *E. coli* e *S. aureus*; Amikacin, para *P. aeruginosa* ou Nistatina para *C. albicans*. A microplaca (figura 13) foi coberta com tampa de plástico estéril e incubada por 24 horas e 37°C para bactérias e 72 horas e 25°C para fungo.

3.7.5. Leitura na microplaca

A influência dos compostos no crescimento microbiano foi determinado por absorbância a 630 nm e 25°C utilizando um leitor ELISA (modelo LM-LGC, Biotecnologia LCG, Brasil) do Laboratório de controle microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas a cargo da Profa. Dra. Telma Kaneko.



- Controle de esterilidade do meio: TSB ou SDB
- Controle de sensibilidade ao antibiótico: TSB ou SDB inoculado + Antibiótico
- Controle de crescimento do micróbio: TSB ou SDB inoculado
- Controle de esterilidade da placa de leitura: poço vazio
- Composto 1 em TSB ou SDB inoculado
- Composto 2 em TSB ou SDB inoculado

Figura 13. Distribuição dos compostos para leitura na microplaca. Os poços 3B, 3C e 3D correspondem ao análise por triplicata do composto 1 de concentração final 125,0 μM . De forma análoga os poços 3E, 3F e 3G para um segundo composto com a mesma concentração. Diluições seriadas dos compostos pertencem a concentrações finais de 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9, 1,9 e 0,9 μM , desde a coluna 4 até a 10.

3.7.6. Cálculo do IC₅₀

Tendo como referência a absorbância do controle de crescimento, calculamos a porcentagem de inibição dos micróbios. O gráfico deste parâmetro contra o logaritmo da concentração dos compostos em estudo denomina-se curva dose-resposta [95] que permitiu determinar a concentração inibitória para 50% da população (IC₅₀) através do programa GraphPad Prism versão 5.

3.8. Previsão de propriedades físico-químicas por métodos computacionais

Usaram-se programas de computador para o desenho e otimização de estruturas moleculares (Avogadro versão 1.1.1. com Gaussian versão 3.0), previsão de propriedades físico-químicas (Marvin Sketch 16.2.8.0) e *docking* molecular (AutoDock versão 1.5.6 para cálculo e Chimera versão 1.10.2. para a visualização).

4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese e caracterização do ligante dfcaf

4.1.1. Solubilidade do dfcaf

O solvente dimetilformamida tem um hidrogênio, mas de acordo com suas espécies ressonantes ele não é ácido, por isso é considerado um solvente aprótico. Além disso os átomos de nitrogênio e oxigênio dispersam a densidade de carga negativa da molécula, apresentando um efeito de solvatação principalmente em cátions, por isso a correta denominação do solvente é aprótico dipolar [96].

Ele pode contribuir no estabelecimento de um ambiente polar adequado, favorecendo a solvatação dos reagentes, já que tem um momento dipolar de 3,86 D, muito próximo dos reagentes (3,69 D para dfo e 3,16 D para T7A [97]), fornecendo interações solvente-solvente, soluto-soluto e solvente-soluto de quase a mesma magnitude. Assim também, a dimetilformamida é útil ao final da síntese para a remoção dos reagentes em excesso, considerando que o produto dfcaf torna-se insolúvel no solvente.

A temperatura de ebulição da dimetilformamida é 153°C, o que permite fazer a síntese sem problemas na temperatura aplicada ao sistema. N-hidroxibenzotriazol (HOBt) é comumente usado na síntese de aminas de ácidos carboxílicos [98], por isso foi usado para favorecer a reação do terminal amino da dfo e do carboxilato da T7A. A Figura 14 mostra uma proposta do mecanismo de reação para a formação do produto da síntese.

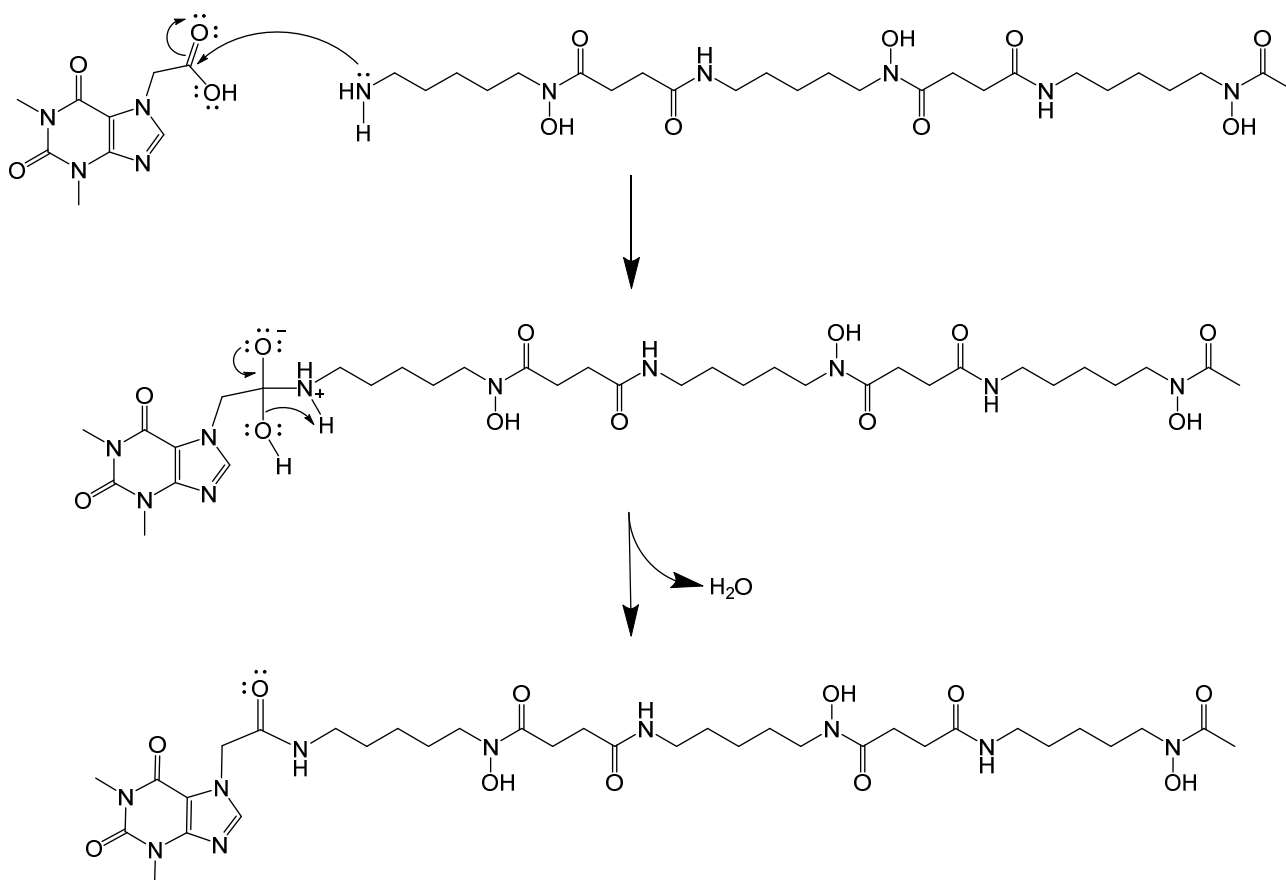


Figura 14. Mecanismo proposto de reação de desferrioxamina e T7A para a síntese de dfcaf.

O produto sólido obtido de cor branco ligeiramente bege, foi secado com ajuda de uma bomba de vácuo e caracterizado em seguida. É importante ressaltar que a cafeína e, em um grau muito maior, a desferrioxamina, são solúveis em água, no entanto o dfcaf não, que somente apresentou solubilidade em dimetilsulfóxido a aproximadamente 2,5 g/L. Essa mudança, além de indicar a formação do novo composto, põe em evidência as forças intermoleculares que irá desenvolver o dfcaf. Como por exemplo o aumento na área superficial do dfo para o dfcaf, de 935,52 para 1198,29 Å² respectivamente (de acordo com o programa Marvin Sketch), que é relevante na interação do tipo Van der Waals.

4.1.2. Análise elementar

A análise elementar (em % de elemento) resultou em 50,3, 7,6 e 15,7 de C, H e N respectivamente, valores próximos aos teóricos: 51,0, 7,7, 17,1 de C, H e N respectivamente.

4.1.3. Temperatura de fusão

A temperatura de fusão registrada para o produto da síntese foi 183-184°C, valor comparável com o já reportado, 183-186°C [92]. A temperatura de fusão tão próxima é um bom indicador da formação do produto já que permite-nos diferenciá-los dos reagentes dfo e T7A (cujas temperaturas de fusão são 111 e 271°C, respectivamente).

4.1.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)

O espectro eletrônico do dfcaf (Figura 15) mostra uma banda em 276 nm que não aparece na desferrioxamina e que corresponde à cafeína [99]. A absorbância associada a este comprimento de onda corresponde a uma transição eletrônica de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ da fração xantina no dfcaf estabilizada pela enorme quantidade de estruturas ressonantes (227 estruturas de acordo com Marvin Sketch). Esta grande variedade de possíveis transições faz que o espectro apresente bandas de absorção e não linhas isoladas como por exemplo no caso da espectroscopia de massas. Se bem que as transições são processos estocásticos, essa indeterminação tem a maior probabilidade de ocorrer em alguns estados energéticos, como $\sigma \rightarrow \sigma^*$ no caso de transições próximas ou menores de 200 nm ou $\pi \rightarrow \pi^*$ em nosso caso. Também se pode inferir que a desferrioxamina não apresenta este tipo de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ já que o seu espectro eletrônico foi idêntico ao dimetilsulfóxido usado como solvente nos três casos.

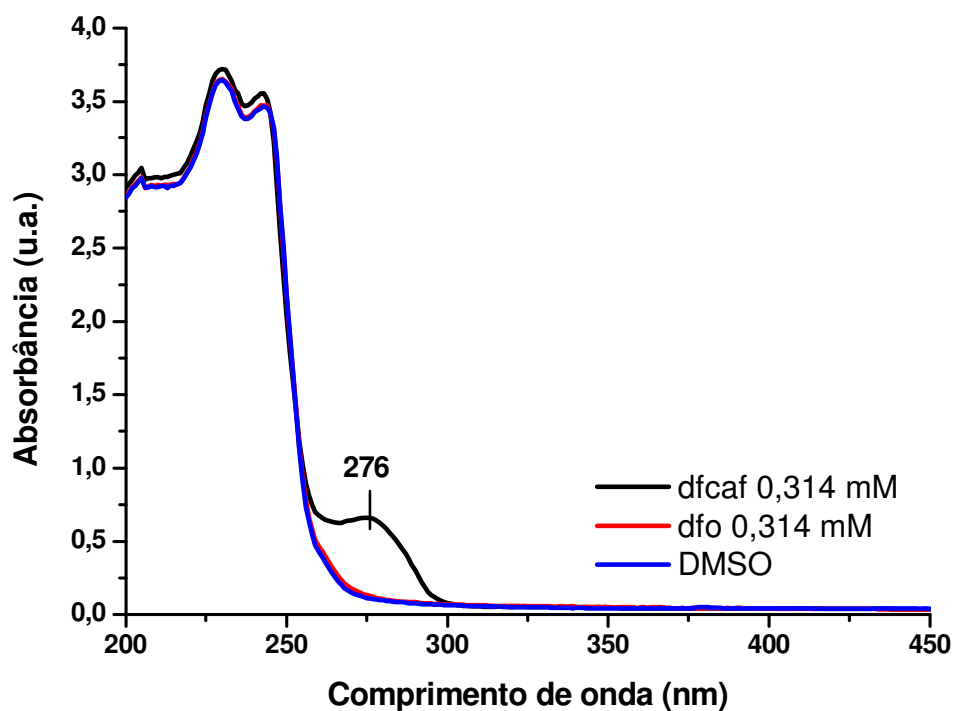


Figura 15. Espectros eletrônicos UV/Vis de Dfo e dfcaf em DMSO.

4.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

O espectro vibracional do dfcaf (Figura 16) apresenta duas frequências importantes para diferenciá-lo da dfo, $1702,8$ e $1665,3\text{ cm}^{-1}$, bandas correspondente à vibração do estiramento do grupo carbonilos da fração T7A acoplada [100]. A T7A apresenta em 688 cm^{-1} deformações típicas do ácido carboxílico [101], que devido à conjugação com dfo são suprimidas [63].

Dfo e dfcaf têm em comum três grupos hidroxâmicos e cadeias com cinco hidrocarbonetos CH_2 , em frequências típicas de $1618,5\text{ cm}^{-1}$ e $2928,0\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Frequências próximas a 3310 cm^{-1} são características de aminas secundarias que posem tanto a dfo como o dfcaf. A tabela 3 permite confirmar a conjugação da desferrioxamina à cafeína.

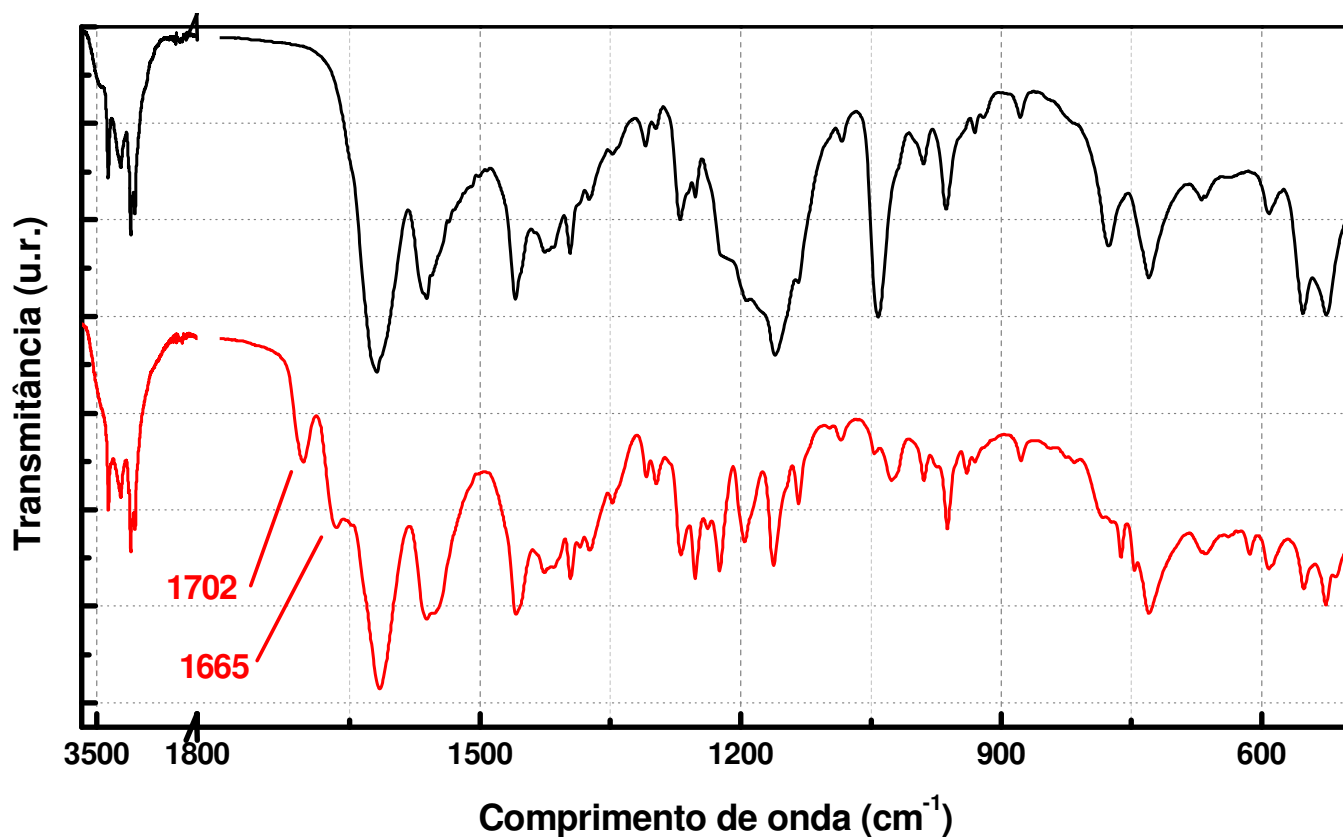


Figura 16. Espectro de infravermelho da desferrioxamina (dfo) e desferrioxamina-caféina (dfcaf).

Tabela 3. Modos vibracionais representativos de dfo e dfcaf (cm^{-1}). ν : estiramento, δ : deformação

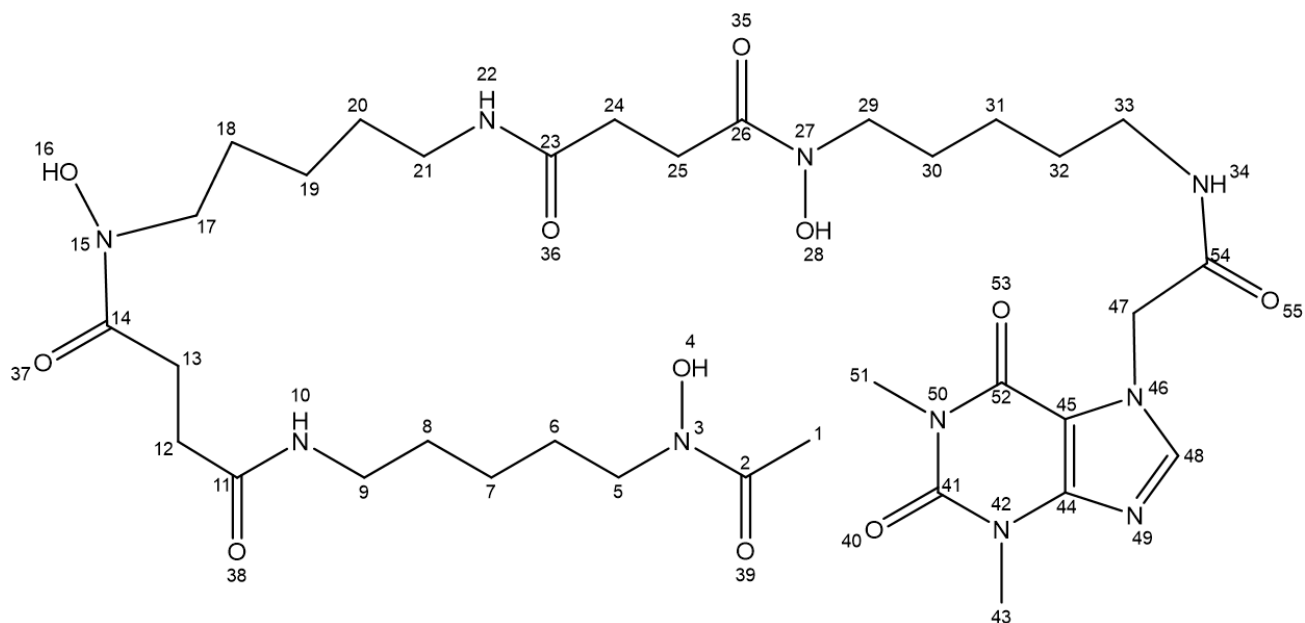
Tipo de vibração	dfo	dfcaf	Referência
$\delta\text{N-H}$ ou $\nu\text{C-N}$	1160	1162	[102]
	1195	1195	
	1347	1347	
	1396	1396	
	1459	1458	
$\nu\text{C=C}$, $\nu\text{C=N}$ ou δNH	1561	1561	[102]
$\nu\text{C=O}$ no anel	-	1665	[100]
	-	1702	
$\nu\text{C=O}$ hidroxâmico	1618	1615	[100]
$\nu_s\text{CH}_2$	2928	2928	[74]
$\nu\text{N-H}$, amina secundaria	3305	3301	[74]

3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Uma análise comparativa dos espectros de ^1H -RMN da dfo e dfcaf (Figura 17) permite encontrar muitas semelhanças de perfil, mas importantes diferenças são achadas devido à influência da cafeína no dfcaf, como no deslocamento observado nos picos em 7,61 e 7,76 ppm da dfo para 7,77 e 8,00 ppm da dfcaf, respectivamente. Na Tabela 4 se apresentam os deslocamentos dos hidrogênios em referência à numeração mostrada. Não se incluem sinais características de água e DMSO em 3,33 e 2,08 ppm, respectivamente.

Três sinais são relevantes para detectar a diferença de dfcaf com dfo: (1) em 8,18 ppm, aparece um novo pico devido ao hidrogênio no átomo 48, altamente desprotegido por ressonância do anel, (2) o sinal do grupo CH_3 no anel hexacíclico em 3,20 ppm e (3) um sinal em 4,95 ppm devido aos hidrogênios do grupo CH_2 que conjuga a cafeína e a dfo.

Tabela 4. Deslocamentos químicos do espectro ^1H -RMN de dfo e dfcaf.



Numeração	Próton	Número de hidrogênios	δ (ppm)		Referência
			dfo	dfcaf	
1		3	1,96	1,96	[103]
4, 16, 28		3	9,67	9,62	[103]
5, 17, 29		6	3,46	3,44	[103]
6, 18, 30		6	1,50	1,49	[103]
7, 19, 31		6	1,20	1,21	[103]
8, 20, 32		6	1,40	1,37	[103]
9, 21, 33		6	2,97	3,00	[103]
10, 22		2	7,61	7,77	[103]
12, 24		4	2,31	2,26	[100]
13, 25		4	2,56	2,57	[100]
34		1	7,76	8,00	[103]
43		3	-	3,20	[100]
47		2	-	4,95	[63]
48		1	-	8,18	[63]
51		3	-	3,44	[63]

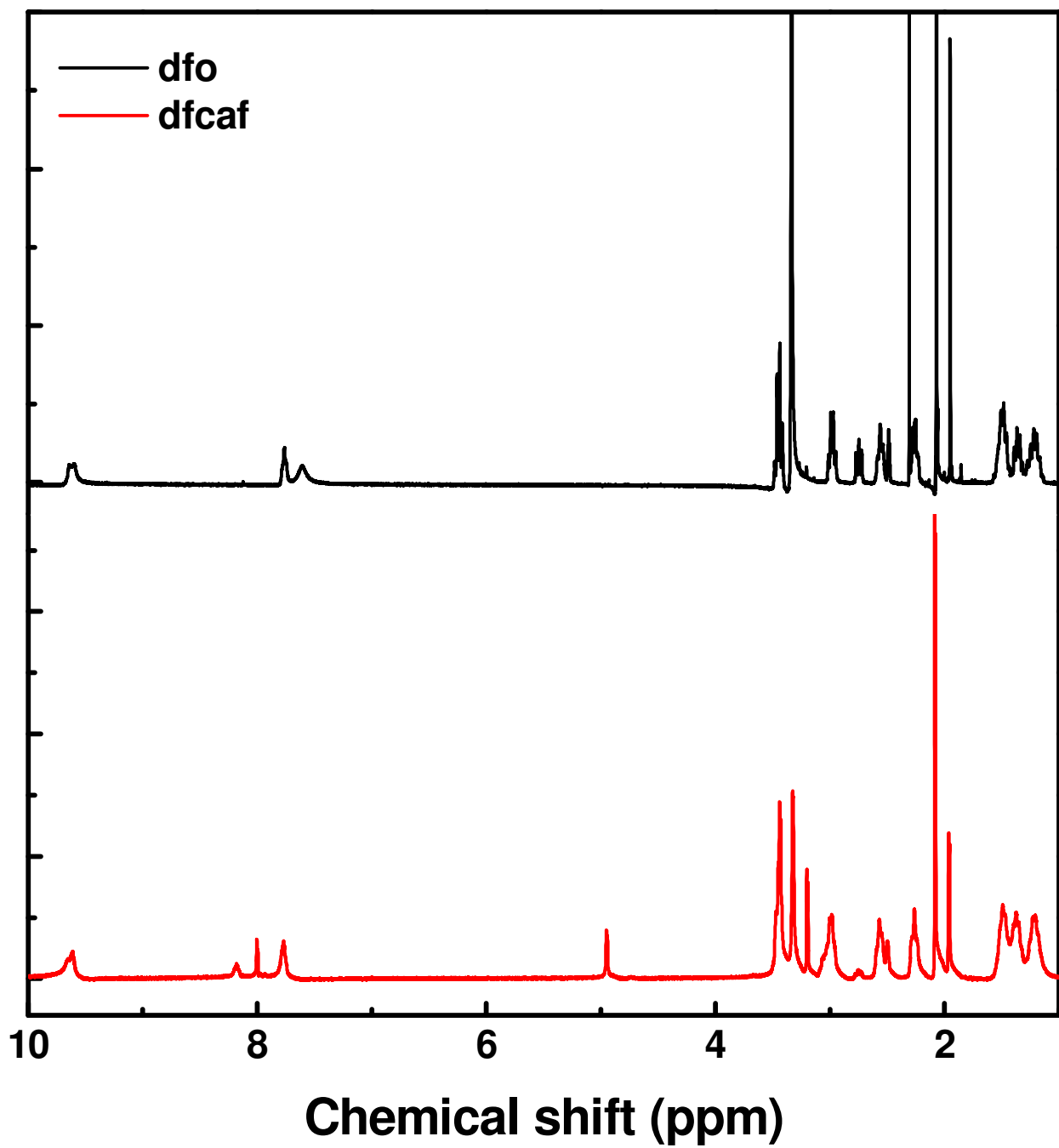


Figura 17. Espectros ¹H-RMN de dfo e dfcaf analisados em DMSO-*d*₆.

4.2. Síntese e caracterização dos complexos Al(dfo), Ga(dfo), Al(dfcaf), Ga(dfcaf)

A parte mais importante do trabalho foi a síntese dos complexos. O planejamento através de mecanismos de reação e a manipulação teórica dos átomos encontrou limites experimentais nas rotas sintéticas. Nas sínteses são considerados fatores como solubilidade dos reagentes, temperatura, atmosfera de reação, fotossensibilidade, ordem de adição dos reagentes na reação, entre muitos outros. Inicialmente, objetivou-se sintetizar os complexos da dfo em forma sólida, mas isso não foi possível devido à elevada solubilidade desse ligante e dos seus complexos, que torna por exemplo possível a dissolução de sais de Fe(III) extremamente insolúveis em matrizes inorgânicas ($Fe^{3+}_{(aq)} < 10^{-18} M$ [104]). Alumínio e o gálio têm em comum com o Fe(III), constantes de estabilidade altas ao se ligar com desferrioxamina ($\log\beta$: 36,11 (Al^{3+}), 38,96 (Ga^{3+}) e 42,33 (Fe^{3+}) [62]) o que pode explicar essa virtual impossibilidade de precipitar os complexos. Outro fator pode ser geométrico, ao se formar a estrutura metal-desferrioxamina são possíveis 16 isômeros, entre estruturais e óticos, muito próximos energeticamente, então a formação de um ou outro complexo é praticamente aleatória, fazendo com que a cristalização seja um processo desafiante [105]. Embora nosso objetivo foi sintetizar esses complexos, não foi necessário obtê-los em forma sólida, assim, a caracterização feita em meio aquoso e os equilíbrios competitivos foram baseados na alta estabilidade deles em pH fisiológico, o que permitiu observar diferenças de efeito biológico em relação aos metais ou aos ligantes individualmente.

4.2.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas permite detectar fragmentos de moléculas carregados eletricamente mediante o bombardeio de elétrons. Os fragmentos iônicos gerados de massa diferente podem ser separados mediante um campo magnético baseando-se no princípio da força de Lorentz. A abundância desses fragmentos versus a relação massa/carga (m/z) são apresentados no espectro de massa. Na análise de Al(dfo), o pico com maior abundância registrado foi 585,4 m/z , esse valor faz referência à massa molecular do complexo (584,7 g/mol). Observações análogas valem para todos os demais complexos.

A Tabela 5 apresenta um resumo dos valores registrados para todos os complexos. Todos os espectros de massa, bem como os mecanismos radicalares propostos para a formação dos picos são apresentados no Anexo 8.1. Esses resultados fornecem uma evidência da formação dos complexos em solução associada com a afinidade oxigênios dos grupos hidroxamatos pelos cátions duros, Al^{3+} e Ga^{3+} .

Tabela 5. Tabela resumo dos picos nos espectros de massa de Al(dfo), Ga(dfo), dfcaf, Al(dfcaf), Ga(dfcaf)

Molécula	Íon	Massa (g/mol)	Carga	Massa experimental (m/z)	Mecanismo
<i>Al(dfo)</i>	$[C_{23}H_{42}AlN_6O_8]^{2+}$	557,6	2+	557,5	$[Al(Hdfo)^+ - C_2H_4]$
	Íon molecular, $[C_{25}H_{45}AlN_6O_8]^+$	584,7	1+	585,4	$[Al(dfo)]$
	$[C_{28}H_{53}AlN_7O_8]^+$	642,8	1+	647,6	$[Al(dfo) + C_3H_8N]$
	$[C_{30}H_{52}AlN_7O_{11}]^+$	713,8	1+	711,5	$[Al(dfo) - C_5H_{12}N + C_{10}H_{19}N_2O_3]$
	$[C_{31}H_{52}AlN_7O_{12}]^+$	741,8	1+	739,5	$[Al(dfo) - C_5H_{12}N + C_{11}H_{19}N_2O_4]$
<i>Ga(dfo)</i>	$[C_{21}H_{37}GaN_5O_8]^{2+}$	557,3	2+	557,5	$[Ga(Hdfo)^+ - C_4H_9N]$
	Íon molecular, $[C_{25}H_{45}GaN_6O_8]^+$	627,4	1+	627,4	$[Ga(dfo)]$
	$[C_{30}H_{57}GaN_7O_8]^+$	713,6	1+	711,5	$[Ga(Hdfo)^+ + C_5H_{12}N]$
	$[C_{29}H_{50}GaN_7O_{11}]^+$	742,5	1+	739,5	$[Ga(dfo) - C_5H_{12}N + C_9H_{17}N_2O_3]$
	$[C_{32}H_{57}GaN_8O_{11}]^+$	799,6	1+	795,4	$[Ga(dfo) - C_5H_{12}N + C_{12}H_{24}N_3O_3]$
<i>dfcaf</i>	$[C_{12}H_{23}N_3O_6]^+$	305,3	1+	304,4	$[dfcaf - C_{23}H_{37}N_7O_6 + CH_3OH]$
	$[C_{17}H_{27}N_6O_6]^+$	411,4	1+	410,5	$[dfcaf - C_{18}H_{33}N_4O_6 + CH_3OH]$
	$[C_{25}H_{38}N_8O_7]^+$	562,6	1+	561,7	$[dfcaf - C_9H_{18}N_2O_4]$
	Íon molecular, $[C_{34}H_{56}N_{10}O_{11}]^+$	780,9	1+	781,7	$[dfcaf]$
	$[C_{36}H_{67}N_8O_{13}]^+$	820,0	1+	819,6	$[dfcaf - C_{21}H_{32}N_7O_6 + C_{23}H_{42}N_5O_8]$
	$[C_{35}H_{53}N_{13}O_{12}]^+$	847,9	1+	847,5	$[C_{18}H_{26}N_7O_6 + C_{17}H_{27}N_6O_6]$
<i>Al(dfcaf)</i>	$[C_{25}H_{45}AlN_6O_6]^+$	584,7	1+	585,6	$[Al(dfcaf) - C_9H_8N_4O_3]$
	Molecular ion, $[C_{34}H_{53}AlN_{10}O_{11}]^+$	804,8	1+	805,7	$[Al(dfcaf)]$
	$[C_{35}H_{61}AlN_8O_{13}]^+$	828,9	1+	827,6	$[Al(dfcaf) - C_{14}H_{20}N_5O_3 + C_{15}H_{28}N_3O_5]$
	$[C_{36}H_{57}AlN_{11}O_{13}]^+$	878,9	1+	879,4	$[Al(dfcaf) + C_2H_4NO_2]$
<i>Ga(dfcaf)</i>	$[C_{17}H_{32}GaN_3O_6]^+$	444,2	1+	443,3	$[Ga(dfcaf) - C_{18}H_{25}N_7O_6 + CH_3OH]$
	$[C_{25}H_{45}GaN_6O_8]^+$	627,4	1+	627,5	$[Ga(dfcaf) - C_9H_8N_4O_3]$
	Molecular ion, $[C_{34}H_{53}GaN_{10}O_{11}]^+$	847,6	1+	847,6	$[Ga(dfcaf)]$
	$[C_{40}H_{65}GaN_{11}O_{13}]^+$	977,8	1+	979,4	$[Ga(dfcaf) + C_6H_{12}NO_2]$

4.2.2. Voltametria cíclica

Nas últimas décadas a eletroquímica experimentou um crescimento enorme com o desenvolvimento da instrumentação eletrônica moderna. O potenciostato, praticamente o responsável disso, é um equipamento capaz de medir eventos que ocorram apenas no eletrodo de trabalho. As técnicas eletroquímicas estão baseadas na análise da resposta gerada pela aplicação de uma perturbação, que pode ser uma função do potencial [106].

Em nosso caso, a voltametria cíclica é uma técnica que consiste em aplicar uma voltagem dependente do tempo entre os eletrodos de trabalho e de referência, e registrar a resposta elétrica (corrente) entre os eletrodos de trabalho e auxiliar. Aquela corrente, em amperes (A), responde às espécies que conseguem chegar à dupla camada do eletrodo de trabalho e produzir transferências eletrônicas num potencial associado. Diversos parâmetros podem se controlar com o potenciostato como a velocidade de varredura e número de ciclos, os potenciais de partida, o intervalo de potencial, entre outros.

Um teste inicial com tampão HBS (Figura 18) permitiu reconhecer que a potenciais maiores a 700 mV uma possível resposta do analito pode ser ocultada pelo enorme sinal do tampão, e em potenciais menores é possível detectar algum sinal independente do sistema branco (solução eletrolítica, eletrodos e tampão). Então para superar esses fatos usou-se Na(OH) para ajuste de pH e NaCl 100 mM como solução eletrolítica para garantir a força iônica necessária para o transporte iônico. O eletrodo de trabalho de carbono vítreo é usado amplamente como eletrodo em eletroquímica pela sua inércia [107].

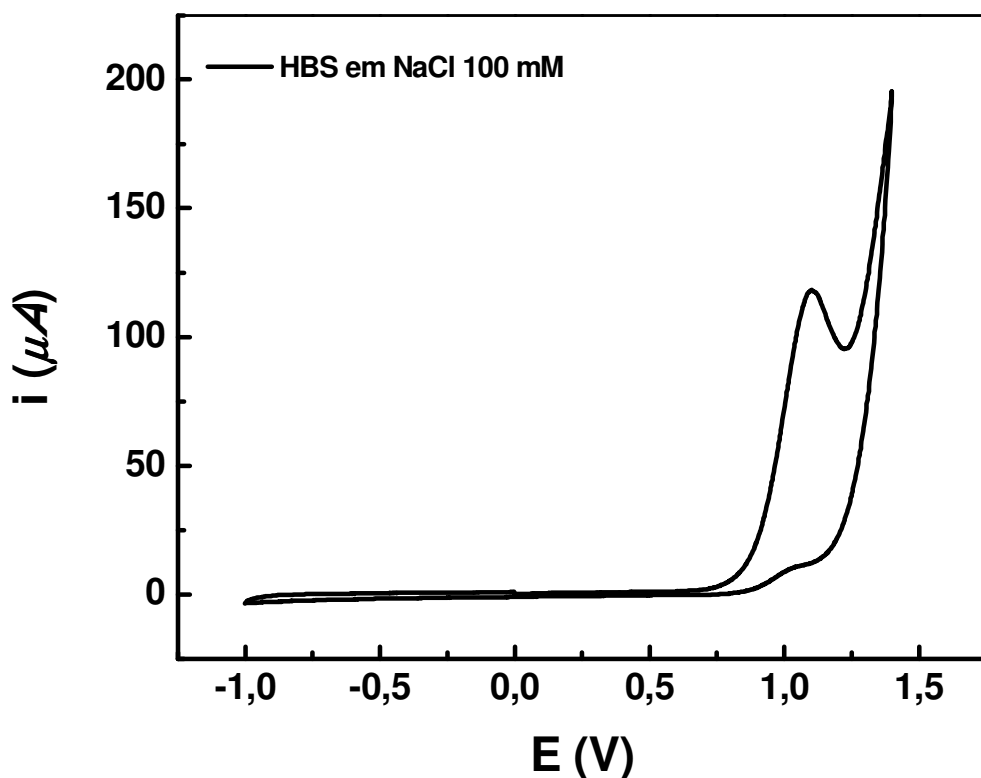


Figura 18. Voltametria cíclica do tampão HBS a pH 7,4, com NaCl 100 mM como suporte eletrolítico. $E_i = +0.0$ V; $E_{\lambda 1} = -1.0$ V; $E_{\lambda 2} = +1.4$ V; $E_{final} = 0.0$ V and $\nu = 100$ mVs⁻¹

O voltograma para desferrioxamina 100 μ M (Figura 19) apresenta um ombro em 281,5 mV que corresponde à oxidação dos grupos hidroxamato da molécula [108]. A superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida e a cela e eletrodos lavados depois de cada voltametria. Para a solução com proporção molar metal-ligante 1:2, é apreciável uma diminuição do pico. Uma proporção metal-ligante 1:1 completa a supressão do pico, o qual parece indicar um bloqueio dos grupos hidroxamatos para se oxidar. Finalmente a solução com proporção molar 2:1 apresenta também uma supressão total do pico de oxidação da desferrioxamina no voltograma, inclusive mostrando um pico de oxidação em 1,184 V, associado ao excesso de alumínio.

A análise dos voltogramas associados com gálio apresenta uma semelhança substancial com o voltograma para alumínio-desferrioxamina, porque também acontece a supressão do ombro em 281,5 mV ao alcançar a equimolaridade. Estruturalmente a desferrioxamina e os complexos Al(dfo) e Ga(dfo) são diferentes: o ligante é uma molécula linear, enquanto que os complexos têm os grupos hidroxamatos direcionados para o íon metálico, assim a supressão do ombro em 281,5 mV é uma evidência direta da complexação.

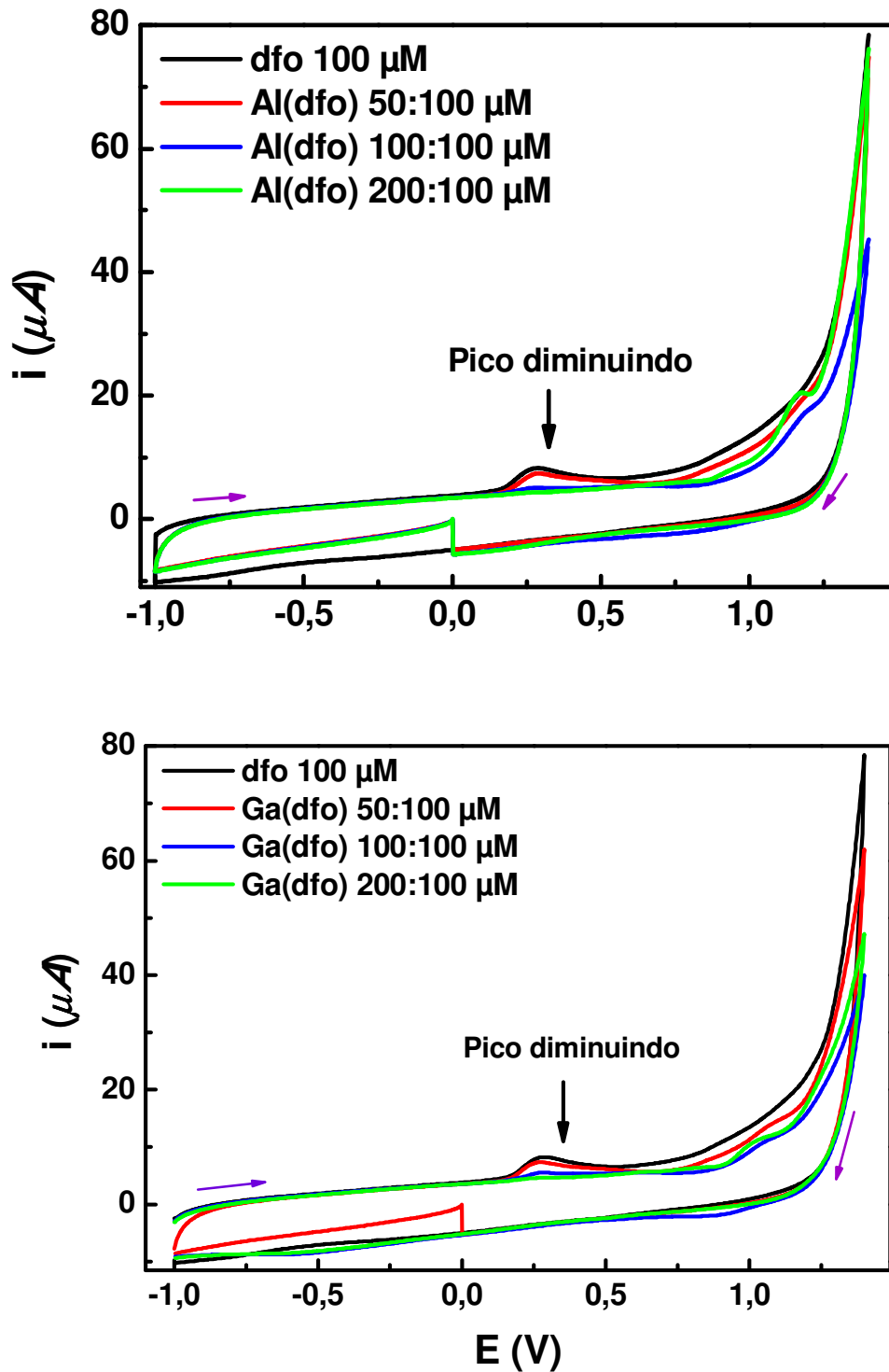


Figura 19. Voltametria cíclica dos complexos Al(dfo) e Ga(dfo) em solução aquosa a pH 7,4, com NaCl 100 mM como suporte eletrolítico. $E_i = +0.0$ V; $E_{\lambda_1} = 0.0$ V; $E_{\lambda_2} = +0.75$ V; $E_{final} = 0.0$ V e $\nu = 100$ mVs^{-1}

Dfcaf precisou de um eletrólito suporte como TTB, mesmo assim a condutividade foi muito baixa o qual se reflexou em correntes de $1,5 \mu\text{A}$ (Figura 20) no pico que para dfo foi próximo de $10 \mu\text{A}$, nas mesmas concentrações. Se bem que esses valores são extremamente baixos, nestas condições são relevantes.

No intervalo de -1 para 1 V , foi possível reconhecer picos bem diferentes dos obtidos com dfo. Em potenciais negativos o dfcaf apresenta dois picos. Segundo a varredura de zero para $-1,0 \text{ V}$ (setas violetas na Figura 20) pode se observar a redução de dfcaf em -634 mV , e no sentido $-1,0$ para $0,0 \text{ V}$ observa-se em -734 mV com uma intensidade de corrente muito menor. Além de se reconhecer que a reação se encontra longe do equilíbrio químico, pela predominância da redução sobre a oxidação, também se obtém a evidência de que a reação está associada com a cafeína, porque os potenciais da desferrioxamina não apresentam picos em potenciais negativos (Figura 20). Vale ressaltar que a cafeína sozinha não apresenta picos em potenciais negativos, o qual é uma característica própria da conjugação com desferrioxamina (Anexo 8.2.1).

Nos voltagramas dos complexos, se reconhece mais uma vez a supressão do ombro de oxidação do dfcaf na equimolaridade com o íon metálico em potenciais positivos. Mas, nas soluções contendo alumínio em igual ou maior concentração que o dfcaf, observa-se a formação de um pico próximo a -500 mV para $\text{Me}(\text{dfcaf})$ 1:1 e -567 mV para 2:1. Esse pico é independente da redução do dfcaf, mas é causada pela complexação com alumínio. Esta resposta pode ser útil no futuro para desenvolver uma análise química para a detecção de alumínio por complexação com dfcaf, já que a intensidade de corrente de pico aumenta com a concentração de alumínio.

Na complexação do dfcaf com gálio é observada mais uma vez a supressão do pico de oxidação ao se incrementar a concentração de gálio até a proporção 1:1 e no excesso. Não se observa o pico próximo a -500 mV como no caso de alumínio.

Essas evidências permitem reconhecer a formação dos complexos $\text{Al}(\text{dfcaf})$ e $\text{Ga}(\text{dfcaf})$ em solução.

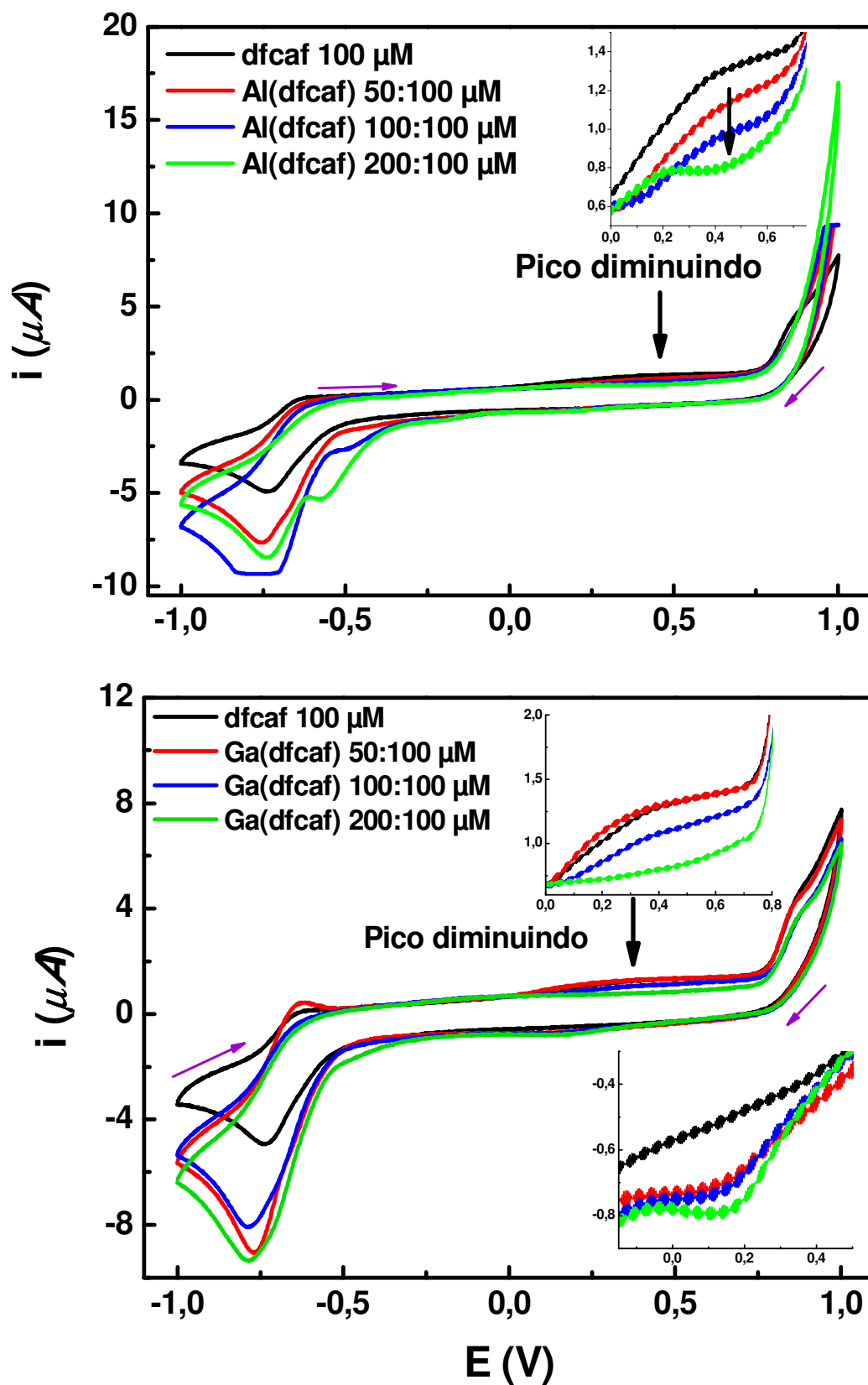


Figura 20. Voltametria cíclica dos complexos Al(dfcdf) e Ga(dfcdf) em solução dimetilsulfóxido com TTB 100 mM como suporte eletrolítico. $E_i = +0.0$ V; $E_{\lambda_1} = 0.0$ V; $E_{\lambda_2} = +0.75$ V; $E_{final} = 0.0$ V e $\nu = 100$ mVs^{-1}

4.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Dfo e Al(dfo) foram testados a 25 °C em água deuterada. O espectro ^1H -RMN da dfo feito em $\text{DMSO-}d_6$ (Figura 18) difere do espectro em D_2O (Figura 21) porque neste último acontecem trocas entre hidrogênio e deutério. Isso pode ser útil para reconhecer hidrogênios dos grupos hidroxamatos, que são trocados imediatamente quando entram em contato com D_2O , assim o espectro da dfo em água não apresenta sinais de deslocamento em 9,67 ppm (Figura 17) [103]. Mais uma vez, um pico em 4,65 ppm para dfo e 4,63 para dfcaf (que não aparece no espectro de dfo em DMSO) mostra a influência do solvente na resposta do analito. Aqueles picos correspondem aos hidrogênios nas posições 10, 22 e 34 (Tabela 4).

Nesse aspecto os espectros ^1H -RMN de Al(dfo) e dfo no mesmo solvente não deveriam apresentar mudanças, mas a influência do alumínio ligeiramente desloca a sinal de todos os hidrogênios tornando-os mais protegidos, devido à sua baixa eletronegatividade (1,61, Tabela 1).

Neste ponto é necessário mencionar o ferro, possui eletronegatividade bem próxima do gálio e alumínio, mas seus orbitais *d* semipreenchidos conferem à ligação Fe-O(dfo) um caráter covalente [105], ao contrário do Al-O(dfo) (Anexo 8.3.1).

A coordenação com grupos hidroxamatos protonados pode distorcer levemente a estrutura do Al(dfo) (Anexo 8.3.2), mesmo assim a distribuição de carga no centro do Al(dfo) é compensada eletrostaticamente (Anexo 8.3.3), o qual justifica os perfis de dfo e Al(dfo), assim como também de dfcaf e Al(dfcaf) (Figura 22).

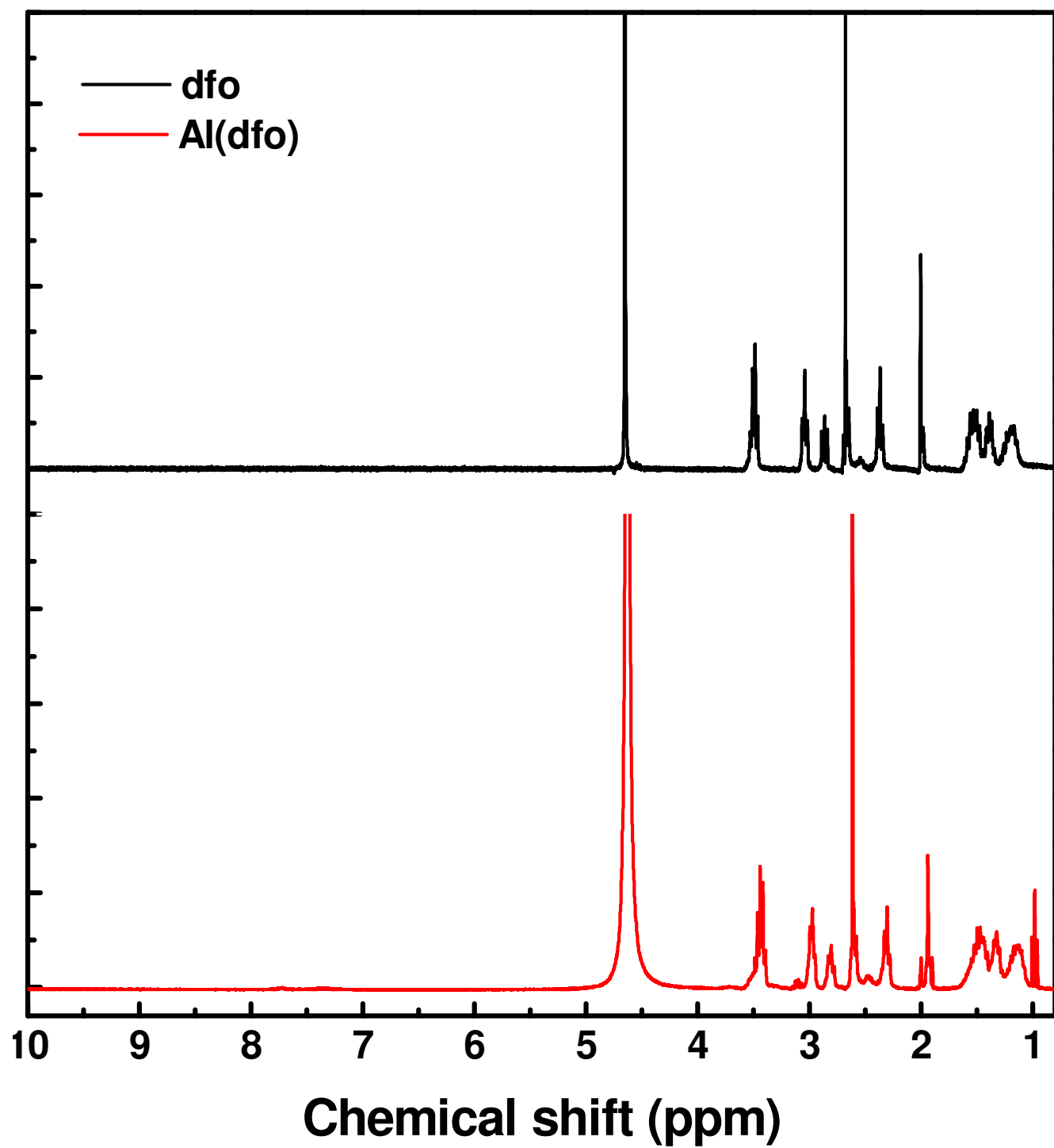


Figura 21. Espectros ^1H -RMN de dfo e Al(dfo) em D_2O .

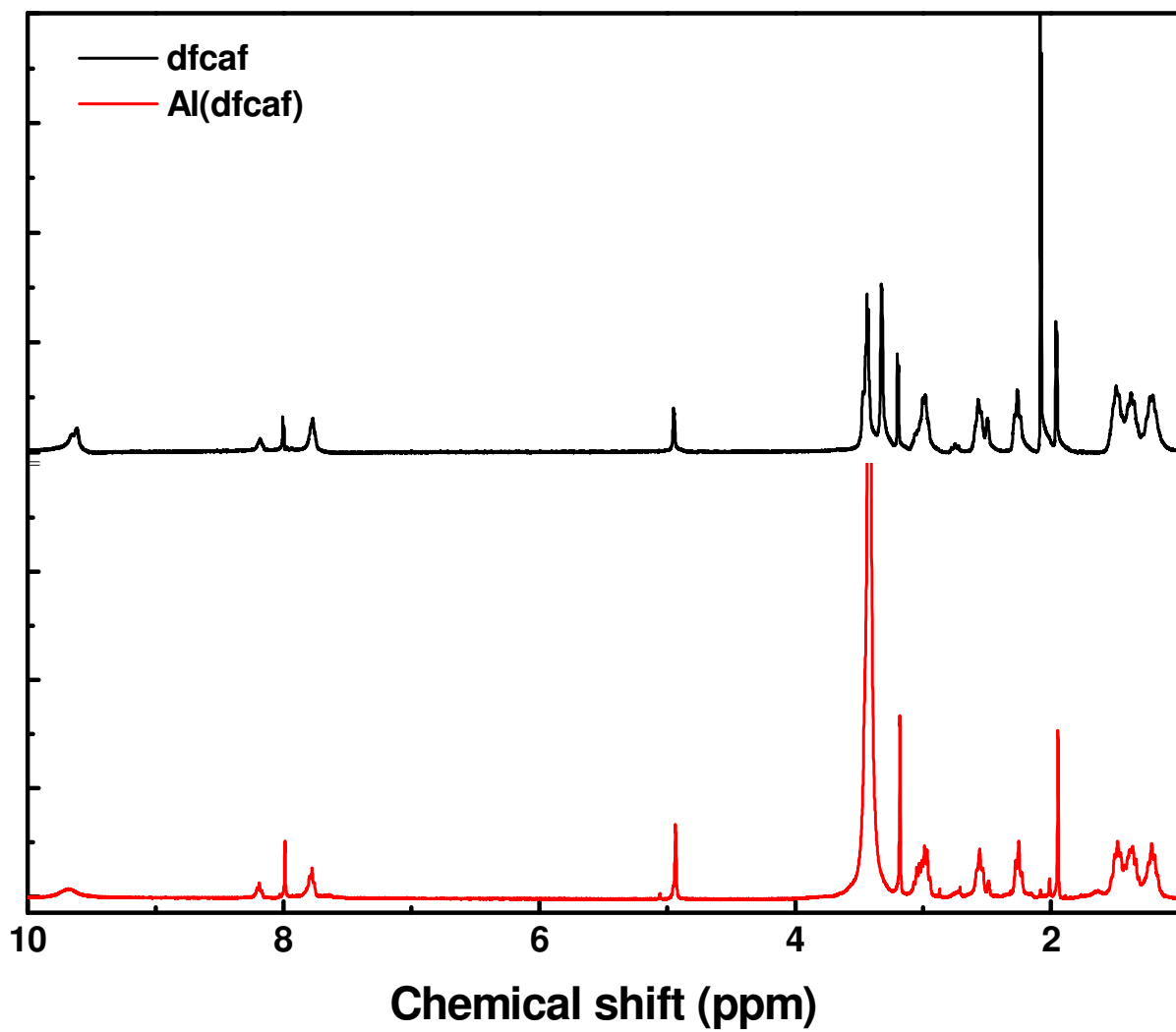


Figura 22. Espectros ^1H -RMN de dfcaf e Al(dfcaf) em $\text{DMSO-}d_6$.

4.2.4. Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV)

O espectro eletrônico da desferrioxamina não apresenta mudanças ao se ligar com alumínio(III) ou gálio(III) (Figura 23).

Considerando que neste intervalo de energia (200 – 450 nm) podem se registrar transições eletrônicas de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$, no nosso caso o espectro invariável pode indicar a predominância iônica da ligação como já foi discutido, de acordo com as características ácido duro base duro dos átomos envolvidos.

O ligante dfcaf mostra um perfil espectroscópico idêntico com alumínio ou gálio (Figura 24). Além de confirmar o caráter iônico da ligação metal-oxigênio, como no caso dos complexos com desferrioxamina, também é possível confirmar que a cafeína do dfcaf não se liga ao metal, devido a que sua banda em 276 nm não apresenta nenhum deslocamento.

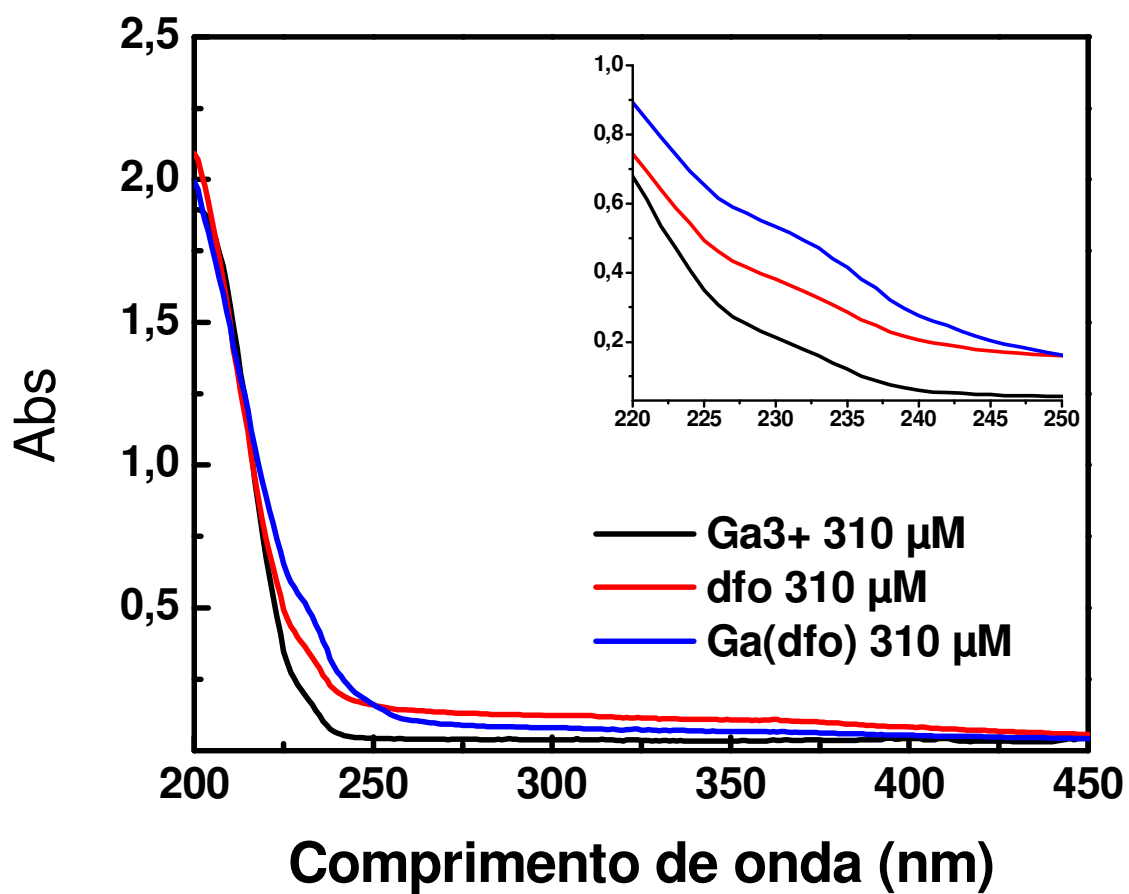
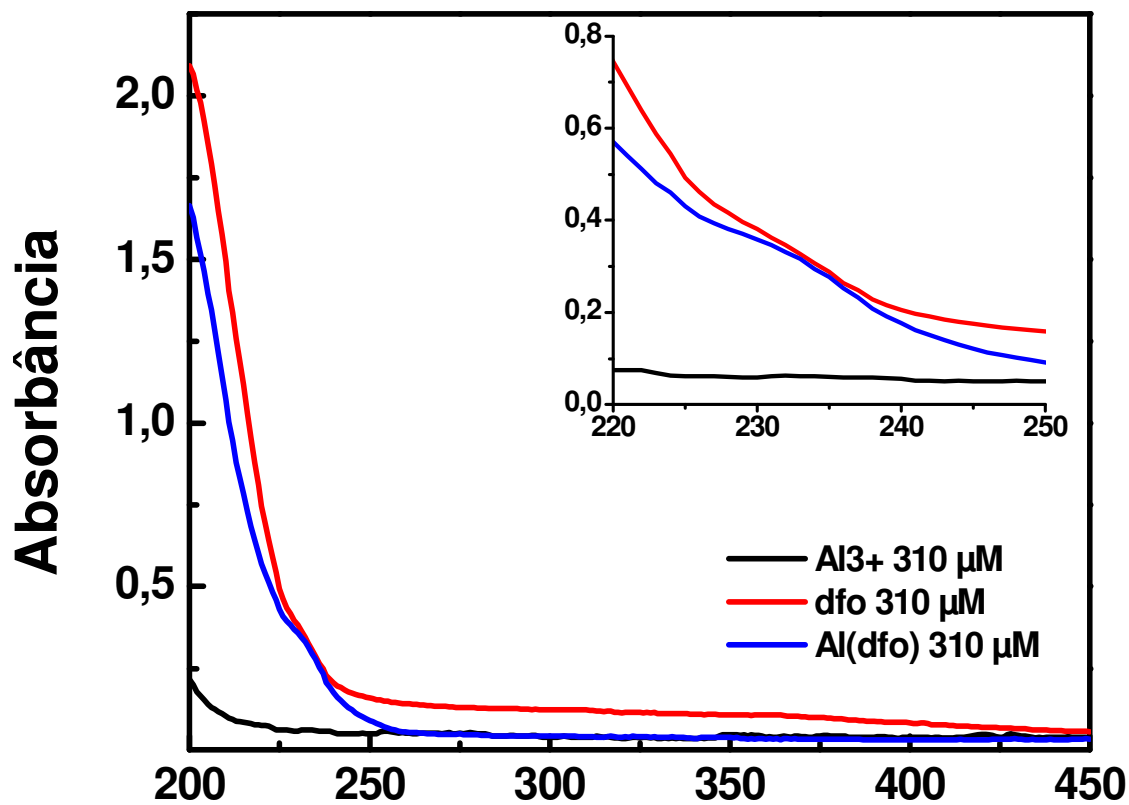


Figura 23. Espectros eletrônicos UV para Al(dfo) e Ga(dfo), a 310 μM em pH neutro.

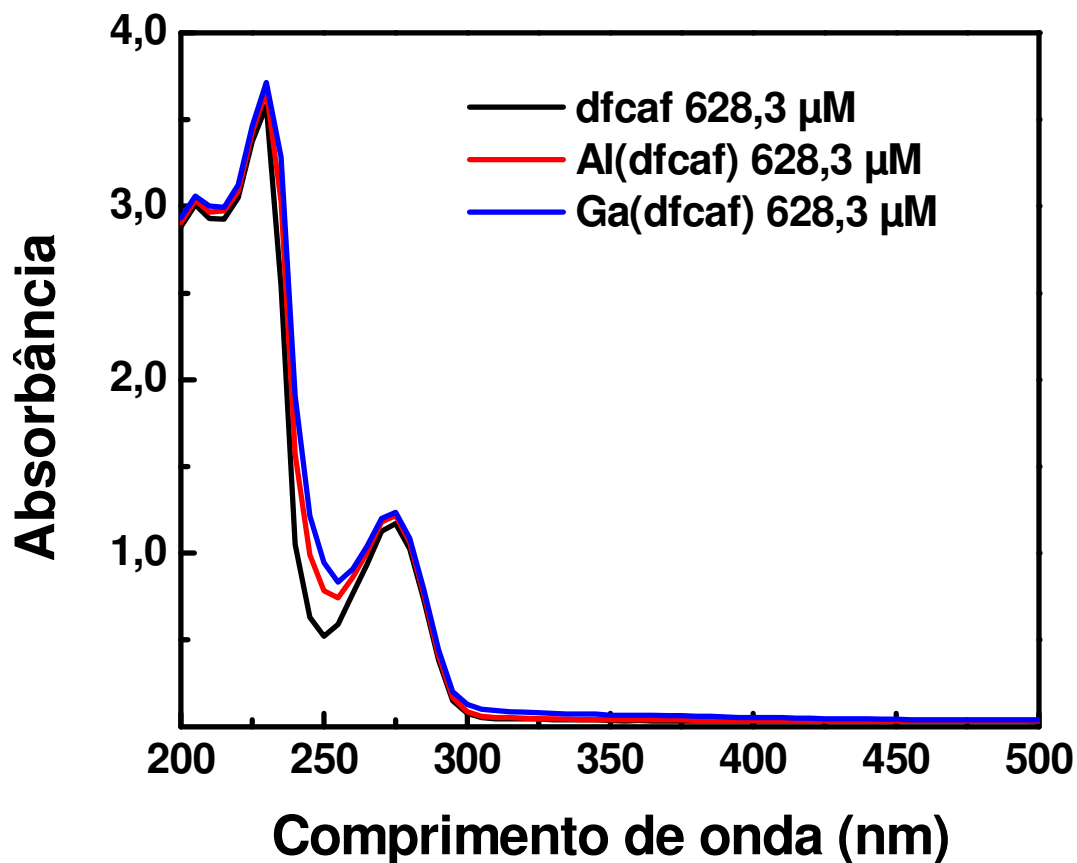


Figura 24. Espectro eletrônico UV para dfcaf, Al(dfcaf) e Ga(dfcaf) a 628,3 μM em DMSO.

4.3. Equilíbrios competitivos com sondas fluorescentes

Os íons Al^{3+} e Ga^{3+} possuem orbitais preenchidos de tipo p e d , por isso não podem estabilizar complexos através de estabilidade de campo ligante e suas soluções não tem cor. Soluções de dfo e dfcaf também não têm cor, por isso os métodos espectrofotométricos não são úteis para estudar a interação destes cátions com os ligantes. É por isso que são desenvolvidos métodos fluorimétricos para estudar indiretamente a formação de $\text{Me}(\text{dfo})$ e $\text{Me}(\text{dfcaf})$ ($\text{Me} = \text{Al}, \text{Ga}$).

4.3.1. Complexos versus calceína-ferro (CAFe)

A calceína é um quelante fluorescente. Quando ligada a Fe^{3+} , formando o complexo “CA-Fe”, sua fluorescência é suprimida, mas de uma maneira reversível: outros quelantes de maior afinidade a ferro podem sequestrar o íon metálico e, portanto, regenerar a fluorescência da calceína (Figura 25). Os ligantes dfo e dfcaf são excelentes quelantes para ferro, sendo capazes de sequestrá-lo de outros quelantes de alta afinidade, como a calceína [63, 109].

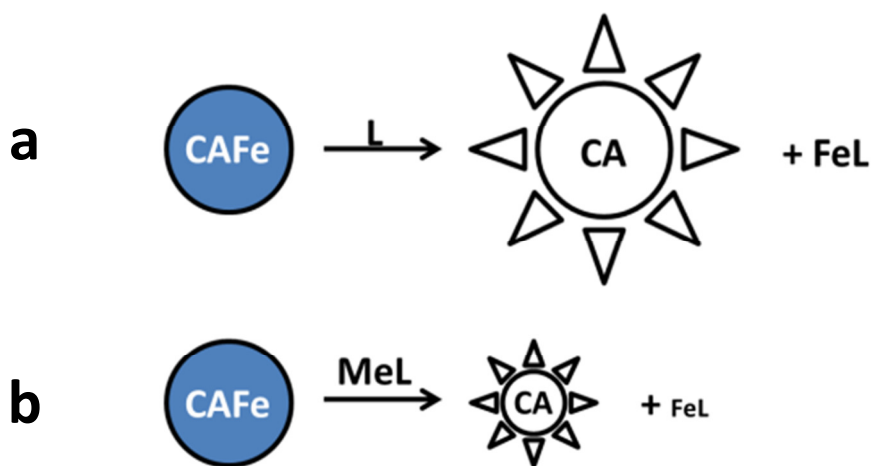


Figura 25. Esquema do teste com calceína- Fe^{3+} (CAFe): (a) a alta afinidade do ligante L (dfo ou dfcaf) pelo Fe^{3+} libera a sonda calceína e a fluorescência é aumentada. (b) Se dfo e dfcaf encontram-se complexados a Me (Al^{3+} ou Ga^{3+}), então a regeneração da fluorescência deve ser retardada.

A dfo apresenta uma maior afinidade que a calceína pelo ferro ($\log\beta$: 33,9 (CAFe) [110]; 42,33 ($\text{Fe}(\text{dfo})$) [62]). Assim a recuperação da fluorescência da calceína é completa. Testes prévios mostraram que os íons Al^{3+} e Ga^{3+} não têm influência sobre a fluorescência da calceína.

A coordenação prévia de Al^{3+} ou Ga^{3+} à dfo dificulta a interação da dfo com ferro, assim a interação com calceína não mostra recuperação de fluorescência (Figura 26) sugerindo a estabilidade dos complexos $\text{Me}(\text{dfo})$ e $\text{Me}(\text{dfcaf})$ ($\text{Me} = \text{Al}$ ou Ga).

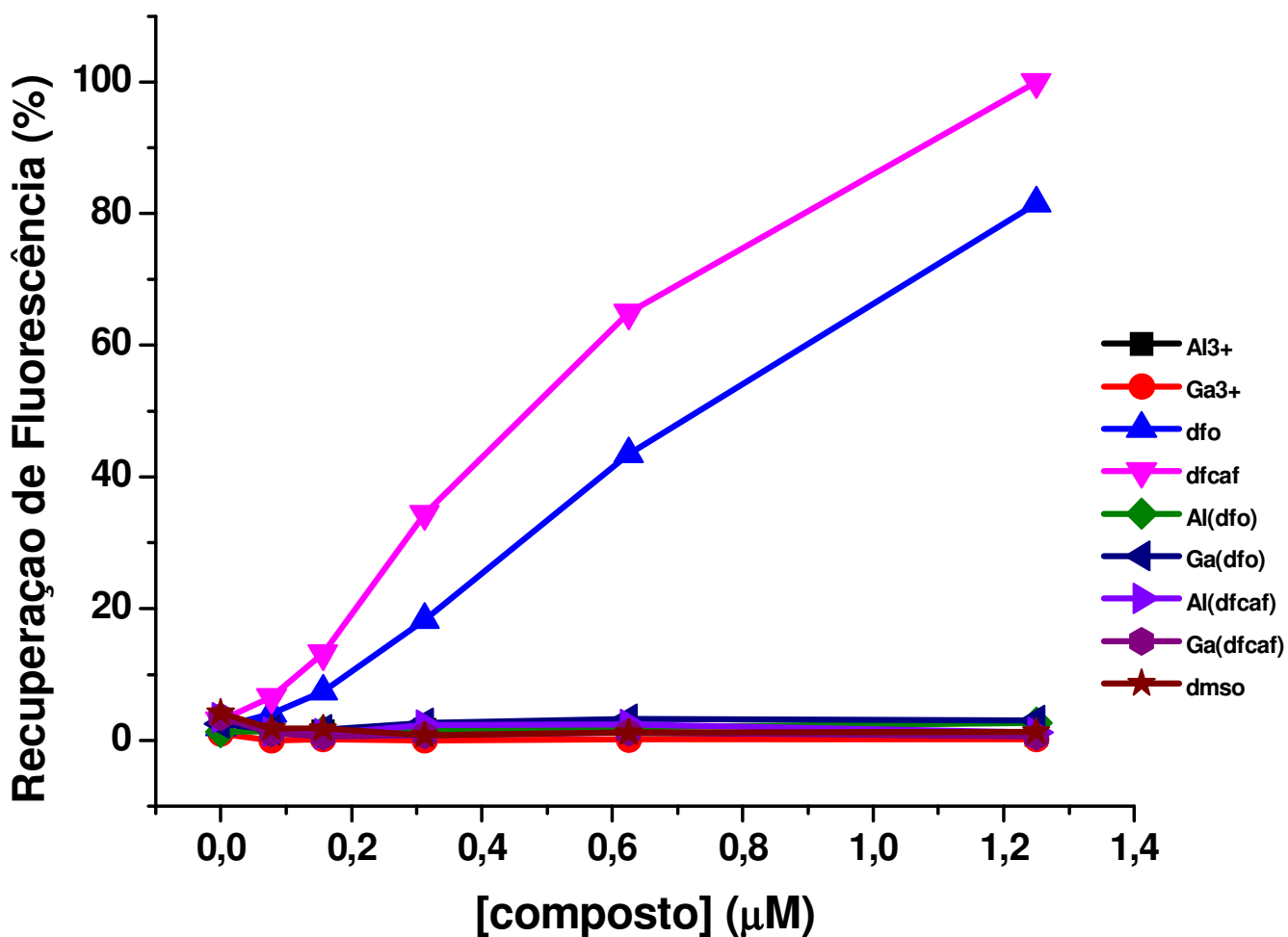


Figura 26. Recuperação da fluorescência de CAFE por Me, L ou MeL em tampão HBS (Me = Al³⁺ ou Ga³⁺; L = dfo ou dfcaf)

4.3.2. Complexos versus 8-HQ

Uma forma direta de detectar a presença de alumínio ou gálio livre em solução é usando a sonda hidroxiquinolona, um quelante fluorescente, que aumenta sua fluorescência quando ligado ao Al³⁺ ou Ga³⁺, formando os complexos Al(HQ)₃ ou Ga(HQ)₃ de relativa estabilidade em solução aquosa neutra (logβ: 14 (Al(HQ)₃) [111], 36 (Ga(HQ)₃) [112]). Se os metais encontram-se formando parte de um complexo estável com dfo ou dfcaf, então a fluorescência da solução não é influenciada (Figura 27).

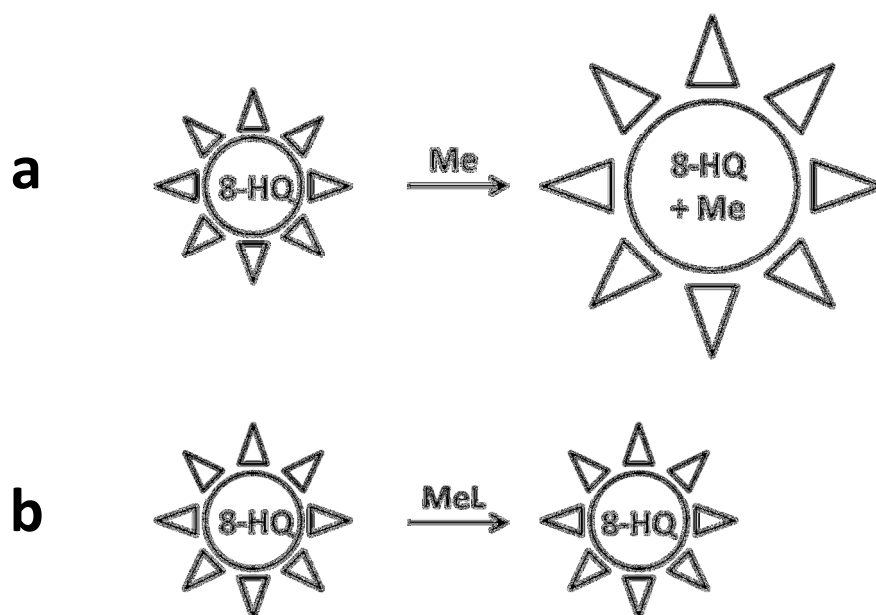


Figura 27. Esquema do teste com hidroxiquinolina (8-HQ): (a) a sonda complexa Me (Al^{3+} ou Ga^{3+}) e a fluorescência é aumentada. (b) Se dfo e dfcaf encontram-se complexados, então a regeneração da fluorescência deve ser inalterada.

Al^{3+} ou Ga^{3+} melhoram a fluorescência natural da 8-HQ, devido a um incremento na rigidez molecular adquirida pelo complexo com respeito do ligante livre. Então na Figura 28, a adição de metal indica um máximo de fluorescência alcançada se o cátion metálico é coordenado por a sonda 8-HQ.

Assim $\text{Al}(\text{dfo})$ não incrementa a fluorescência, e $\text{Al}(\text{dfcaf})$ aumenta modestamente, o qual indica que os ligantes dfo e dfcaf encontram-se formando um composto estável com o alumínio. Já com os compostos com gálio existe um incremento semelhante para ambos os ligantes, o qual indica também a formação dos complexos $\text{Ga}(\text{dfo})$ e $\text{Ga}(\text{dfcaf})$. Esse comportamento pode estar associado com a alta constante de formação do complexo $\text{Ga}(\text{HQ})_3$, $\log\beta = 36$ [112], que pode desestabilizar os complexos $\text{Ga}(\text{dfo})$ e $\text{Ga}(\text{dfcaf})$.

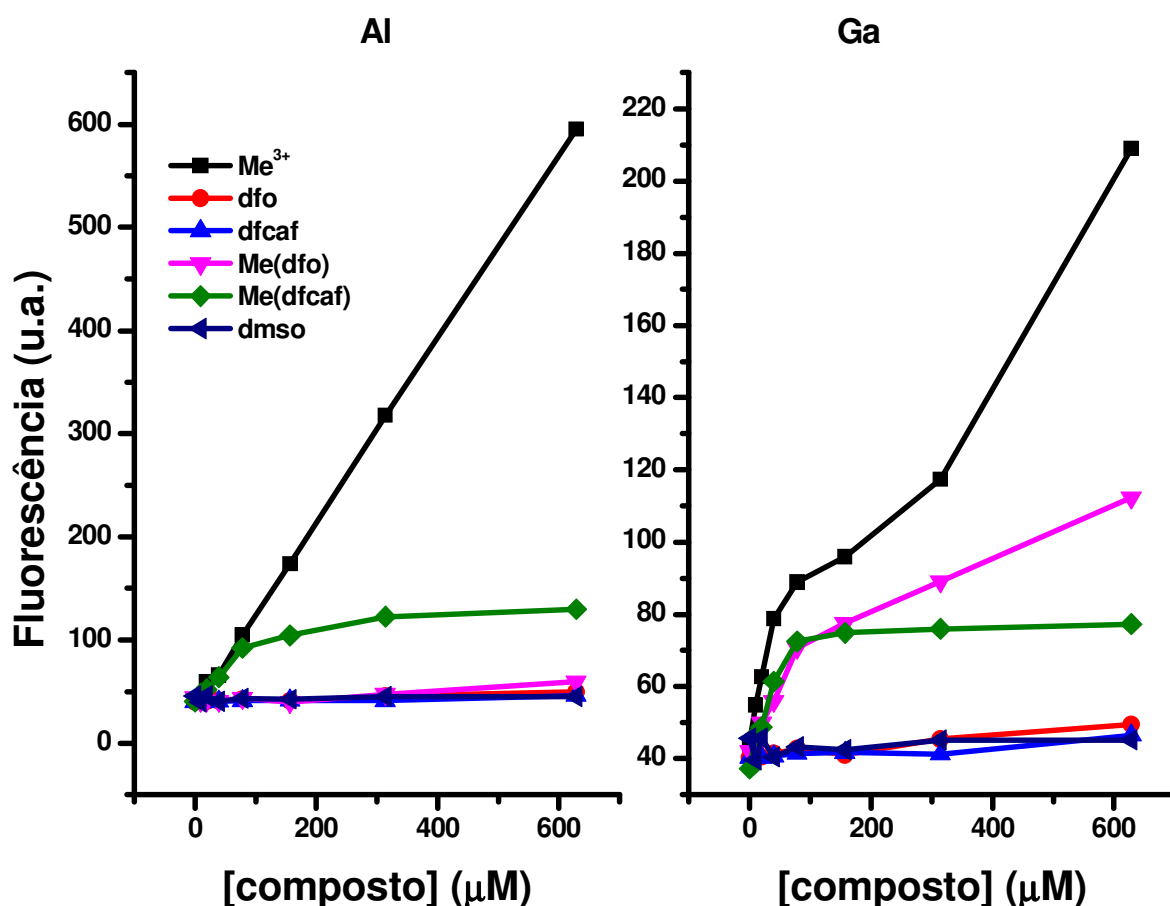


Figura 28. Interação de Me, L ou MeL em tampão HBS (Me = Al³⁺ ou Ga³⁺; L = dfo ou dfcaf) com 8-HQ 750 μM.

4.3.3. Testes com FLDFO

Uma forma de usar a desferrioxamina como sonda fluorescente é acoplado-a com a fluoresceína. O ligante FLDFO (Figura 29a) é obtido pela reação de mesilato de desferrioxamina, trietilamina e fluoresceína-5(6)-isotiocianato em dimetilformamida em ausência de luz, a temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio [113]. Ao contrário das sondas calceína e hidroxiquinolona, a FLDFO fornece uma forma de estudar diretamente o ligante e avaliar a estabilidade pelos metais mediante equilíbrio competitivo.

Vale indicar que usou-se sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (FAS), para dispor de Fe^{2+} em solução e superar a insolubilidade de compostos de Fe^{3+} , mas a oxidação ferro acontece rápida e espontaneamente num intervalo de dez minutos, tempo no qual a coordenação já é alcançada [109]. Num primeiro momento (Figura 29b), ao se ligar FLDFO com Fe^{3+} , a fluorescência da sonda é suprimida, efeito que não é observado para Al^{3+} ou Ga^{3+} , em proporção molar metal-FLDFO 1:1. Esse fenômeno de supressão pode se explicar pela influência dos elétrons desemparelhados do íon férrico ao se formar o complexo Fe(FLDFO) . Quando a sonda coordena a ferro acontece uma modificação nos orbitais moleculares e por conseguinte uma mudança nos estados de transição, responsáveis pela energia emitida na relaxação dos estados excitados no fenômeno de fluorescência. É por isso que os cátions Al^{3+} e Ga^{3+} ao não terem elétrons desemparelhados não suprimem a fluorescência da FLDFO.

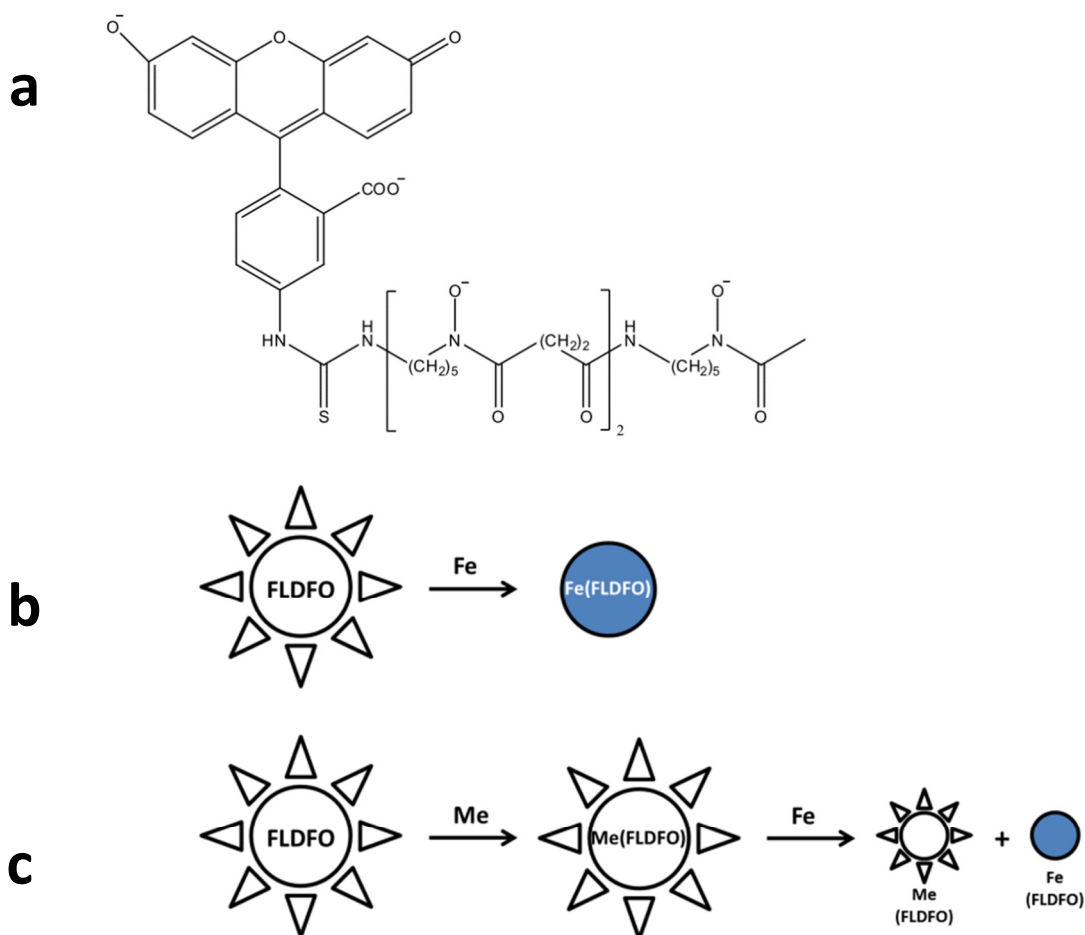


Figura 29. Esquema do teste com (a) fluoresceína-desferrioxamina (FLDFO), (b) a fluorescência do ligante é suprimida ao se complexar com o Fe^{3+} . (c) Me (Al^{3+} ou Ga^{3+}) não suprimem a fluorescência da sonda, logo ao se confrontar com o Fe^{3+} , a supressão é dependente da estabilidade dos complexos Al(FLDFO) ou Ga(FLDFO) . A competição pelo Fe^{3+} é também avaliada com Al(dfo) e Ga(dfo) neste sistema.

Numa segunda montagem experimental (Figura 29c), a adição de Me à sonda FLDFO não provoca sua supressão, mas deve formar um complexo Me(FLDFO). Caso isso seja observado, então a supressão da fluorescência da sonda por Fe(III) deve ser retardada.

Com os dados experimentais foram construídos os gráficos da Figura 30. Na parte “a” da figura, uma primeira adição dos íons metálicos livres forma os complexos com FLDFO, sendo Fe(FLDFO) o único a apresentar supressão. Caso não houvesse formação de Al(FLDFO) ou Ga(FLDFO), então uma segunda adição de ferro deveria promover a supressão de fluorescência da sonda. Isso não acontece para o caso do alumínio, e acontece parcialmente para o caso do gálio. Isso mostra que o Al(III) é mais estável e/ou cineticamente mais inerte que o Ga(III) quando complexado ao FLDFO, mas de qualquer forma ambos os íons formam complexos em solução.

Na Figura 31b, apresenta-se o teste agora com Me(dfo) já pré-formado, nas mesmas condições. Após a adição de Al(dfo) e Ga(dfo) não ocorre considerável supressão de fluorescência. Porém, após a adição de ferro(III) na solução tratada com Ga(dfo), observa-se uma supressão de aproximadamente 50% da fluorescência, resposta associada provavelmente com a coordenação de ferro(III) tanto ao dfo não fluorescente (proveniente da dissociação de Ga(dfo)) quanto ao dfo fluorescente (FLDFO). Isso não acontece na mesma extensão com a solução previamente tratada com Al(dfo), que é praticamente totalmente suprimida, certamente pelo fato de que o ferro(III) encontra pouco dfo proveniente da dissociação do Al(dfo). Ambos os experimentos da Figura 31 mostram que os complexos de Al e Ga formam-se com FLDFO (e, por extensão, com dfo). A facilidade de troca destes íons com o ferro está associada às cinéticas de substituição envolvidas. Podemos observar que o gálio se libera mais rapidamente que o alumínio; isso se deve a que este último é um íon com um raio menor que o do gálio, para uma mesma carga positiva, o que implica em uma maior densidade de carga. Isso faz com que a interação com uma base dura de Pearson como o oxigênio seja cineticamente mais inerte que a interação com o gálio [114].

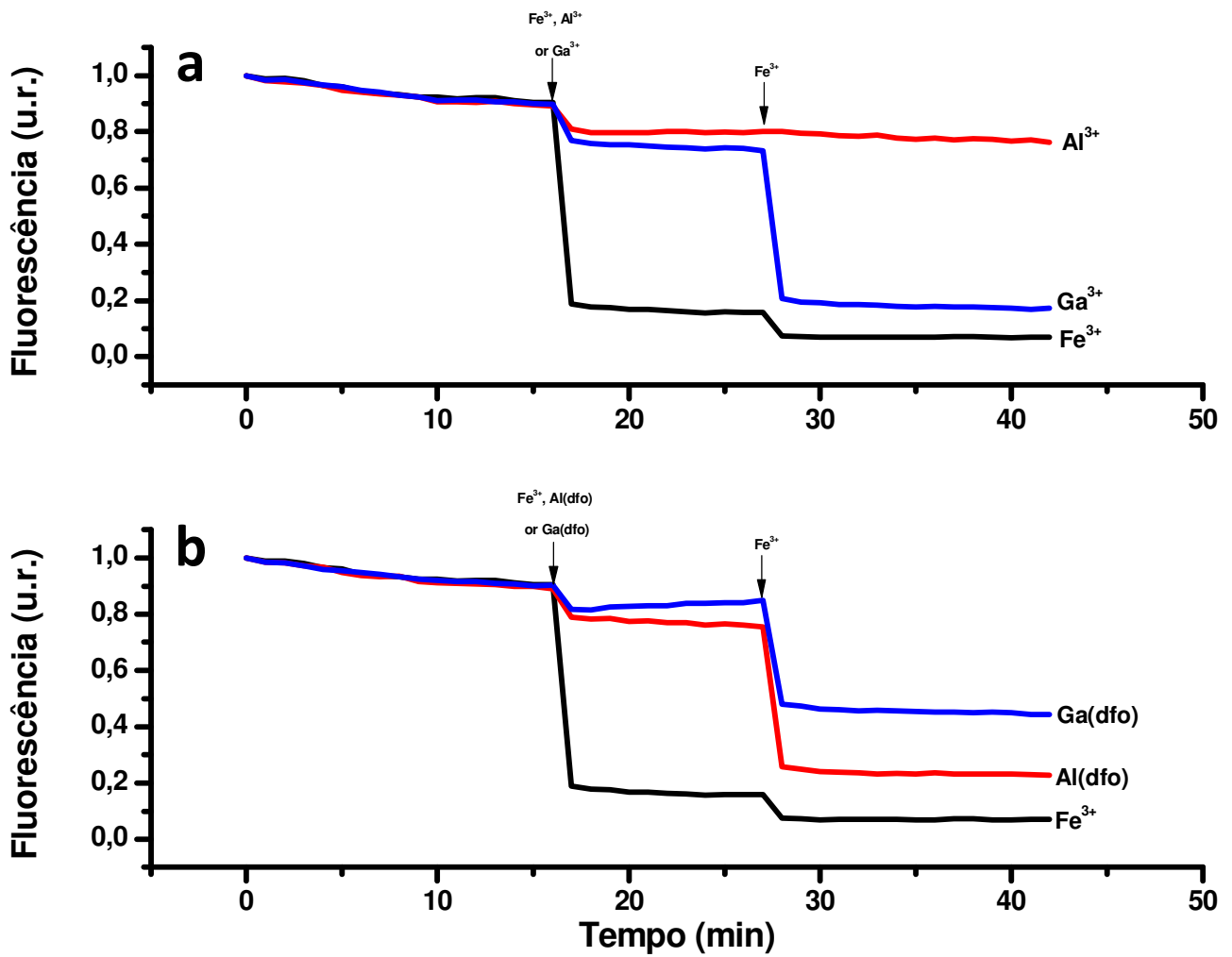


Figura 30. Efeito de (a) Me livre ou (b) Me(dfo) (Me = Al³⁺ ou Ga³⁺) na fluorescência de FLDFO. Para clareza é subtraída a fluorescência de fundo da FLDFO (~ 0,3 u.r.). u.r. = unidades relativas de fluorescência.

4.4. Atividade antioxidante dos complexos

O teste oferece a possibilidade de detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ERO's) em meio fisiológico, geradas pela presença de ferro com capacidade de reagir com ascorbato. No caso do Fe^{3+} se achar "livre" ou em complexos redox-ativos (nosso caso Fe(nda)), as ERO's oxidam a sonda fluorimétrica cloreto de dihidrorodamina (DHR) para rodamina, que é fluorescente. No caso do ferro se encontrar com ligantes que diminuem seu potencial de redução, como dfo ou dfcaf, a produção de ERO's é suspensa e a formação de rodamina é bloqueada (Figura 31). Se estes ligantes encontram-se complexados com Al^{3+} ou Ga^{3+} com relativa estabilidade então a formação de ERO's pode ser detectável [115].

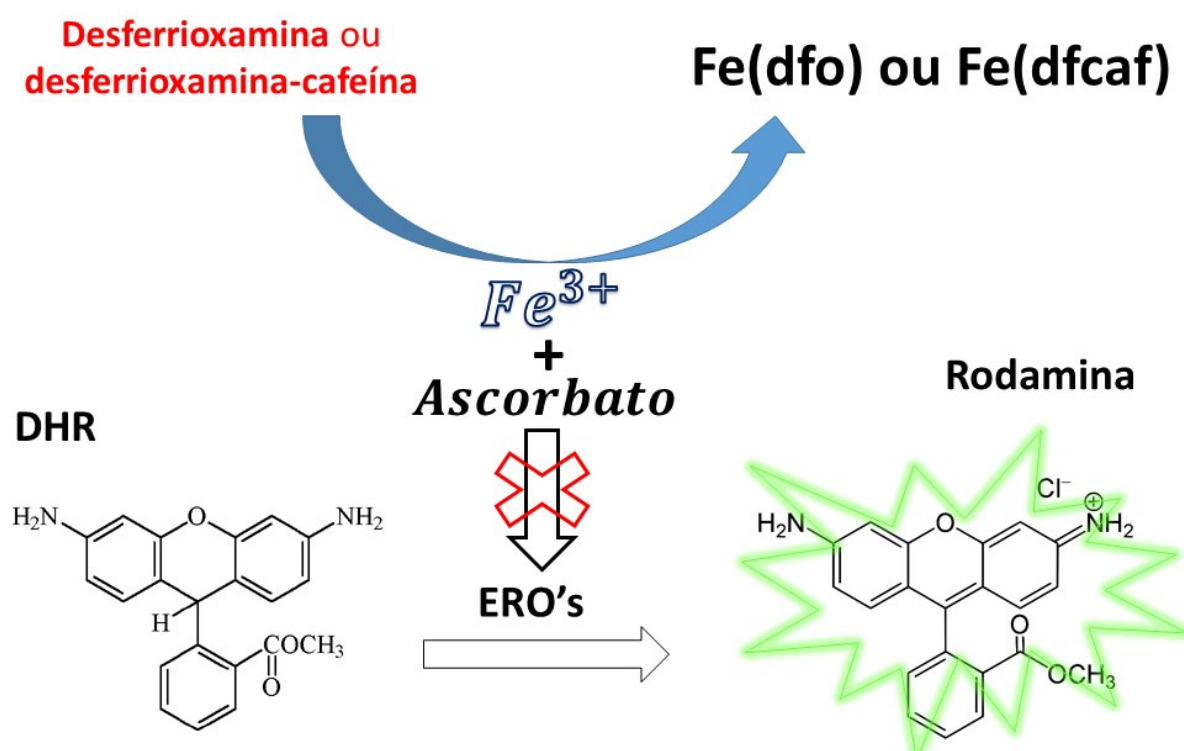


Figura 31. Esquema do teste de avaliação da atividade antioxidante com o sistema ferro/ascorbato [109].

A Figura 32 mostra a velocidade de oxidação de DHR para concentrações crescentes dos compostos: Al^{3+} , Ga^{3+} , dfo, dfcaf, $\text{Al}(\text{dfo})$, $\text{Ga}(\text{dfo})$, $\text{Al}(\text{dfcaf})$, $\text{Ga}(\text{dfcaf})$. De acordo com o esperado, dfo e dfcaf comportam-se como antioxidantes ao coordenar o ferro de $\text{Fe}(\text{nta})$ e bloquear a formação de ERO's. Al^{3+} e Ga^{3+} não têm influência no sistema ferro/ascorbato. $\text{Al}(\text{dfo})$, $\text{Ga}(\text{dfo})$, $\text{Al}(\text{dfcaf})$ e $\text{Ga}(\text{dfcaf})$ também não apresentam influência, o qual indica que os ligantes dfo e dfcaf encontram-se coordenados com relativa estabilidade. Diferentemente do observado na Figura 30, aqui o ferro encontra-se já complexado ao ligante nta, então mesmo uma dissociação dos complexos $\text{Al}(\text{dfo})$ ou $\text{Ga}(\text{dfo})$ pode não gerar uma quantidade de dfo em solução grande o suficiente para competir com esse ligante, na escala de tempo deste experimento.

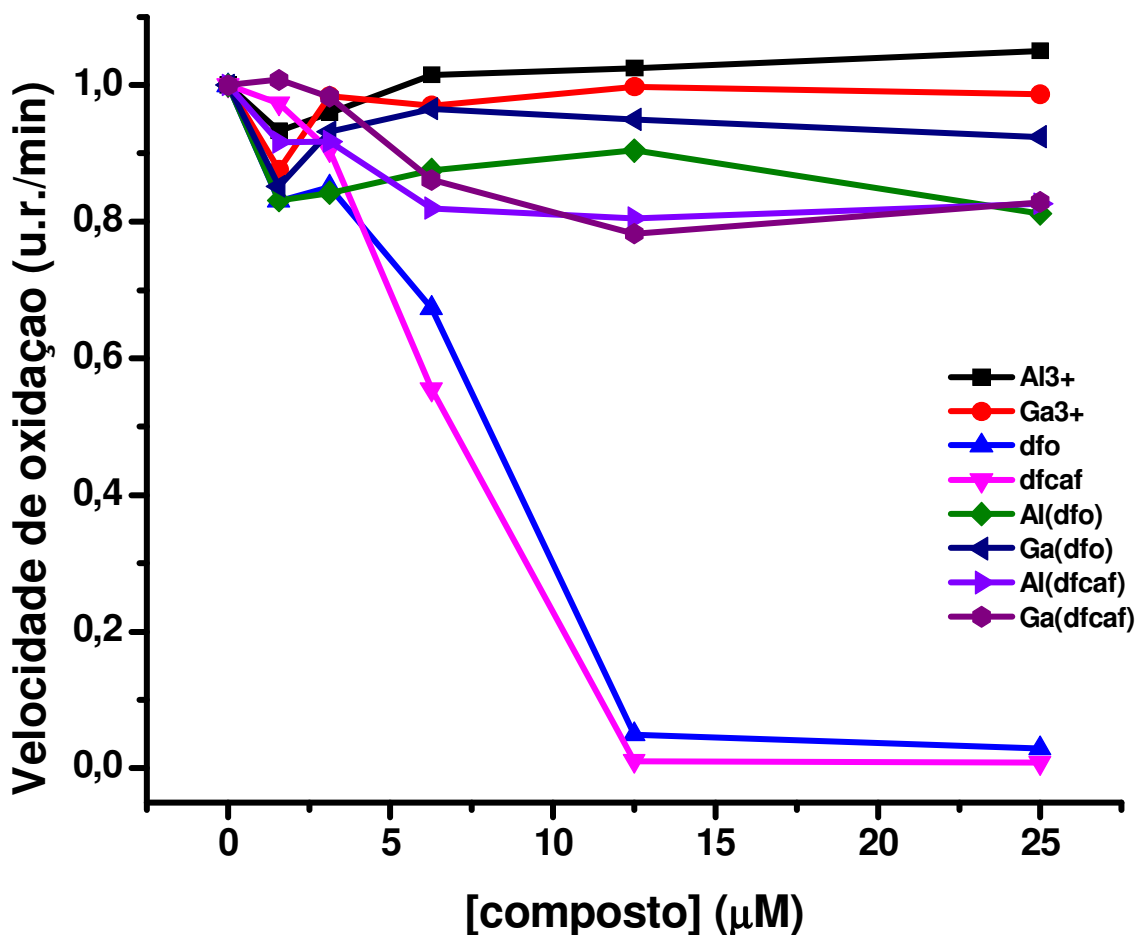


Figura 32. Efeito de Me, L ou MeL (Me = Al^{3+} ou Ga^{3+} ; L = dfo ou dfcaf) na velocidade de oxidação de DHR catalisada pelo sistema ferro/ascorbato. u.r. = unidades relativas de fluorescência.

4.5. Testes biológicos

Micróbios patogênicos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *C. albicans* apresentam captação de ferro por sideróforos com hidroxamatos como a desferrioxamina B, embora não a produzam. Então, esse sideróforo carregado com íons tóxicos pode ser um meio de interromper sua homeostase do ferro e estudar uma nova família de compostos de tipo Cavalo de Tróia como alternativa à resistência aos antibióticos oferecida por esses micróbios.

Com essa premissa testaram-se os ligantes dfo e dfcaf e seus complexos com alumínio ou gálio. Foram feitas curvas dose-resposta para a determinação da concentração inibitória média (IC_{50}), um índice de toxicidade que significa a concentração do composto que induz 50% da morte celular (Anexo 8.4) que são resumidas na Figura 33.

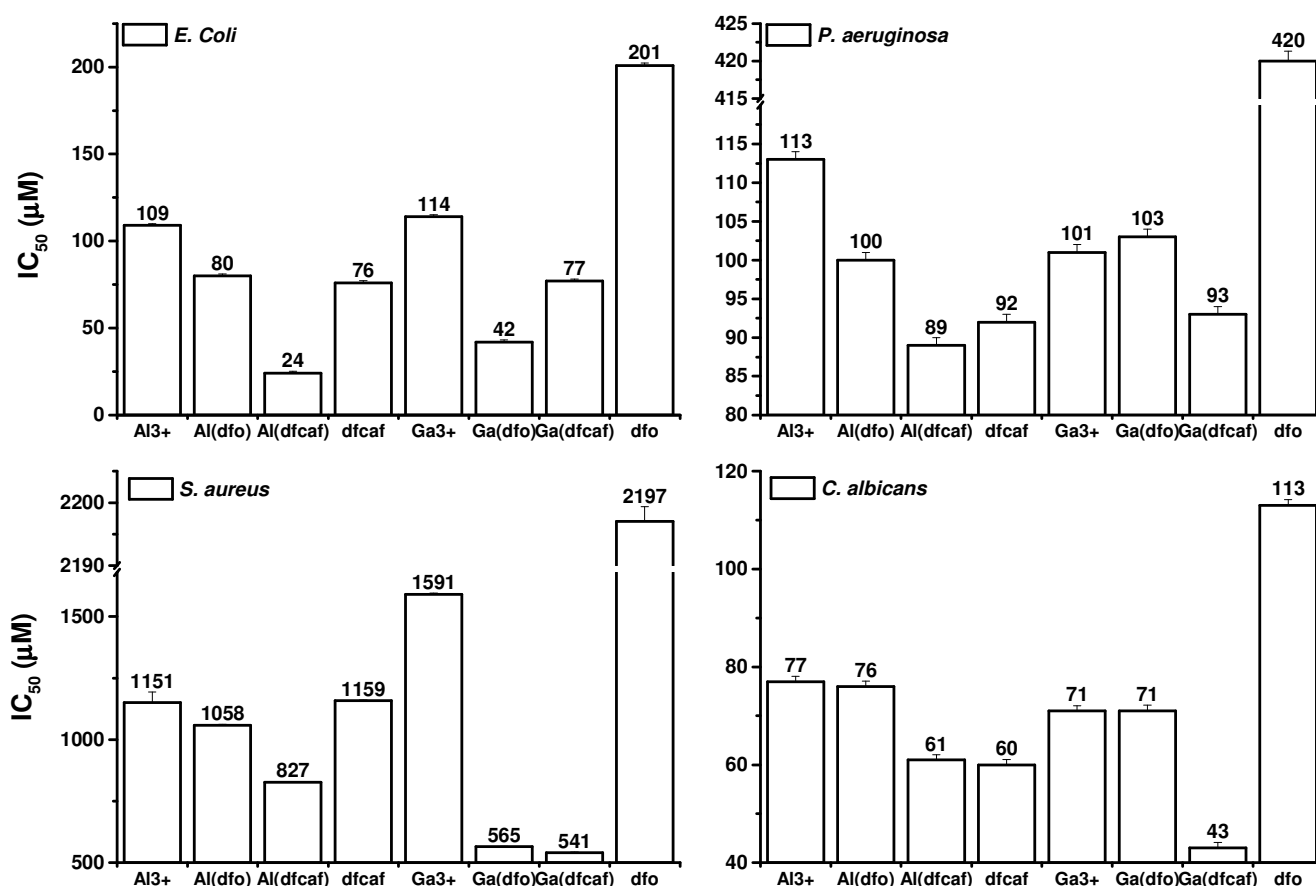


Figura 33. Valores de IC_{50} para os compostos nos testes microbiológicos.

A seguir são comparados e discutidos os valores de IC_{50} de Me, L e MeL (Me = Al^{3+} ou Ga^{3+} ; L = dfo ou dfcaf). Valores com IC_{50} menor indicam um aumento na citotoxicidade do composto.

Uma análise só dos ligantes dfo e dfcaf permite reconhecer em todos os microrganismos uma maior toxicidade do dfcaf. Por um lado, a desferrioxamina não tem porque ser tóxica para os microrganismos que a usam para obter ferro, então são necessárias concentrações bem altas para se tornar tóxica, ao contrário do dfcaf, que tem um maior caráter lipossolúvel outorgado pela fração de cafeína o qual lhe permite ser relativamente mais permeável à membrana celular, internalizando um forte ligante no citoplasma que pode interferir na homeostase de outros íons como Zn^{2+} [116]. Essa característica permeável do dfcaf o torna um potencial antibiótico inclusive para organismos que não possuem mecanismos de internalização de dfo.

Uma internalização de sideróforos com alumínio ou gálio coordenados, pode se considerar como um tipo de terrorismo celular, devido ao potencial efeito tóxico que leva à liberação dos metais no citoplasma. O potencial de redução Fe^{3+} (dfo) é de -450 mV, que só pode ser alcançado em meio biológico se houver acoplado ao redutor $NADH/NAD^+$ ($E^0 = -320$ mV) um sistema quelante de $Fe(II)$. Isso eleva o potencial de redução Fe^{3+} (dfo) para ~ -300 mV, dentro da faixa de operação dos redutores bioquímicos [26]. Entretanto, os íons livres Al^{3+} e Ga^{3+} têm potenciais de redução já muito baixos (-1680 e -530 mV, respectivamente [10, 22], e esses potenciais devem ser ainda menores em caso de complexação. Portanto, não se esperaria que complexos desses íons possam ser reduzidos *in vivo*, podendo portanto causar dano no DNA, ou competir com Mg^{2+} na ligação de fosfato na síntese de ATP [117].

4.5.1. *E. coli*

Um aumento de toxicidade considerável é observado ao comparar os IC_{50} de dfo (201 μM) e dfcaf (76 μM), que já foi discutido. Em *E. coli* o receptor de membrana externa FhuA reconhece e transporta sideróforos do tipo hidroxamato como o ferricromo.

Qualquer análogo estrutural do ferricromo que conserve intacta a porção quelante do ferro é reconhecido e transportado pelo FhuA [118]. Por isso a albomicina ou a fenilferricrocina, análo-

gos estruturais do ferricromo são potentes antibióticos contra *E. coli*. Esses dois antibióticos do tipo *cavalo de Tróia* são polares mas neutros em pH fisiológico, além de serem altamente hidrofóbicos [119].

Para melhor compreender a citotoxicidade do dfcaf foi feito um estudo de docagem molecular (usando o programa AutoDock [120]) de Fe(dfcaf) em FhuA, comparando-se com a docagem da ferro-fenilferricrocina. Os resultados indicam que o Fe(dfcaf) ocupa o mesmo buraco hidrofóbico que a fenilferricrocina em FhuA, o qual pode ser um possível mecanismo de entrada para dfcaf. Se bem que a Figura 34 na direita mostra a interação energeticamente mais favorável, os cálculos mostram que praticamente todas as interações de Fe(dfcaf) com FhuA acontecem no mesmo espaço hidrofóbico (Anexo 8.5), o qual dá evidência que o dfcaf pode ser também um antibiótico do tipo *cavalo de Tróia*.

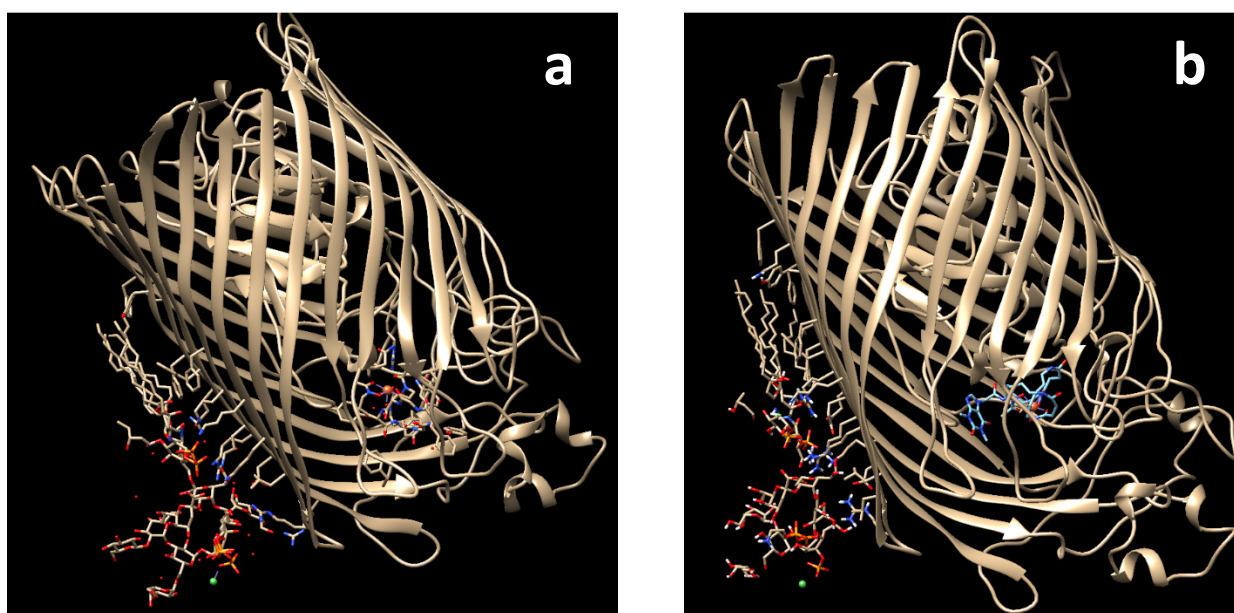


Figura 34. Localização em FhuA de (a) ferro-fenilferricrocina ou (b) Fe(dfcaf). Para ferro-fenilferricrocina: dados do Protein Data Bank (código 1QJQ [119]). Desenho com Marvin Sketch, Docagem em AutoDock e visualização em Chimera 1.10.2. Está mostrada apenas a interação mais favorável energeticamente.

A toxicidade de alumínio é superada pelo Al(dfo), e mais ainda pelo Al(dfcaf), seguramente pelo efeito sinérgico entre o metal e dfcaf. Ga^{3+} apresenta uma toxicidade próxima à do Al^{3+} , a qual é duplicada para $\text{Ga}(\text{dfcaf})$, mais uma vez confirmando a sinergia citotóxica do metal e o li-

gante dfcaf. Um menor IC_{50} é observado para Ga(dfo), mostrando quase triplicada a toxicidade com respeito ao Ga^{3+} , um efeito particular em relação ao esperado.

4.5.2. *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, analogamente à *E. coli*, é uma bactéria Gram-negativa onde os receptores de sideróforos encontram-se na membrana externa [93]. Embora seus receptores não são os mesmos, eles reconhecem e transportam desferrioxamina por um mecanismo análogo, e a toxicidade dos complexos foi relativamente maior comparada com Al^{3+} ou Ga^{3+} , como aconteceu na *E. coli*.

O Ga^{3+} segue um processo de absorção via cavalo de Tróia, interferindo na sinalização do ferro e diminuindo sua absorção pelas bactérias [121]. O Al^{3+} já internalizado pode interagir com ATP 10^7 vezes mais fortemente que o Mg^{2+} , inibindo enzimas que formam complexos ternários iônico metálico-ATP-enzima. Quantidades menores que nanomolar de Al^{3+} livre podem competir com níveis de Mg^{2+} milimolar [122]. Esses fatos evidenciam o forte impacto que produzem os metais livres dentro da bactéria.

$Al(dfo)$ apresenta maior toxicidade que Al^{3+} e dfo, o qual evidencia um efeito sinérgico na toxicidade, confirmando a internalização do metal via efeito cavalo de Tróia. Por outro lado, Ga(dfo) mostra valores próximos de IC_{50} aos do Ga^{3+} , sendo os dois mais tóxicos que dfo. Isso mostra que a coordenação do gálio(III) à dfo pode ser uma estratégia de entrega controlada de um íon tóxico. Nesse sentido, Ga(dfo) já foi aplicado com sucesso frente a biofilmes de *P. aeruginosa* para tratamento de infecções na córnea em coelhos [123], que resultou numa patente [124].

$Al(dfcaf)$ apresenta uma toxicidade maior que Al^{3+} e dfcaf, confirmando sua ação pelo efeito cavalo de Tróia. Ga(dfcaf), mostra um IC_{50} muito próximo que o dfcaf, sendo provavelmente o ligante o principal fator da toxicidade em *P. aeruginosa*. Por outro lado, comparando os complexos Me(dfcaf), a toxicidade pode estar associada com sua estabilidade, assim $Al(dfcaf)$ que é mais estável em solução pode internalizar melhor o alumínio nas bactérias e ter maior toxicidade que o Ga(dfcaf).

Fazendo uma comparação entre o aumento na toxicidade de MeL em relação ao Me, podemos reconhecer que o efeito cavalo de Tróia é maior em *E. coli* que em *P. aeruginosa*, já que

uma variação de IC₅₀ de 109 µM com Al³⁺ diminui para 24 µM com Al(dfcaf), quase cinco vezes a diferença da registrada para *P. aeruginosa*.

4.5.3. *S. aureus*

Ao contrário de *E.coli* e *P aeruginosa*, *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, possuindo uma parede grossa formada por peptidoglicanos, que tornam relativamente mais difícil sua penetrabilidade [93]. Isso se reflete nos valores mais elevados de IC₅₀ observados para todos os compostos (Figura 33).

Al³⁺ já demonstrou ter interação com a membrana celular externa do *S. aureus*, sendo essa dependente do pH, então uma maior concentração de alumínio produz a acidificação do meio e uma maior adsorção e toxicidade na *S. aureus* [125]. Ga³⁺ parece apresentar o mesmo efeito porque registra um maior IC₅₀, provavelmente porque não é um ácido duro de Pearson e se liga com menor afinidade aos oxigênios da superfície da bactéria.

Al(dfo) é mais tóxico que Al³⁺, Al(dfcaf) mais tóxico que dfcaf e Al³⁺; e dfcaf mais tóxico que dfo, por isso pode se confirmar seu efeito cavalo de Tróia em *S. aureus*. Ga(dfo) e Ga(dfcaf), também confirmam esta atividade antibiótica.

Em geral nos micróbios, ante a impossibilidade do complexo cavalo de Tróia se reduzir uma vez internalizado na célula, tornasse tóxico já que pode interagir com proteínas respiratórias incluindo citocromos ligados à membrana, tornando-os incapazes de transferir elétrons para a produção de ATP, provocando uma respiração limitada e contribuindo à produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, pode inibir bombas de efluxo, encarregadas de manter a homeostase do grupo heme, catalisando a geração de radicais de oxigênio tóxicos e dano ao DNA [126].

4.5.4. *C. albicans*

O fungo *C. albicans* apresentou também resposta tóxica frente aos complexos principalmente no Ga(dfcaf), o qual indica que podem ser úteis para o tratamento tópico de infecções fúngicas. A internalização de Ga³⁺ em *C. albicans*, foi reconhecido por competição com Fe³⁺ ao se ligar

com desferrioxamina ou ferricromo no fungo *Ustilago sphaerogena* [79]. Isso pode sugerir que a toxicidade idêntica de Ga^{3+} e $Ga(dfo)$, seja devido à síntese de algum sideróforo próprio. $Al(dfcaf)$ mostrou maior toxicidade que Al^{3+} e $Al(dfo)$, mais uma vez associando sua maior permeabilidade devido à cafeína que possui. Patógenos como *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *C. albicans* desenvolveram resistências a alguns agentes antimicrobianos desde os anos 1950, em que começou a comercialização massiva dos antibióticos (Figura 35). Fármacos como a penicilina devem ser usados cuidadosamente, por exemplo frente a infecções de garganta ou febre, já que o patógeno *Streptococcus pyogenes* já adquiriu grande resistência. Assim, metalofármacos de tipo cavalo de Tróia oferecem uma nova alternativa com a vantagem de não ocasionar resistência das bactérias.

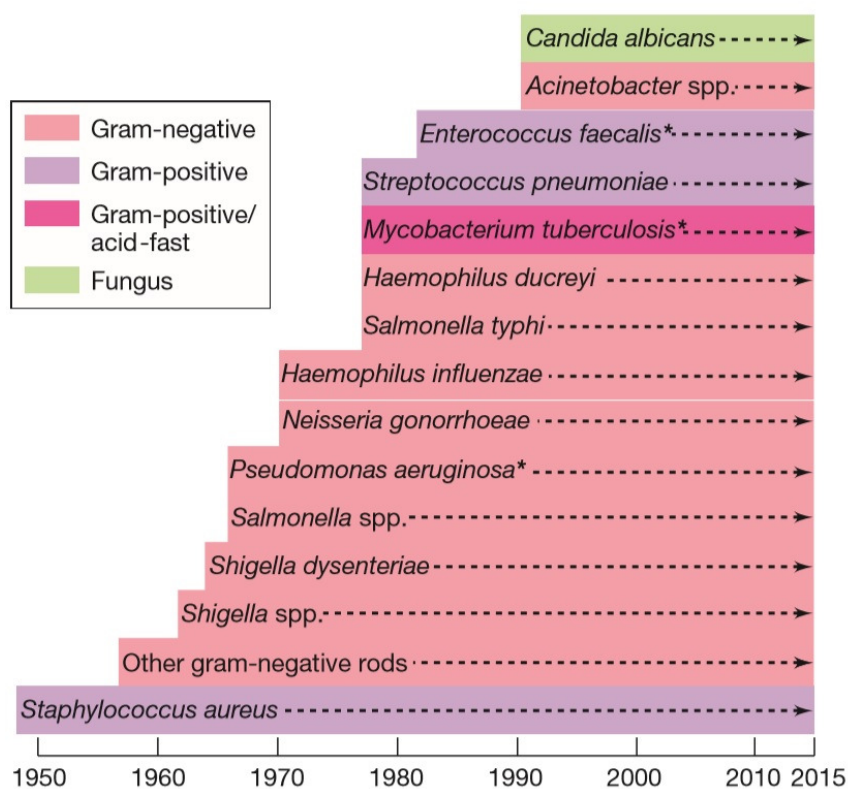


Figura 35. O aparecimento de resistência aos antibióticos contra alguns patógenos humanos. (*) Cepas dos patógenos que não são tratáveis com medicamentos antimicrobianos conhecidos [93].

5. Conclusões

A formação dos complexos foi conseguida em solução aquosa para os compostos com desferrioxamina e em dimetilsulfóxido para a desferrioxamina-cafeína, superando-se a dificuldade de sintetizá-los na forma sólida ao caracterizá-los em solução. A espectrometria de massas mostrou a existência dos compostos na forma mais simples de preparação ao misturar metal e ligante na mesma proporção molar. Também a voltametria cíclica permitiu reconhecer a supressão da resposta elétrica dos ligantes quando acontece a formação dos complexos.

Os testes com sondas fluorescentes foram fundamentais para o estudo da estabilidade da formação dos complexos. No caso do teste com calceína foi possível reconhecer de forma indireta que os complexos com dfo e dfcaf não liberam facilmente o alumínio ou ao gálio, dando uma ideia da força da coordenação. Por outro lado, o teste com hidroxiquinolina permitiu demonstrar de forma direta a estabilidade dos complexos, com aumento na fluorescência da sonda ao se ligar aos metais, sendo diferente a resposta dos complexos. O teste com FLDFO permitiu avaliar diretamente a desferrioxamina em competição com sua versão fluorescente, para demonstrar a estabilidade dos complexos.

Na avaliação antioxidante no sistema ferro/ascorbato, os complexos de alumínio ou gálio com dfo ou dfcaf não são antioxidantes, evidenciando novamente que os ligantes estão formando complexos estáveis com esses metais. Por outro lado, tais complexos também não são pró-oxidantes.

Nos testes biológicos, o dfcaf manifestou um relativo incremento na toxicidade em comparação à dfo em alguns micróbios, podendo-se associar este efeito com uma maior internalização outorgada pela cafeína. Todos os complexos em estudo demonstraram incrementar o efeito nocivo tanto dos metais como dos ligantes de forma isolada, confirmando a hipótese do efeito cavalo de Tróia nos micróbios estudados.

6. Perspectivas

O comportamento dos complexos sintetizados e estudados em micróbios, sem dúvida deixa uma porta aberta a futuros testes com alumínio e gálio em biomoléculas portadoras de Fe(III), como atualmente é feito.

A “confusão” provocada em bactérias e fungos é interessante no sentido de enfrentar a resistência que micróbios apresentam aos antibióticos. Alternativas são inúmeras com o uso de sideróforos naturais ou conjugados sintéticos carregados com alumínio e gálio para a aplicação deste efeito cavalo de Tróia.

Um alvo para testar a atividade antitumoral dos compostos em estudo pode ser a linhagem HeLa.

Outra oportunidade de investigação é o estudo teórico dos novos complexos sintetizados Al(dfcaf) e Ga(dfcaf), para a determinação de propriedades químicas ao interagir com proteínas receptoras de ferro de interesse para futuras aplicações farmacológicas.

7. Bibliografia

1. Rabinovich, D., *The allure of aluminium*. Nat Chem, 2013. **5**(1): p. 76-76.
2. Verne, J., E. Roth, and A. Parrett, *From the Earth to the Moon*. 2005: Barnes & Noble Books.
3. Gray, T.W. and N. Mann, *The Elements: A Visual Exploration of Every Known Atom in the Universe*. 2012: Black Dog & Leventhal Publishers.
4. Guillen, M., *Five Equations That Changed the World: The Power and Poetry of Mathematics*. 1995: Hyperion.
5. Asimov, I., *The Search for the Elements/ Isaac Asimov*. 1962: Fawcett.
6. Lee, J.D., *Química inorgânica não tão concisa*. 1999: Ed. Edgard Blucher.
7. Pasachoff, N., *Marie Curie: And the Science of Radioactivity*. 1996: Oxford University Press, USA.
8. Levaditi, C., et al., *Therapeutic Properties of Gallium in Syphilis and Trypanosomiasis*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1931. **192**(18): p. 1142-1143.
9. Brucer, M., G.A. Andrews, and H. Bruner, *A Study of Gallium-72 1: Summary and Conclusions*. Radiology, 1953. **61**(4): p. 534-613.
10. Aldridge, S. and A.J. Downs, *The Group 13 Metals Aluminium, Gallium, Indium and Thallium: Chemical Patterns and Peculiarities*. 2011: Wiley.
11. Wright, R.B., J.K. Bates, and D.M. Gruen, *Matrix-isolation spectroscopy of aluminum, copper, and nickel hydrides and deuterides produced in a hollow-cathode discharge*. Inorganic Chemistry, 1978. **17**(8): p. 2275-2278.
12. Urban, R.D., et al., *The ground state infrared spectra of four diatomic deuterides (GaD, InD, TlD, AgD) and the determination of mass-independent molecular parameters*. The Journal of Chemical Physics, 1991. **94**(4): p. 2523-2528.
13. Dohmeier, C., D. Loos, and H. Schnöckel, *Aluminum(I) and Gallium(I) Compounds: Syntheses, Structures, and Reactions*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1996. **35**(2): p. 129-149.
14. Dohmeier, C., et al., *The Tetrameric Aluminum(I) Compound $[Al(\eta^5-C_5Me_5)]_4$* . Angewandte Chemie International Edition in English, 1991. **30**(5): p. 564-565.
15. Koch, H.-J., et al., *Synthese und Struktur von CpAlCl₂-Verbindungen mit sterisch anspruchsvollen Substituenten (Cp = Me₅C₅, EtMe₄C₅)*. Chemische Berichte, 1992. **125**(5): p. 1107-1109.
16. Schormann, M., et al., *Sodium-Potassium Alloy for the Reduction of Monoalkyl Aluminum(III) Compounds*. Journal of Solid State Chemistry, 2001. **162**(2): p. 225-236.
17. Downs, A.J., *Chemistry of Aluminium, Gallium, Indium and Thallium*. 1993: Springer Netherlands.
18. Kafafi, Z.H., *Organic Electroluminescence*. 2005: CRC Press.
19. Cabantchik, Z.I., *In Search for Symbolic Qualities of Iron: The Metal of Life*. Frontiers in Pharmacology, 2016. **7**: p. 220.
20. McDowell, L.R., *Minerals in animal and human nutrition*. 2003: Elsevier Science BV.
21. Abbaspour, N., R. Hurrell, and R. Kelishadi, *Review on iron and its importance for human health*. Journal of Research in Medical Sciences, 2014. **19**(2).
22. Greenwood, N.N. and A. Earnshaw, *Chemistry of the elements*. 1984: Pergamon Press.
23. Raymond, K.N. and E.A. Dertz, *Biochemical and Physical Properties of Siderophores, in Iron Transport in Bacteria*. 2004, American Society of Microbiology. p. 1-13.
24. Weiner, R., *The mechanism of ⁶⁷Ga localization in malignant disease*. Nuclear medicine and biology, 1996. **23**(6): p. 745-751.
25. Atkins, P.W. and L. Jones, *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. 2006: Médica Panamericana.
26. Boukhalfa, H. and A.L. Crumbliss, *Chemical aspects of siderophore mediated iron transport*. BioMetals, 2002. **15**(4): p. 325-339.
27. Gielen, M. and E. Tiekink, *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine*. 2005.

28. Dixon, S.J. and B.R. Stockwell, *The role of iron and reactive oxygen species in cell death*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(1): p. 9-17.
29. Ulanova, M., et al., *The Common Vaccine Adjuvant Aluminum Hydroxide Up-Regulates Accessory Properties of Human Monocytes via an Interleukin-4-Dependent Mechanism*. Infection and Immunity, 2001. **69**(2): p. 1151-1159.
30. Baylor, N.W., W. Egan, and P. Richman, *Aluminum salts in vaccines—US perspective*. Vaccine, 2002. **20, Supplement 3**: p. S18-S23.
31. Rivera, E., A. Daggfeldt, and S. Hu, *Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and Erysipelothrix rhusiopathiae*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003. **91**(1): p. 19-27.
32. Tarnawski, A., et al., *Are antacids acid neutralisers only? Histologic, ultrastructural and functional changes in normal gastric mucosa induced by antacids*. Gastroenterology, 1984. **86**: p. 1276.
33. Kanra, G., et al., *Effect of aluminum adjuvants on safety and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b-CRM197 conjugate vaccine*. Pediatrics International, 2003. **45**(3): p. 314-318.
34. Naim, J.O., et al., *Mechanisms of adjuvancy: I--Metal oxides as adjuvants*. Vaccine, 1997. **15**(11): p. 1183-93.
35. Moret, B. and W. Kloppe, *Experimental and clinical evaluation of aluminum glycinate, a new intragastric buffer solution for achievement of prolonged physiological pH value*. Arztl Wochensh, 1955. **10**: p. 788-90.
36. Clark, T. and J. Hunt, *The laboratory assessment of aluminium glycinate in the treatment of peptic ulcer*. The Practitioner, 1958. **180**: p. 334-9.
37. Ramaholimihaso, F., et al., *Gastroprotective effect of an antacid coating agent in rats. Role of endogenous prostaglandins, capsaicin-sensitive afferents neurons and nitric oxide*. Gastroenterol Clin Biol, 1997. **21**(5): p. 370-6.
38. Tarnawski, A.S., et al., *Antacid talcid activates in gastric mucosa genes encoding for EGF and its receptor. The molecular basis for its ulcer healing action*. J Physiol Paris, 2000. **94**(2): p. 93-8.
39. Hart, M.M., et al., *Toxicity and Antitumor Activity of Gallium Nitrate and Periodically Related Metal Salts2*. Journal of the National Cancer Institute, 1971. **47**(5): p. 1121-1128.
40. Bockman, R., *The effects of gallium nitrate on bone resorption*. Semin Oncol, 2003. **30**(2 Suppl 5): p. 5-12.
41. Schlesinger, P., S. Teitelbaum, and H. Blair, *Osteoclast inhibition by Ga³⁺ contrasts with bisphosphonate metabolic suppression: competitive inhibition of H⁺ ATPase by bone-bound gallium*. J Bone Miner Res, 1991. **6**(suppl 1): p. S127.
42. Newman, R.A., A.R. Brody, and I.H. Krakoff, *Gallium nitrate (NSC-15200) induced toxicity in the rat. A pharmacologic, histopathologic and microanalytical investigation*. Cancer, 1979. **44**(5): p. 1728-1740.
43. Carpentier, Y., et al., *Effect of gallium at two phases of the CA 755 tumour growth*. Anticancer Res, 1987. **7**: p. 745-748.
44. Collery, P., et al., *Experimental treatment of mammary carcinomas by gallium chloride after oral administration: intratumor dosages of gallium, anatomopathologic study and intracellular microanalysis*. Trace Elem Med, 1984. **1**: p. 159-161.
45. Collery, P., et al., *Magnesium alterations and pharmacokinetic data in gallium-treated lung cancer patients*. Magnesium, 1988. **8**(1): p. 56-64.
46. Collery, P., et al., *Oral administration of gallium in conjunction with platinum in lung cancer treatment*. Metal Ions in Biology and Medicine. Collery P, Poirier LA, Manfait M, Etienne JC (eds.). John Libbey Eurotext, Paris, 1990. **1**: p. 437-442.
47. Collery, P., J.L. Domingo, and B.K. Keppler, *Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III)*. Anticancer research, 1996. **16**(2): p. 687-691.
48. Bernstein, L.R., et al., *Chemistry and Pharmacokinetics of Gallium Maltolate, a Compound With High Oral Gallium Bioavailability*. Metal-Based Drugs, 2000. **7**(1): p. 33-47.
49. Varma, A. and S.B. Chincholkar, *Microbial siderophores*. Vol. 12. 2007: Springer Science & Business Media.

50. Hider, R.C. and X. Kong, *Chemistry and biology of siderophores*. Natural product reports, 2010. **27**(5): p. 637-657.
51. Juárez-Hernández, R.E., P.A. Miller, and M.J. Miller, *Syntheses of Siderophore–Drug Conjugates Using a Convergent Thiol–Maleimide System*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2012. **3**(10): p. 799-803.
52. Diarra, M., et al., *Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1996. **40**(11): p. 2610-2617.
53. Ding, P., C.E. Schous, and M.J. Miller, *Design and synthesis of a novel protected mixed ligand siderophore*. Tetrahedron letters, 2008. **49**(14): p. 2306-2310.
54. Müller, G. and K.N. Raymond, *Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in Streptomyces pilosus*. Journal of Bacteriology, 1984. **160**(1): p. 304-312.
55. Kraemer, H.-J. and H. Breithaupt, *Quantification of desferrioxamine, ferrioxamine and aluminioxamine by post-column derivatization high-performance liquid chromatography: Non-linear calibration resulting from second-order reaction kinetics*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **710**(1–2): p. 191-204.
56. Kalinowski, D. and D.R. Richardson, *The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(4): p. 547-583.
57. Aouad, F., et al., *Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential*. Inorg. Chim. Acta, 2002. **339**: p. 470.
58. Olivieri, N.F. and G.M. Brittenham, *Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia*. Blood, 1997. **89**(3): p. 739-761.
59. Blatt, J. and S. Stitely, *Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines*. Cancer Research, 1987. **47**(7): p. 1749-1750.
60. Sharma, R.N. and S. Pancholi, *Oral iron chelators: A new avenue for the management of thalassemia major*. J. Curr. Pharm. Res, 2010. **1**: p. 1-7.
61. Simionato, A.V.C., M.D. Cantú, and E. Carrilho, *Characterization of metal-deferoxamine complexes by continuous variation method: A new approach using capillary zone electrophoresis*. Microchemical Journal, 2006. **82**(2): p. 214-219.
62. Domagal-Goldman, S.D., et al., *Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex-Electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009. **73**(1): p. 1-12.
63. Pastrana Alta, E.C., *Derivados da cafeína como moderadores do estresse oxidativo provocado por sobrecarga de ferro*, in *Departamento de Química Fundamental*. 2014, Universidade de São Paulo. p. 120.
64. Kolayli, S., et al., *Does caffeine bind to metal ions?* Food Chemistry, 2004. **84**(3): p. 383–388.
65. Cao, C., et al., *Caffeine suppresses β -amyloid levels in plasma and brain of Alzheimer's transgenic mice*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2009. **17**(3): p. 681-697.
66. Weiss, N., et al., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(4): p. 842-857.
67. Chevon, M., *Protection Against Free Radical-Induced and Transition Metal-Mediated Damage: The Use of "Pull" and "Push" Mechanisms*. Free Radical Research Communications, 1991. **13**(1): p. 691-696.
68. Miller, M.J. and F. Malouin, *Microbial iron chelators as drug delivery agents: the rational design and synthesis of siderophore-drug conjugates*. Accounts of Chemical Research, 1993. **26**(5): p. 241-249.
69. Roosenberg II, J.M., et al., *Studies and Syntheses of Siderophores*. Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**: p. 159-197.
70. Budzikiewicz, H., *Siderophore-antibiotic conjugates used as trojan horses against Pseudomonas aeruginosa*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001. **1**(1): p. 73-82.
71. Huang, Y., et al., *Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: Smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(10): p. 1299-1315.
72. Górska, A., A. Sloderbach, and M.P. Marszall, *Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy*. Trends in Pharmacological Sciences, 2014: p. 1-8.

73. Karck, M., et al., *The push-and-pull mechanism to scavenge redox-active transition metals: A novel concept in myocardial protection*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2001. **121**(6): p. 1169-1178.
74. Mattos, A.L.C., et al., *Desferrioxamine-cadmium as a 'Trojan horse' for the delivery of Cd to bacteria and fungi*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2013. **27**(2): p. 103-108.
75. Olsson-Francis, K. and C.S. Cockell, *Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments*. Journal of microbiological methods, 2010. **80**(1): p. 1-13.
76. Trail, D., E.B. Watson, and N.D. Tailby, *The oxidation state of Hadean magmas and implications for early Earth's atmosphere*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 79-82.
77. Jardim, W.F. and A.P. Chagas, *A Química Ambiental e a hipótese Gaia: uma nova visão sobre a vida na Terra*. Química Nova, 1992. **15**(1): p. 73-76.
78. Baym, M., et al., *Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes*. Science, 2016. **353**(6304): p. 1147-1151.
79. Emery, T., *Hydroxamic acids of natural origin*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1971. **35**: p. 135-85.
80. Ratledge, C. and L.G. Dover, *Iron Metabolism in pathogenic bacteria*. Annual Review of Microbiology, 2000. **54**: p. 881-941.
81. Banin, E., M.L. Vasil, and E.P. Greenberg, *Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(31): p. 11076-11081.
82. Poole, K. and G.A. McKay, *Iron acquisition and its control in Pseudomonas aeruginosa: Many roads lead to Rome*. Frontiers in Bioscience, 2003. **8**: p. D661-D686.
83. Sebulsky, M.T. and D.E. Heinrichs, *Identification and characterization of fhuD1 and fhuD2, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2001. **183**(17): p. 4994-5000.
84. Sebulsky, M.T., et al., *Identification and Characterization of a Membrane Permease Involved in Iron-Hydroxamate Transport in Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(16): p. 4394-4400.
85. Ismail, A., G.W. Bedell, and D.M. Lupan, *Siderophore production by the pathogenic yeast, Candida albicans*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1985. **130**(2): p. 885-891.
86. Morgon, N.H., *Computação em química teórica: informações técnicas*. Química Nova, 2001. **24**: p. 676-682.
87. Jorgensen, W.L., *The many roles of computation in drug discovery*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1813-8.
88. Morgon, N. and K. Coutinho, *Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular*. 2007: Editora Livraria da Física.
89. Poornima, C.S. and P.M. Dean, *Hydration in drug design. 3. Conserved water molecules at the ligand-binding sites of homologous proteins*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1995. **9**(6): p. 521-531.
90. Kuntz, I.D., *Structure-based strategies for drug design and discovery*. Science, 1992. **257**(5073): p. 1078-82.
91. Itzstein, M., et al., *Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 418-23.
92. Alta, E.C.P., et al., *Desferrioxamine-caffeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload*. BioMetals, 2014. **27**(6): p. 1351-1360.
93. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, *Brock biology of microorganisms*. Vol. 514. 1997: prentice hall Upper Saddle River, NJ.
94. Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg, *Microbiology: Concepts and Applications*. 1993: McGraw-Hill.
95. Neubig, R.R., et al., *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(4): p. 597-606.
96. Reyna Pinedo, V.M., *Compendio de Química Orgánica I*. 2008: Universidad Nacional de Ingeniería.

97. Zlatkov, A.B., et al., *Synthesis, Stability and Computational Study of some Ester Derivatives of Theophylline-7-acetic Acid with Antiproliferative Activity*. Der Pharma Chemica, 2010. **2**(6): p. 197-210.
98. Myers, A.G., B.H. Yang, and H. Chen, *Transformation of Pseudoephedrine Amides into Highly Enantiomerically Enriched Aldehydes, Alcohols, and Ketones*. Organic Syntheses, 2000: p. 29-29.
99. Dinç, E. and F. Onur, *Application of a new spectrophotometric method for the analysis of a ternary mixture containing metamizol, paracetamol and caffeine in tablets*. Analytica Chimica Acta, 1998. **359**(1-2): p. 93-106.
100. Salas, J.M., et al., *Metal complexes of theophylline-7-acetic acid. Crystal structure of a nickel(II) compound containing non-coordinated theophylline-7-acetate ion*. Polyhedron, 1995. **14**(5): p. 611-616.
101. Ibrahim, M. and E. Koglin, *Vibrational spectroscopic study of acetate group*. Acta Chimica Slovenica, 2004. **51**(3): p. 453-460.
102. Mikulski, C.M., et al., *Xanthine complexes with 3d metal perchlorates*. Inorganica chimica acta, 1986. **123**(1): p. 27-33.
103. Borgias, B., A.D. Hugi, and K.N. Raymond, *Isomerization and solution structures of desferrioxamine B complexes of Al^{3+} and Ga^{3+}* . Inorganic Chemistry, 1989. **23**(18): p. 3538-3545.
104. Neilands, J.B., *Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(45): p. 26723-26726.
105. Dhungana, S., P.S. White, and A.L. Crumbliss, *Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition*. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2001. **6**(8): p. 810-818.
106. Fernandes, K.H.A.A., et al., *Considerações técnicas quanto ao uso da voltametria de varredura escalonada em processos adsorptivos*. Química Nova, 2015. **38**: p. 431-435.
107. Bockris, J.O.M. and A.K. Reddy, *Modern Electrochemistry 2B: Electrodicts in Chemistry, Engineering, Biology and Environmental Science*. Vol. 2. 2001: Springer Science & Business Media.
108. Oliver, T.R. and W.A. Waters, *The Mechanism of Oxidation of Hydroxamic Acids by Alkaline Ferricyanide*. Journal of the Chemical Society B: Physical Organic, 1971(1): p. 677-681.
109. Espósito, B.P., et al., *A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids*. Analytical biochemistry, 2002. **304**: p. 1-18.
110. Thomas, F., et al., *Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13375-83.
111. Zuki, H.M., *Spectrofluorometric Determination of the Stoichiometric and Formation Constant of 8-Hydroxyquinoline Complexes with Aluminium, Cadmium, Magnesium, and Zinc in Aqueous Solution*. Ultra Chemistry, 2012. **8**(3): p. 377-385.
112. Enyedy, É.A., et al., *Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2012. **117**: p. 189-197.
113. Aguilar Vitorino, H., *Compostos de ferro de interesse farmacológico: Avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil*, in *Departamento de Química Fundamental*. 2015, Universidade de São Paulo. p. 196.
114. Helm, L. and A.E. Merbach, *Inorganic and bioinorganic solvent exchange mechanisms*. Chemical Reviews, 2005. **105**(6): p. 1923-1959.
115. Espósito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2670-2677.
116. Braymer, J.J. and D.P. Giedroc, *Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens*. Current Opinion in Chemical Biology, 2014. **19**: p. 59-66.
117. Kamruzzaman, M., et al., *Spectroscopic study of the interaction between adenosine disodium triphosphate and gatifloxacin- Al^{3+} complex and its analytical application*. Luminescence, 2015. **30**(7): p. 1077-1082.
118. Balado Dacosta, M., *Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en Vibrio anguillarum*, in *Departamento de Microbiología y Parasitología*. 2009, Universidad Santiago de Compostela. p. 239.

119. Ferguson, A.D., et al., *Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA*. Protein Science, 2000. **9**(5): p. 956-963.
120. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem, 2010. **31**(2): p. 455-61.
121. Kaneko, Y., et al., *The transition metal gallium disrupts Pseudomonas aeruginosa iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117**(4): p. 877-888.
122. Macdonald, T.L. and R. Bruce Martin, *Aluminum ion in biological systems*. Trends in Biochemical Sciences. **13**(1): p. 15-19.
123. Banin, E., et al., *The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-Pseudomonas therapeutic agent*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(43): p. 16761-16766.
124. Greenberg, E.P., et al., *Metallo-desferrioxamine complexes and their use in the treatment of bacterial infections*. 2014, Google Patents.
125. Bradley, T. and M. Parker, *Binding of aluminium ions by Staphylococcus aureus 893*. Experientia, 1968. **24**(11): p. 1175-1176.
126. Reniere, M.L., V.J. Torres, and E.P. Skaar, *Intracellular metalloporphyrin metabolism in Staphylococcus aureus*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 333-45.

8. Anexos

8.1. Mecanismos propostos para os espectros de massa.

8.1.1 Al(dfo)

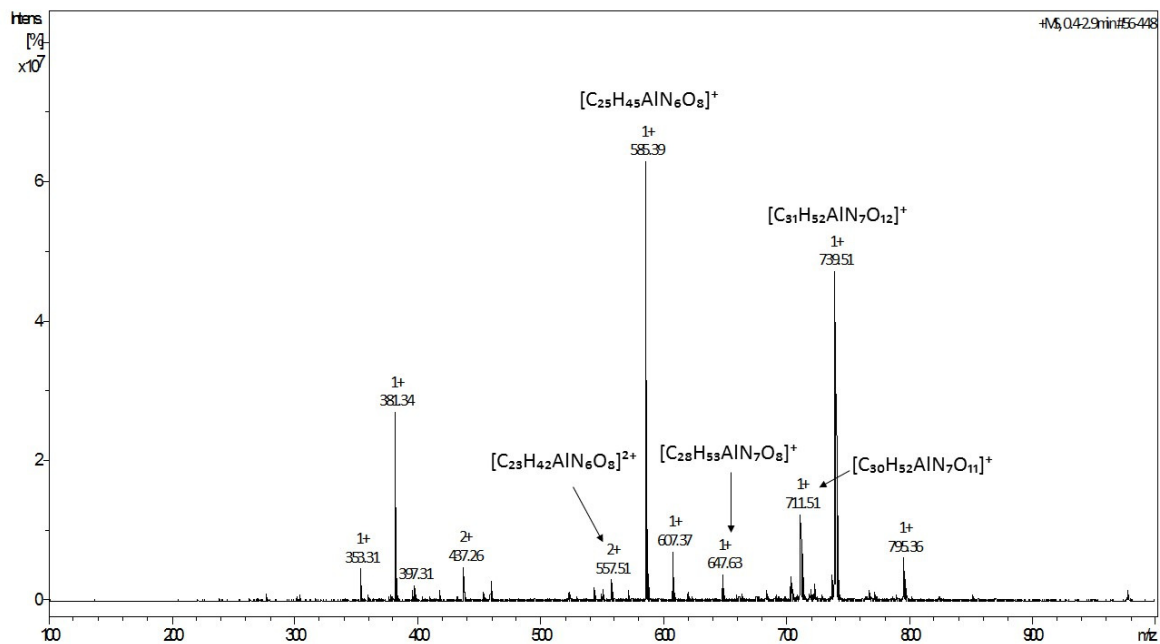
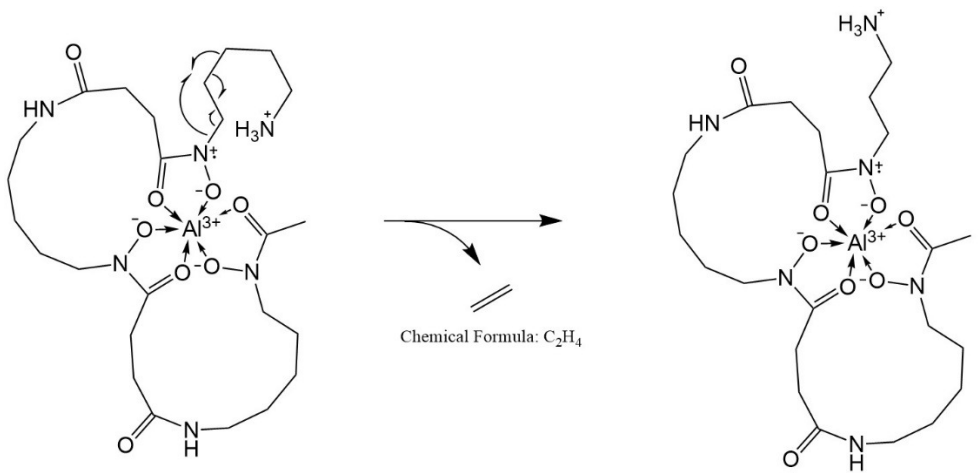


Figura 36. Espectro de massas de Al(dfo).

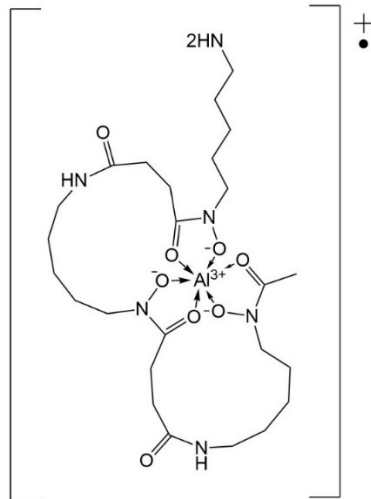
558 m/z



Chemical Formula: C₂₅H₄₆AlN₆O₈^{•2+}
 Molecular Weight: 585,66

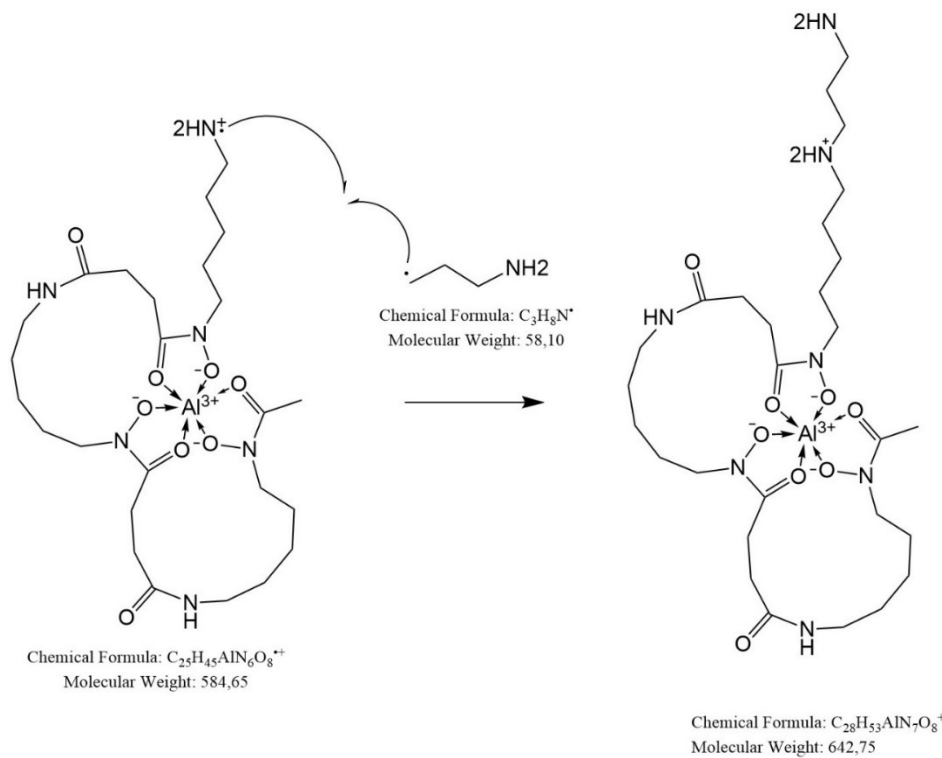
Chemical Formula: C₂₃H₄₂AlN₆O₈^{•2+}
 Molecular Weight: 557,60

585 m/z

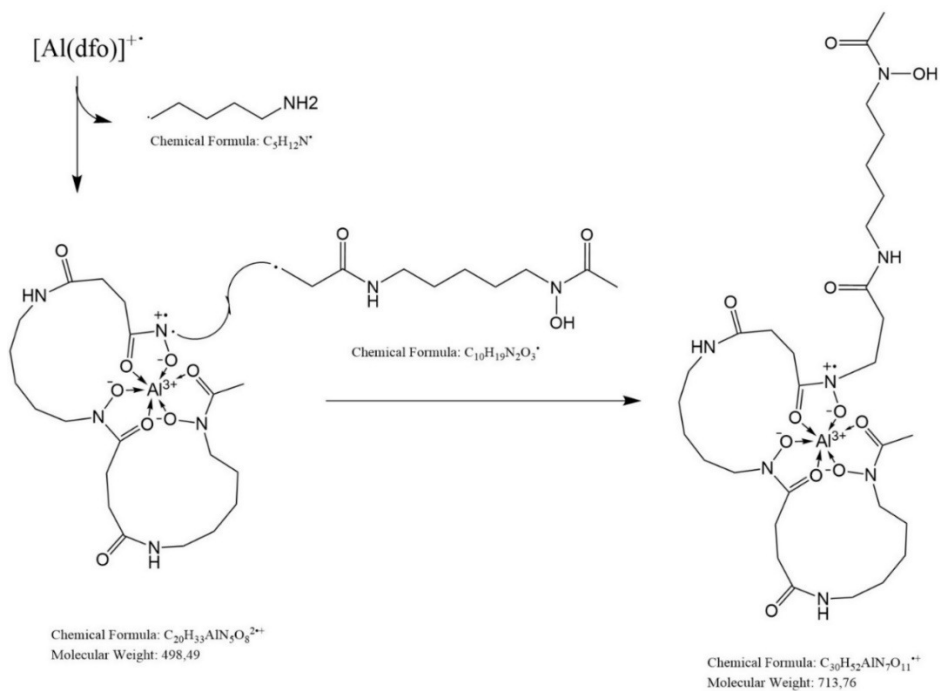


Chemical Formula: C₂₂H₄₅AlN₆O₈
 Molecular Weight: 584,65

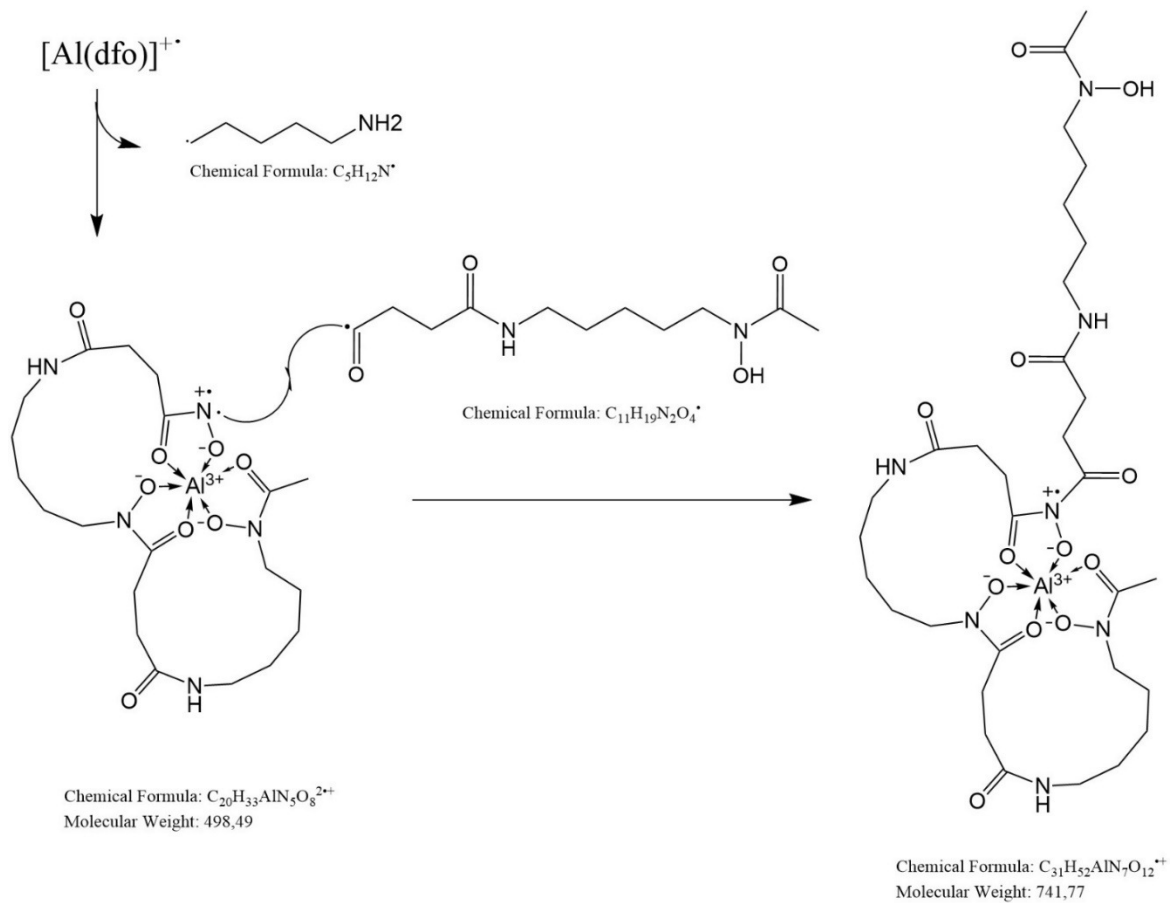
648 m/z



713 m/z



741 m/z



8.1.2. Ga(dfo)

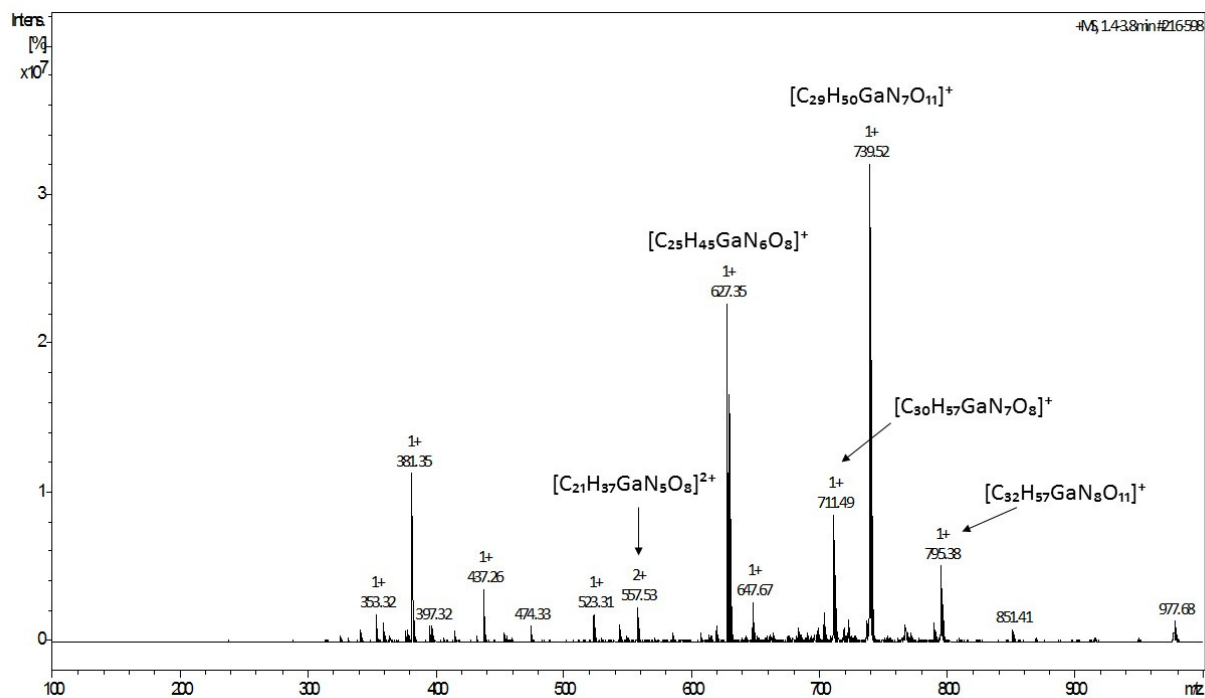
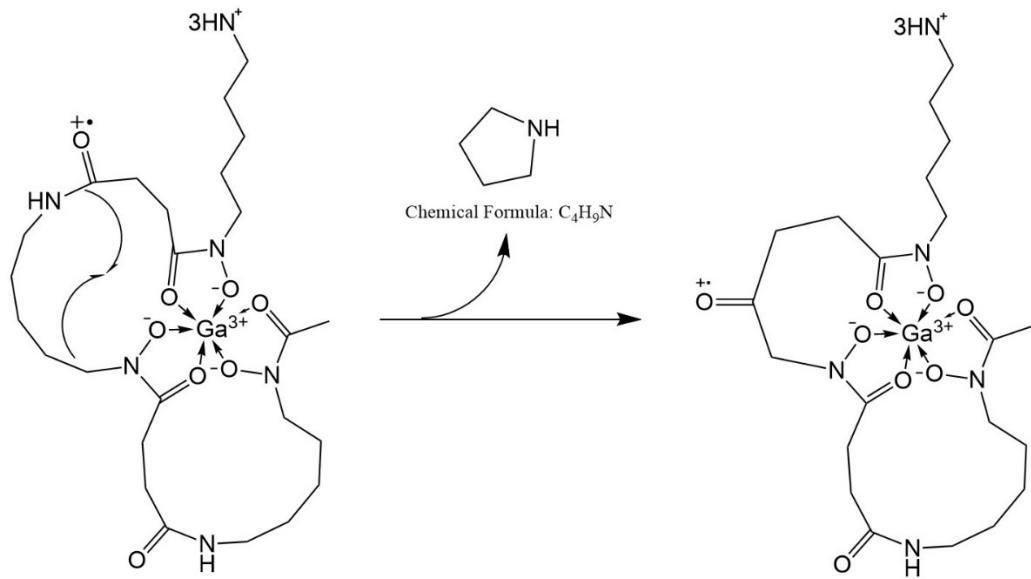


Figura 37. Espectro de massas de Ga(dfo).

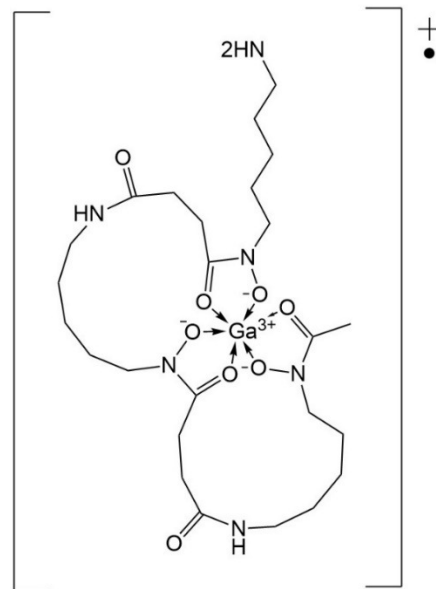
557 m/z



Chemical Formula: $C_{25}H_{46}GaN_6O_8^{+2+}$
Molecular Weight: 628,40

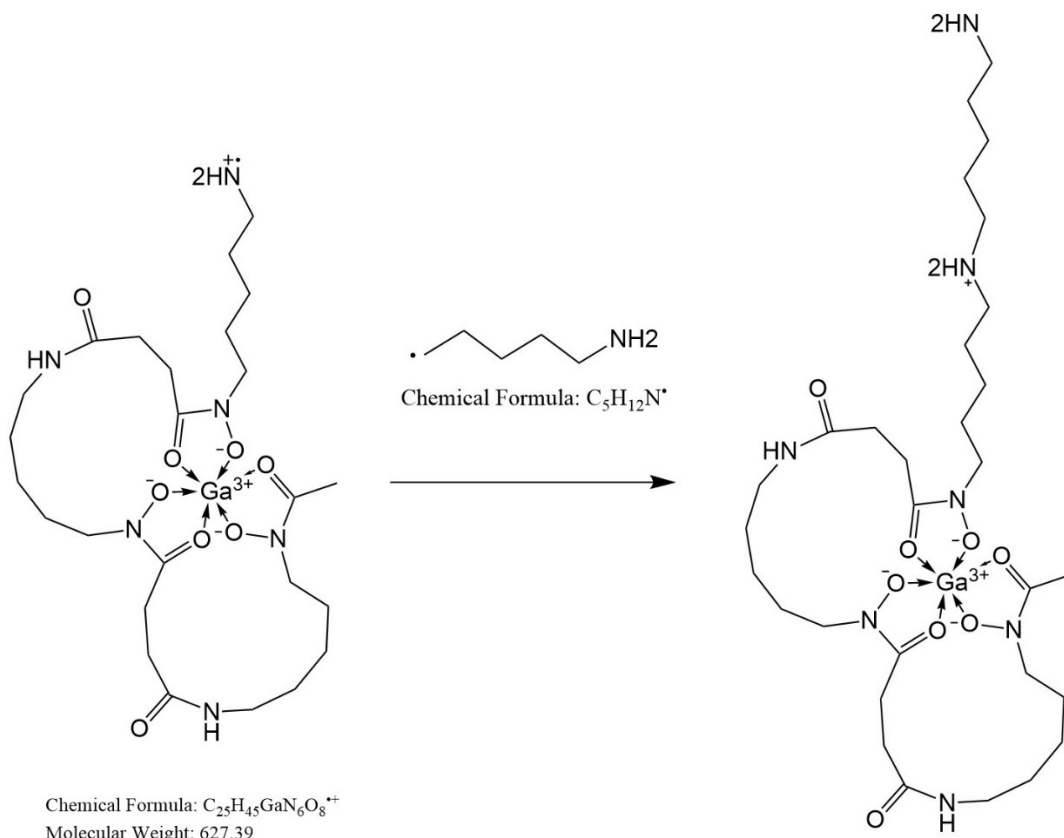
Chemical Formula: $C_{21}H_{37}GaN_5O_8^{+2+}$
Molecular Weight: 557,28

627 m/z

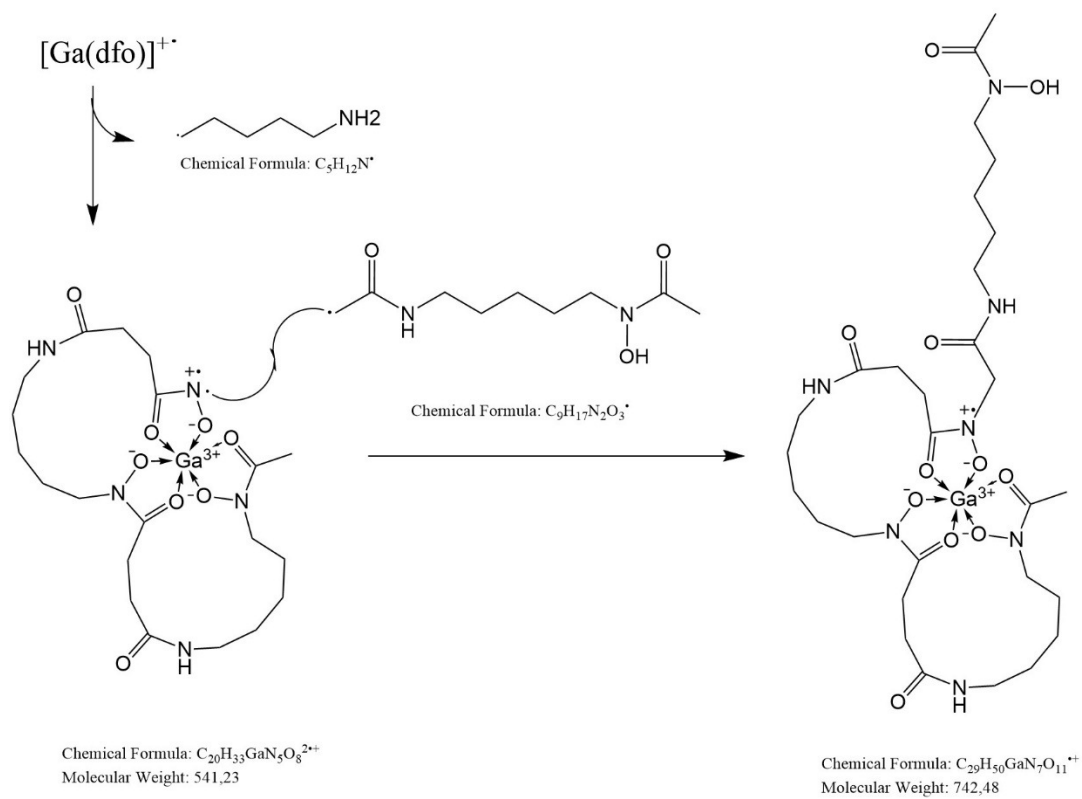


Chemical Formula: $C_{25}H_{45}GaN_6O_8$
Molecular Weight: 627,39

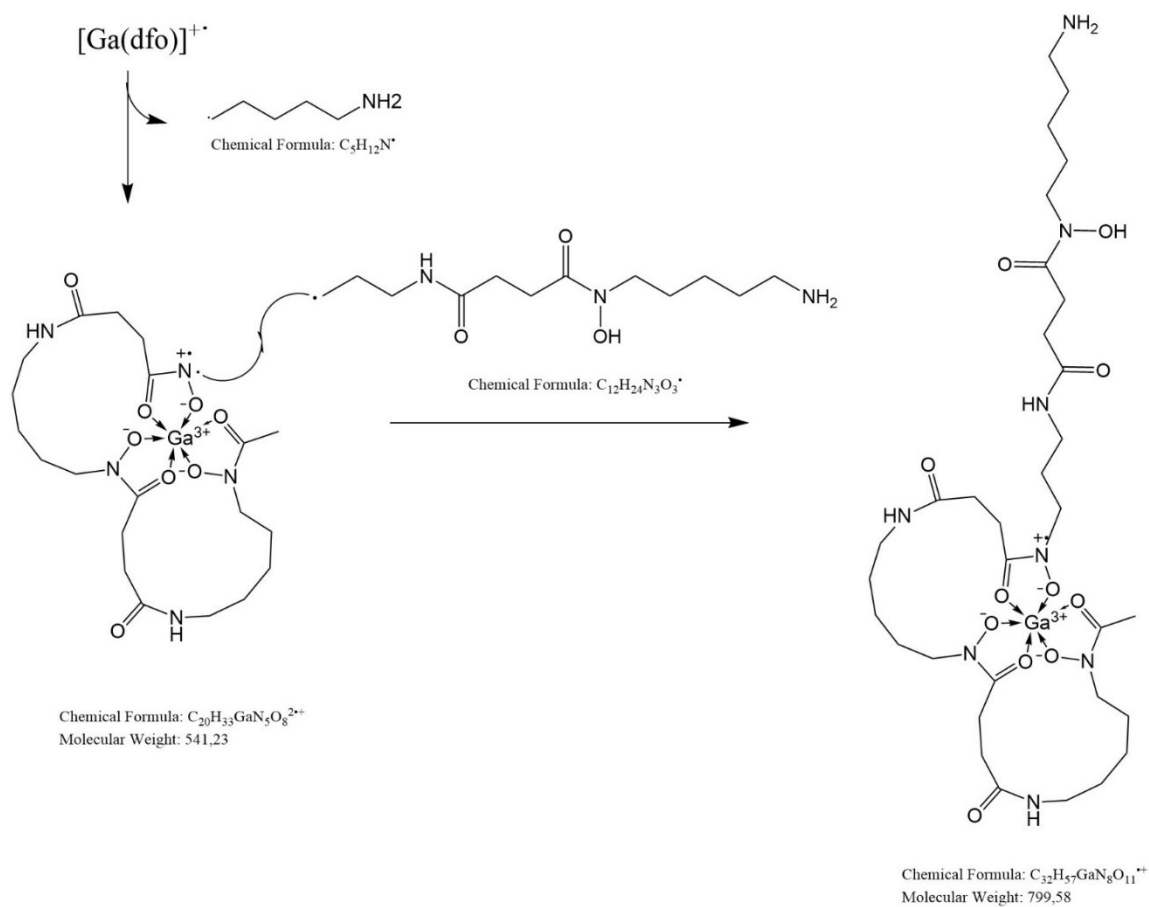
713 m/z



742 m/z



795 m/z



8.1.3. dfcaf

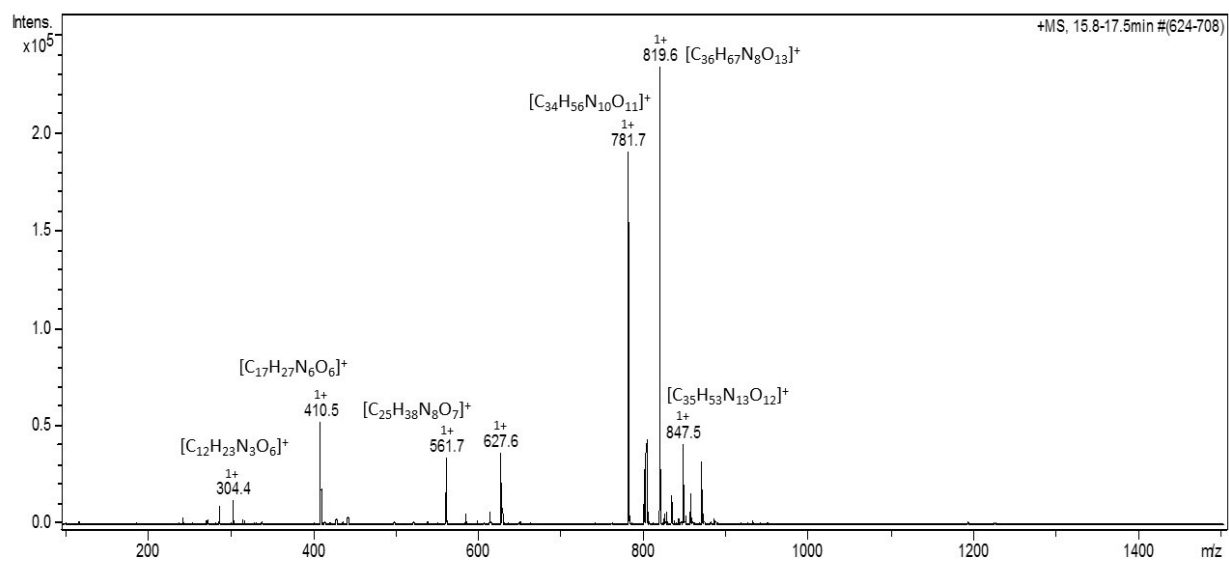
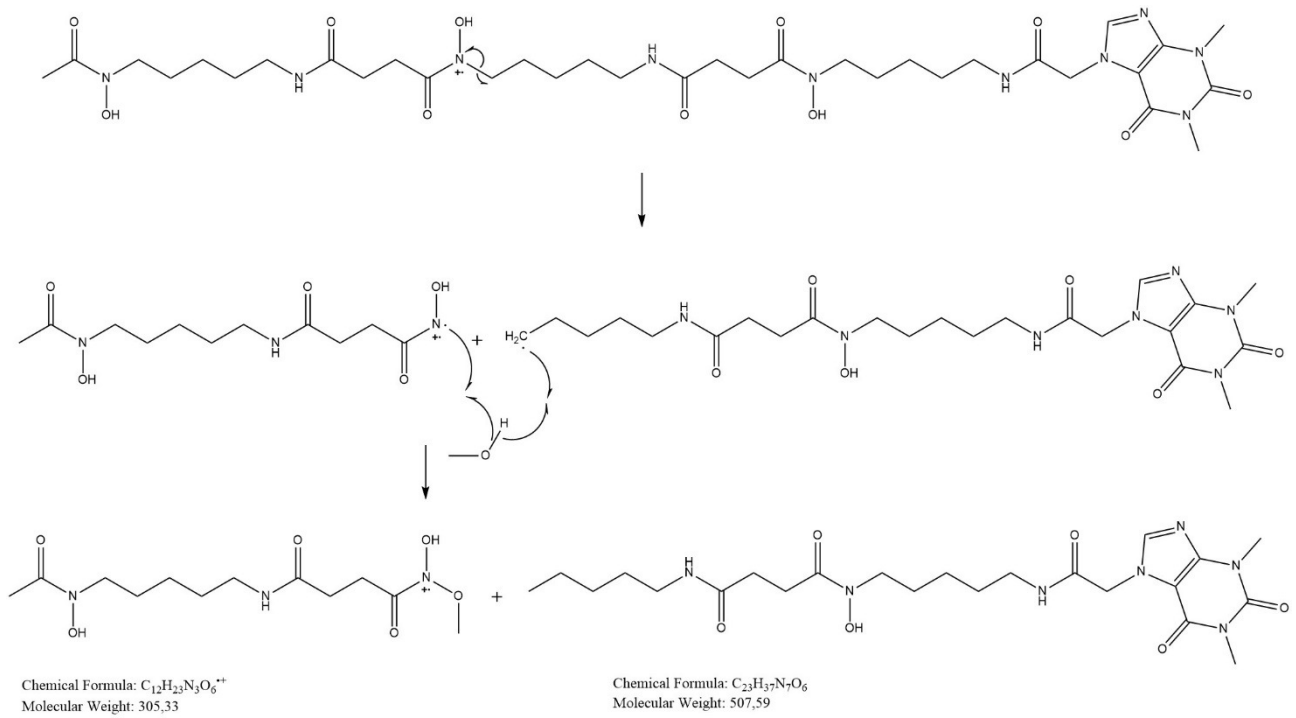
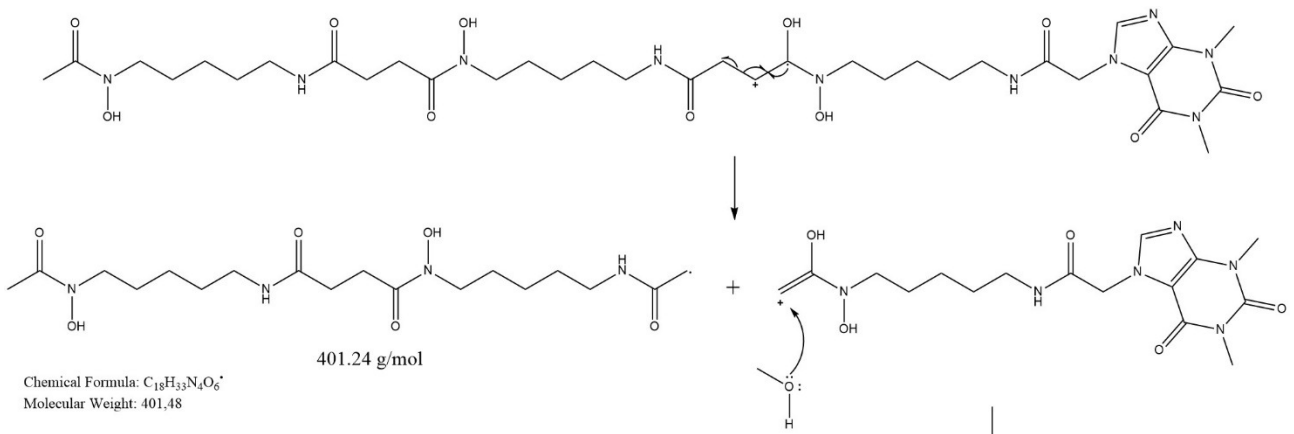


Figura 38. Espectro de massas de Dfcaf.

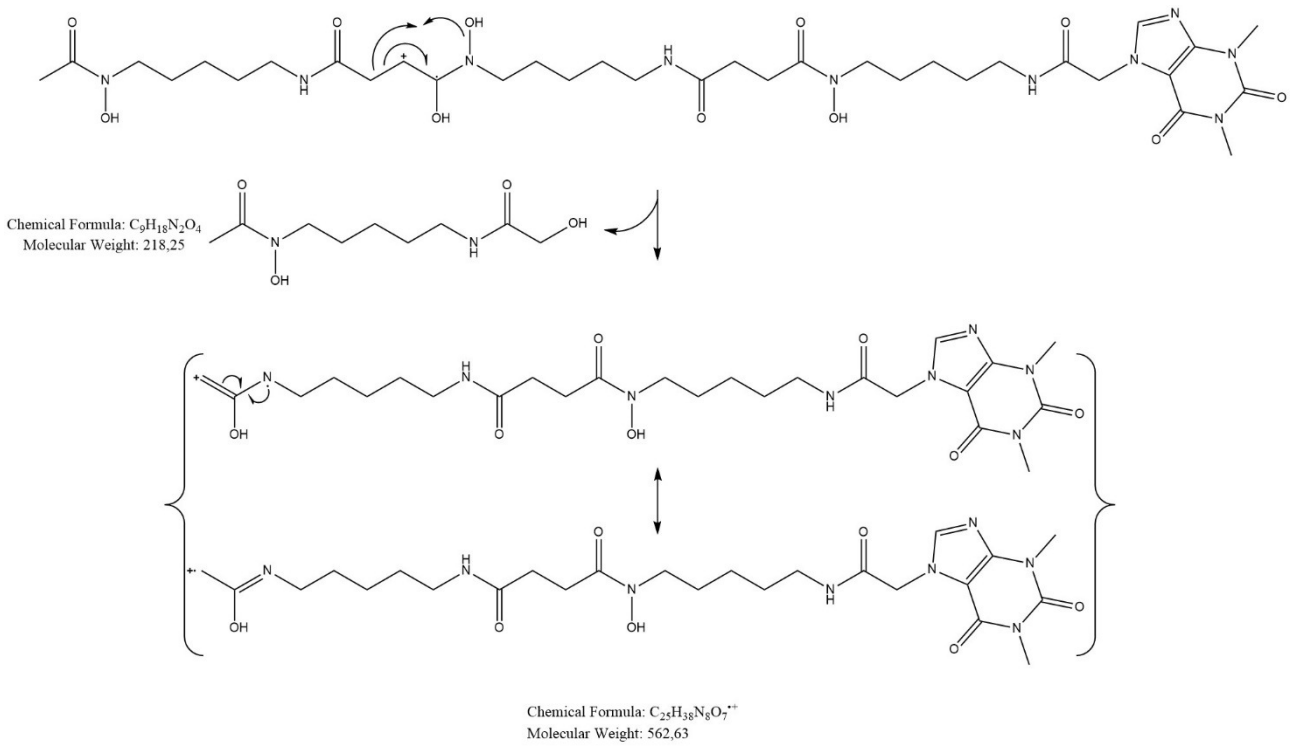
304 m/z



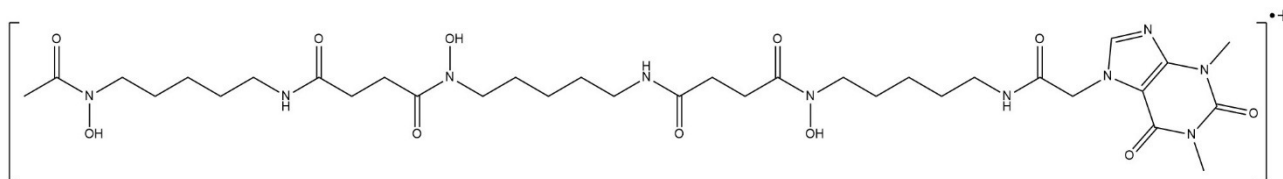
411 m/z



562 m/z

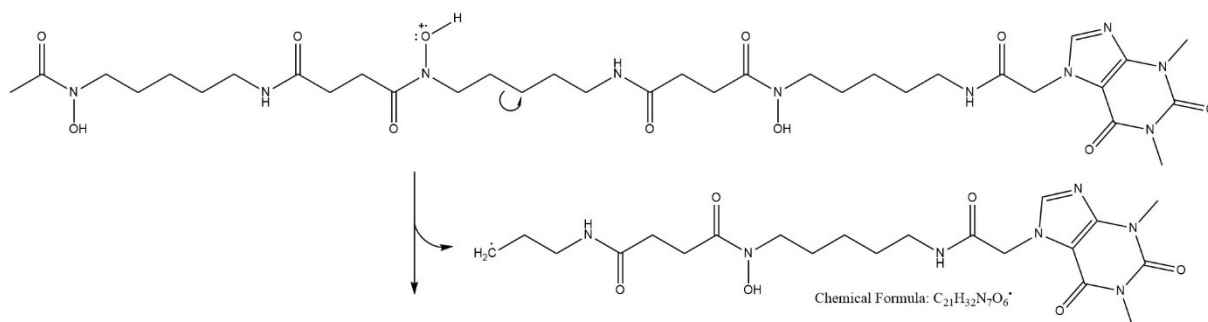


780 m/z

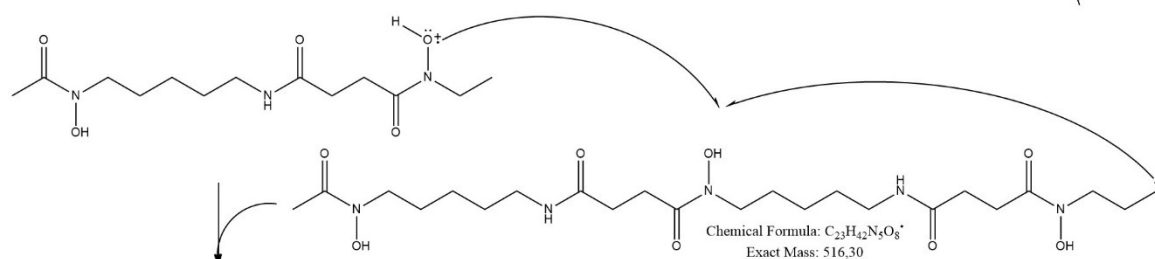


Chemical Formula: $C_{34}H_{46}N_{10}O_{11}^{2+}$
Molecular Weight: 780,88

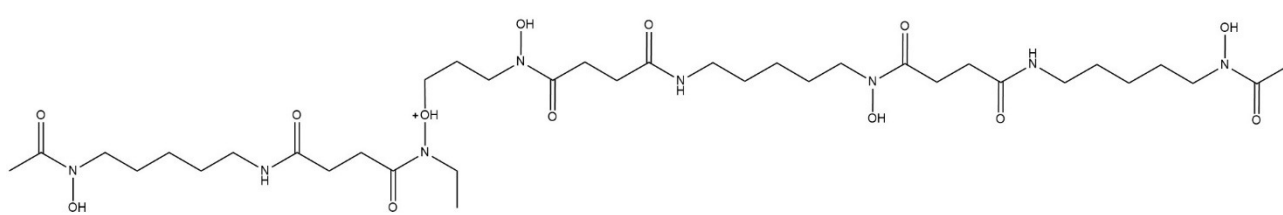
820 m/z



Chemical Formula: $C_{21}H_{32}N_7O_6^+$

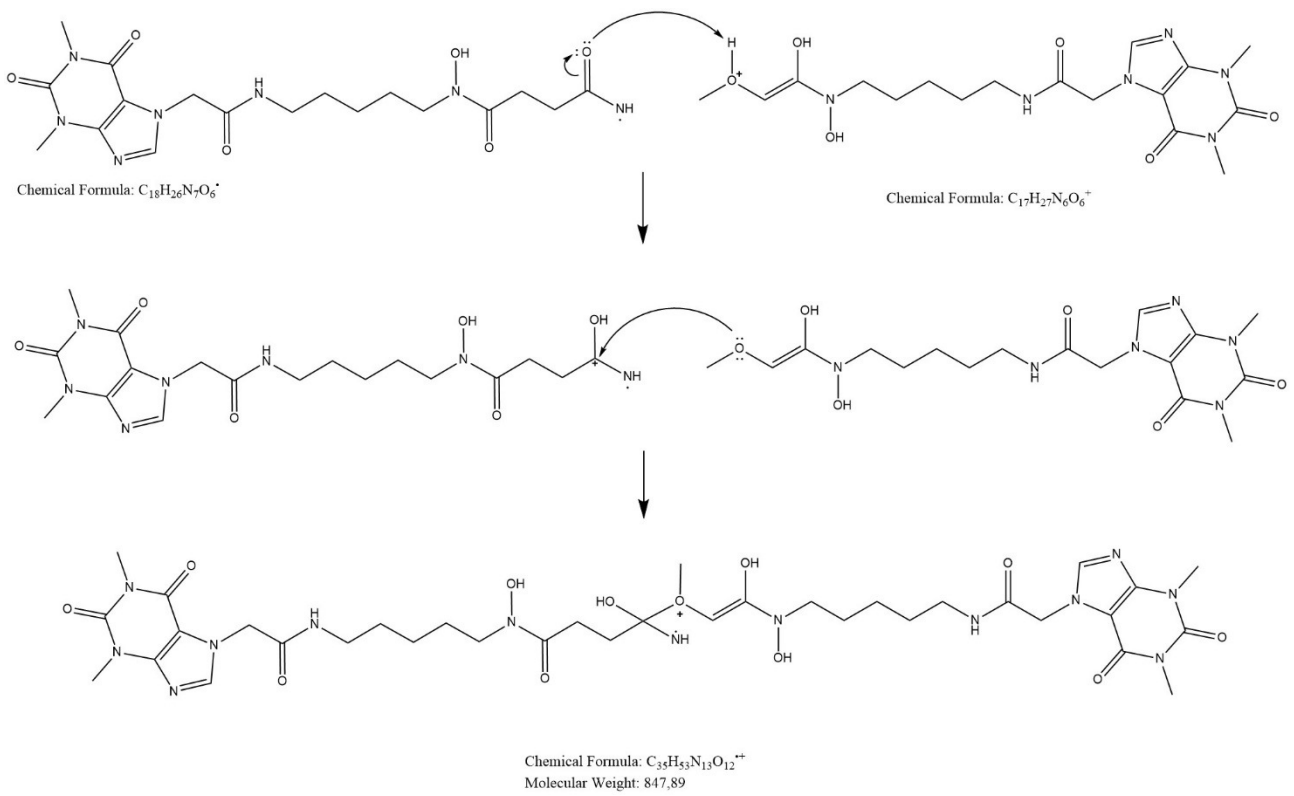


Chemical Formula: $C_{23}H_{42}N_5O_8^+$
Exact Mass: 516,30



Chemical Formula: $C_{36}H_{67}N_8O_{13}^+$
Molecular Weight: 819,97

848 m/z



8.1.4. Al(dfcaf)

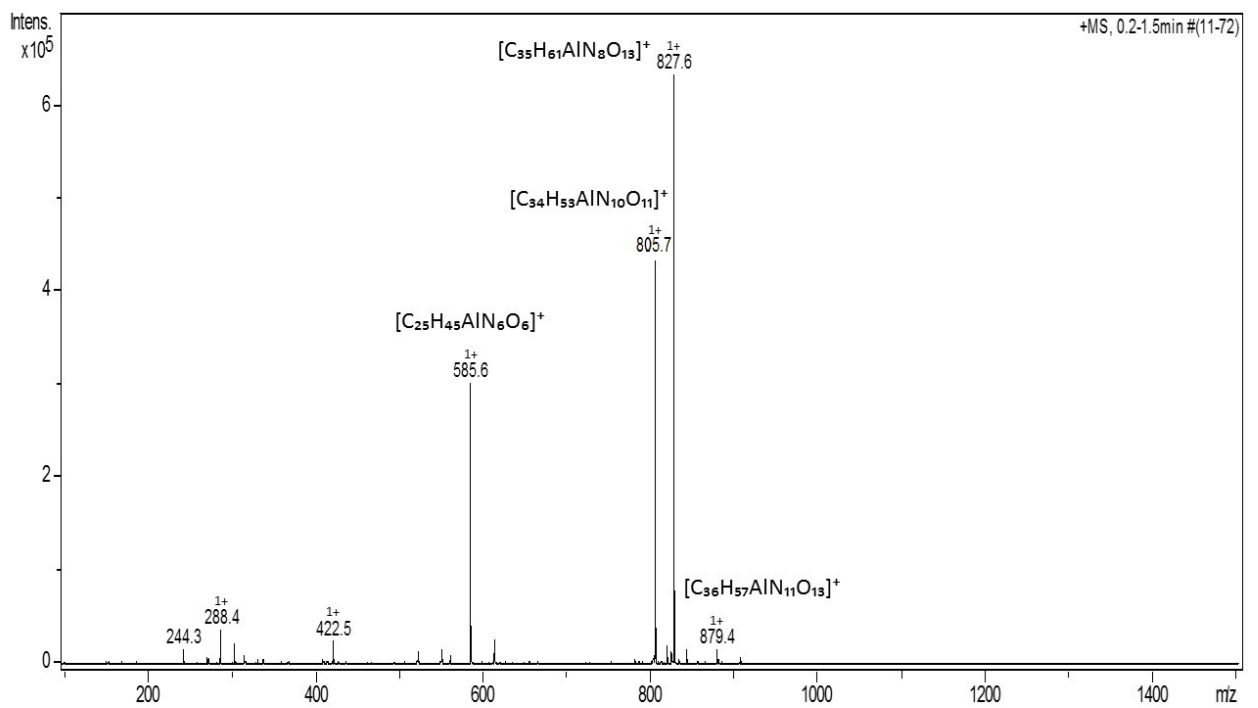
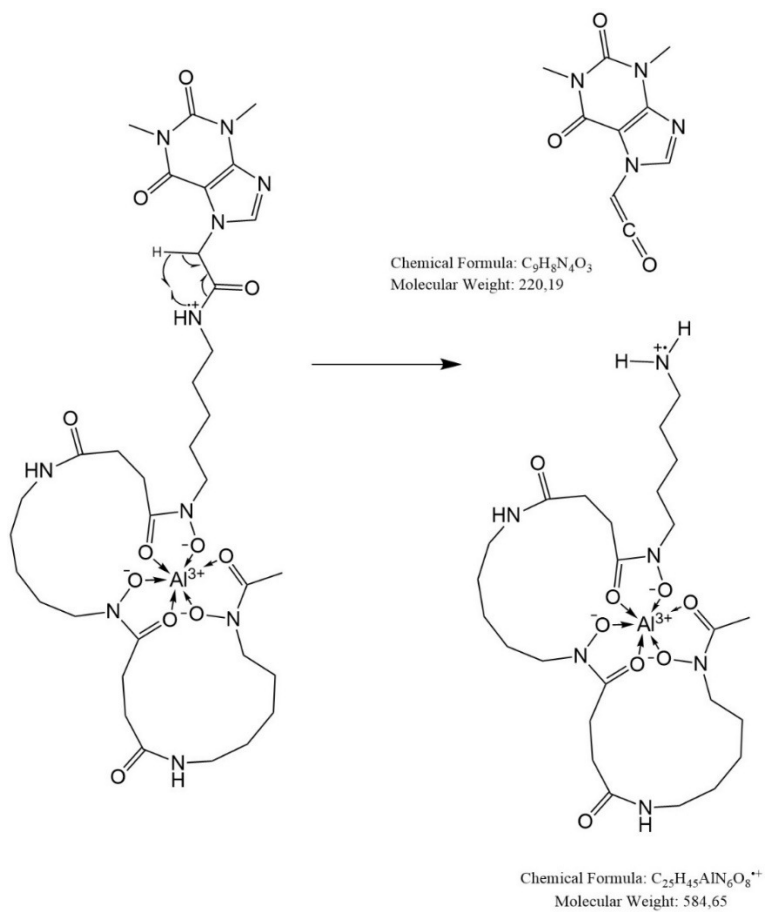
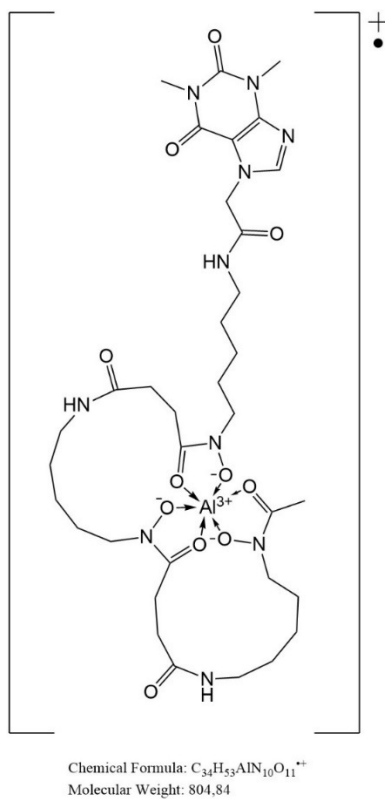


Figura 39. Espectro de massas de Al(dfcaf)

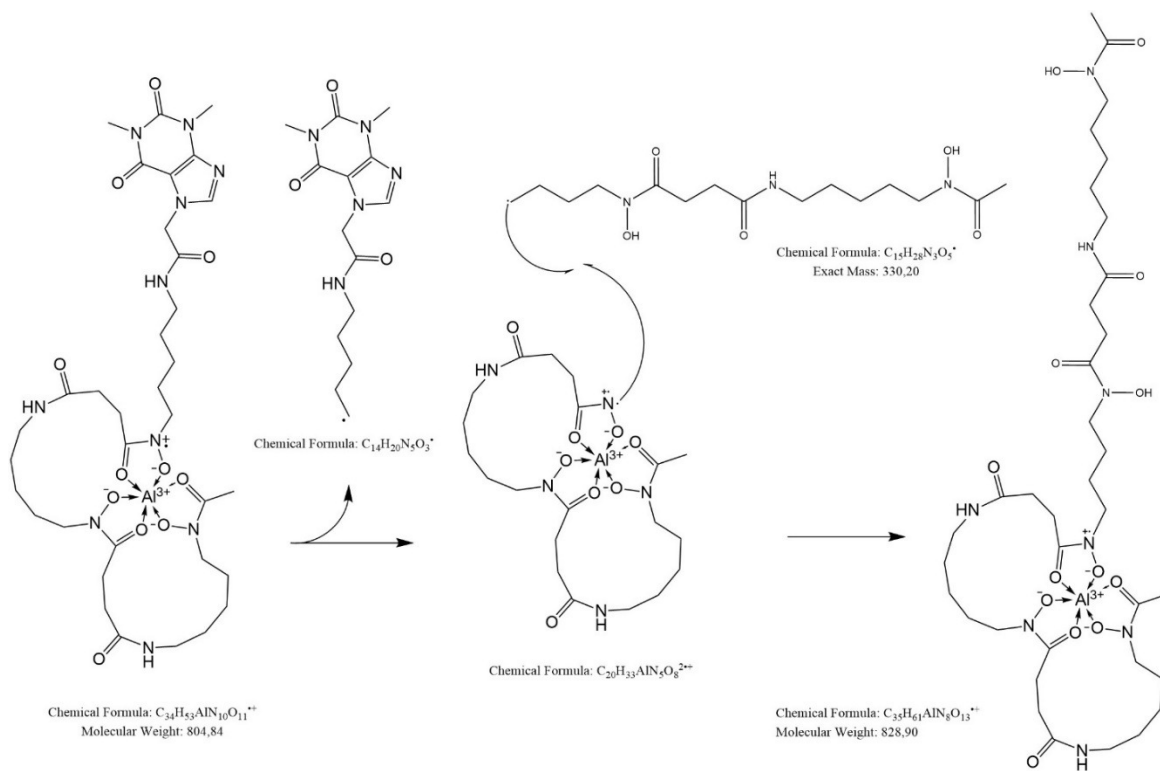
585 m/z



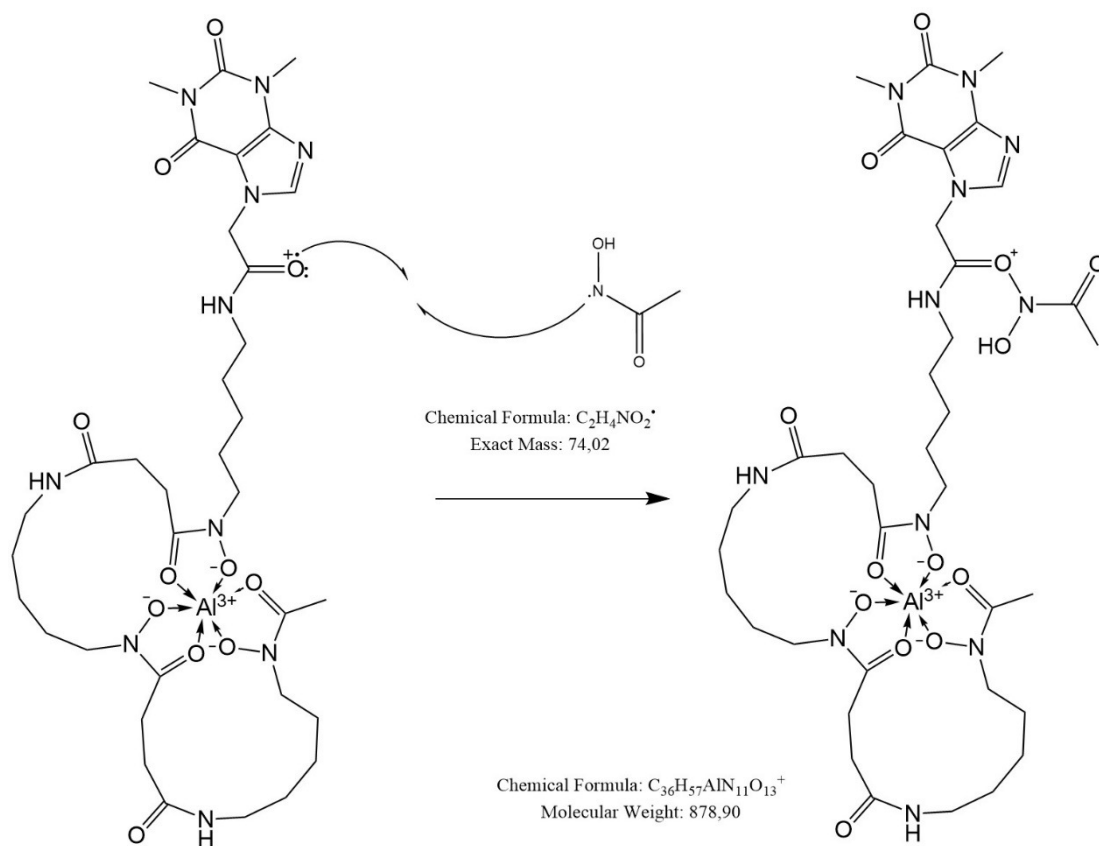
805 MM



828 m/z



878 m/z



8.1.5. Ga(dfcaf)

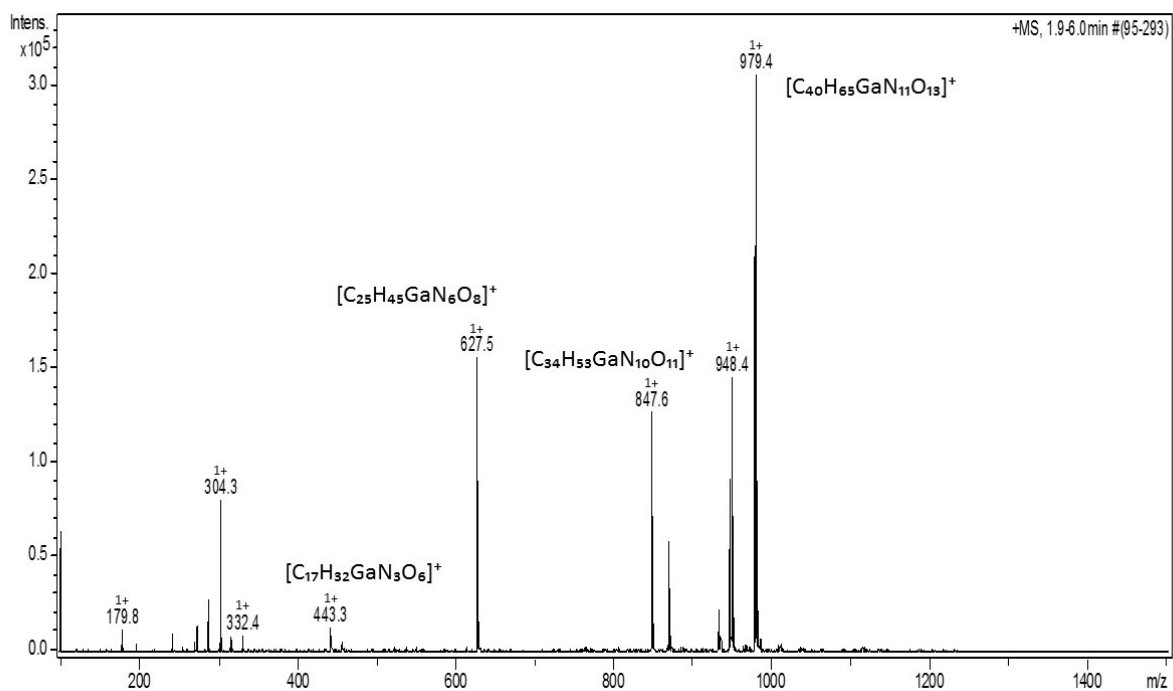
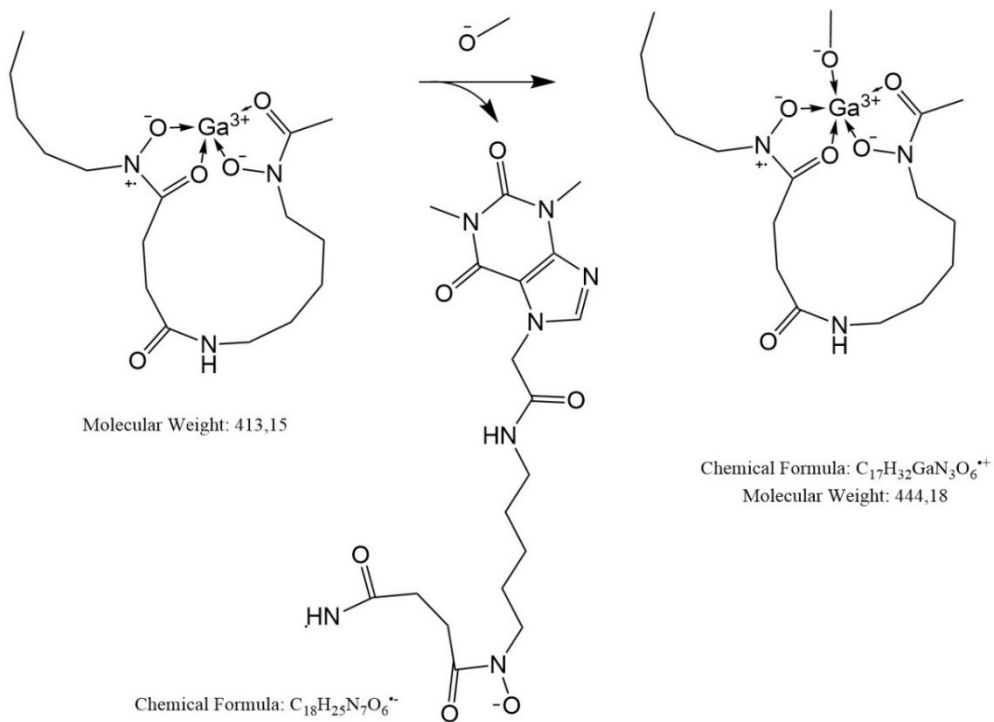
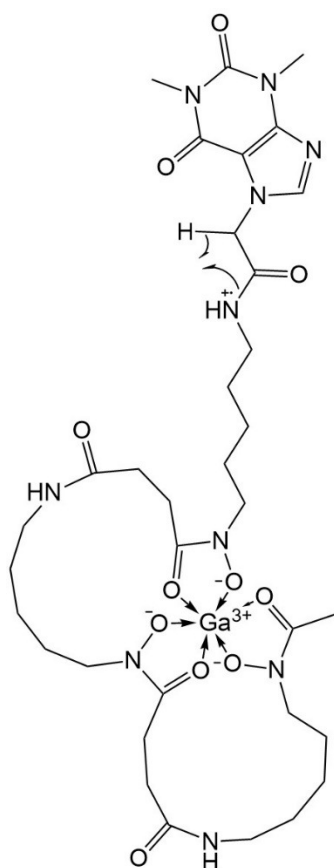


Figura 40. Espectro de massas de Ga(dfcaf)

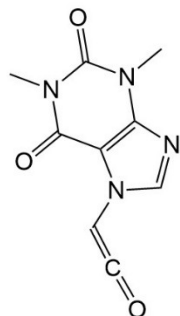
444 m/z



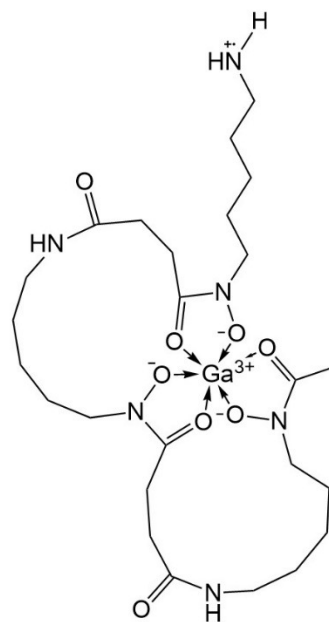
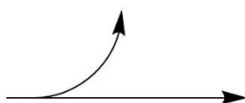
627 m/z



Chemical Formula: $C_{34}H_{53}GaN_{10}O_{11}^{++}$
 Molecular Weight: 847,58

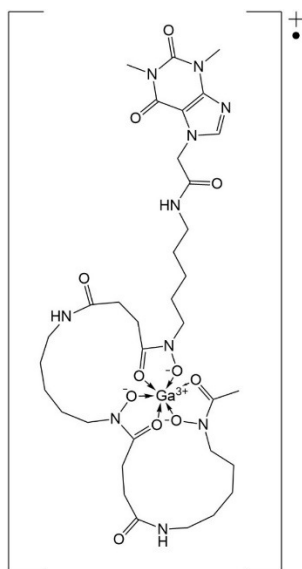


Chemical Formula: $C_9H_8N_4O_3$
 Exact Mass: 220,06



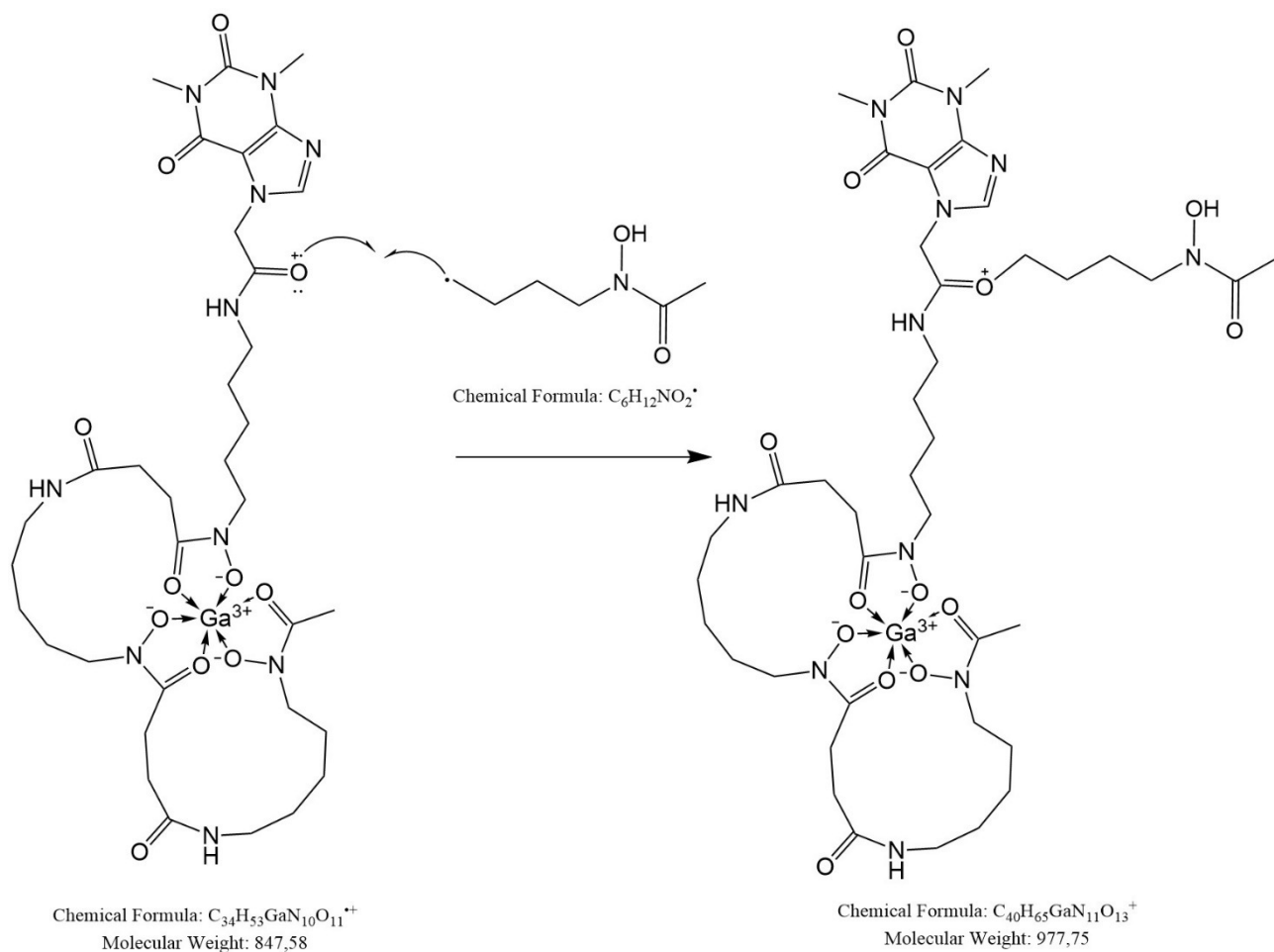
Chemical Formula: $C_{25}H_{45}GaN_6O_8^{+}$
 Molecular Weight: 627,39

848 m/z



Chemical Formula: $C_{34}H_{53}GaN_{10}O_{11}^{+•}$
 Molecular Weight: 847,58

978 m/z



8.2. Voltametria Cíclica

8.2.1. Cafeína em DMSO

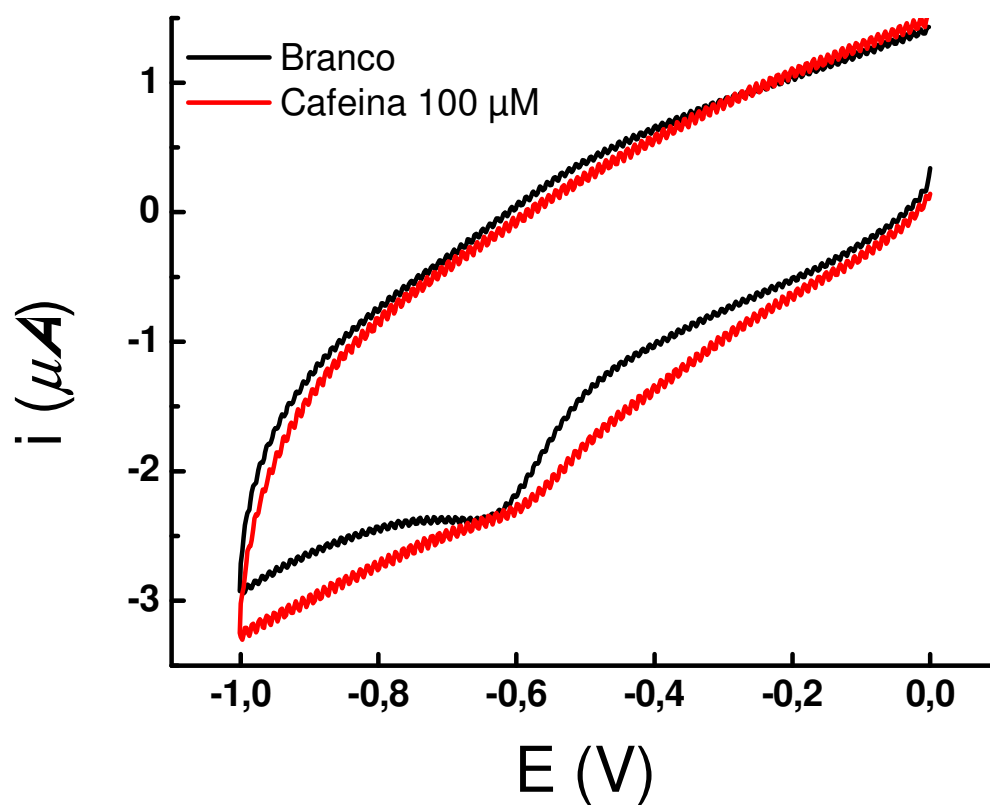


Figura 41. Voltametria cíclica d cafeína 100 μM (linha vermelha) em solução eletrolítica TTB 100 mM (linha preta). $E_i = +0.0$ V; $E_{\lambda 1} = -1.0$ V; $E_{\lambda 2} = 0.0$ V; $E_{final} = 0.0$ V and $\nu = 100$ mVs⁻¹

8.2.2. Al(dfcaf) e Ga(dfcaf)

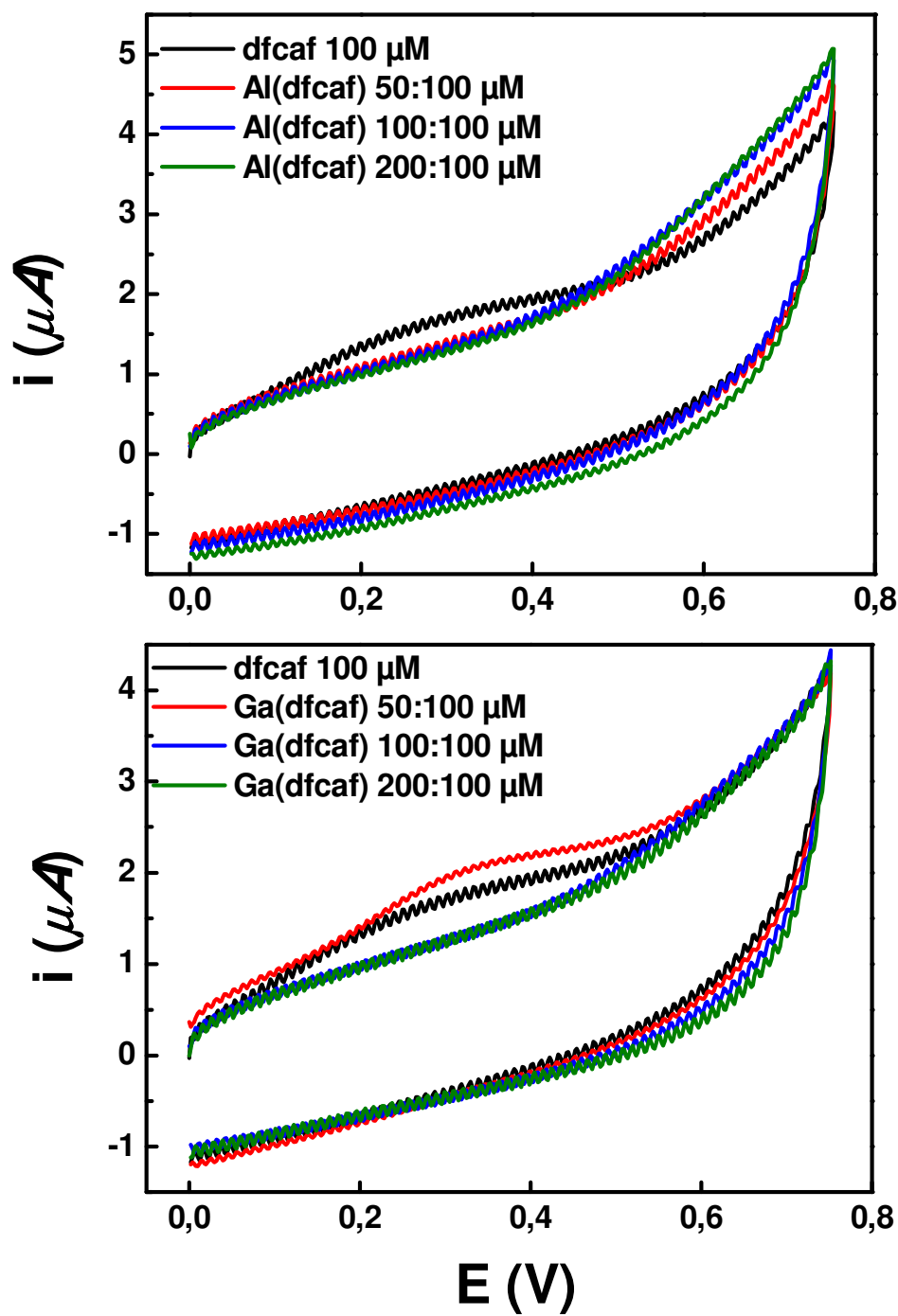


Figura 42. Voltametria cíclica de Al(dfcaf) e Ga(dfcaf) em solução eletrolítica TTB, para metal-ligante: 50-200 μM (linha vermelha), 100-100 μM (linha azul), 200-100 μM (linha verde) e dfcaf 100 μM (linha preta). $E_i = +0.0$ V; $E_{\lambda 1} = 0.0$ V; $E_{\lambda 2} = +0.75$ V; $E_{final} = 0.0$ V and $\nu = 100$ mVs^{-1}

8.3. $^1\text{H-NMR}$

8.3.1. Orbitais HOMO-LUMO em Al(dfo)

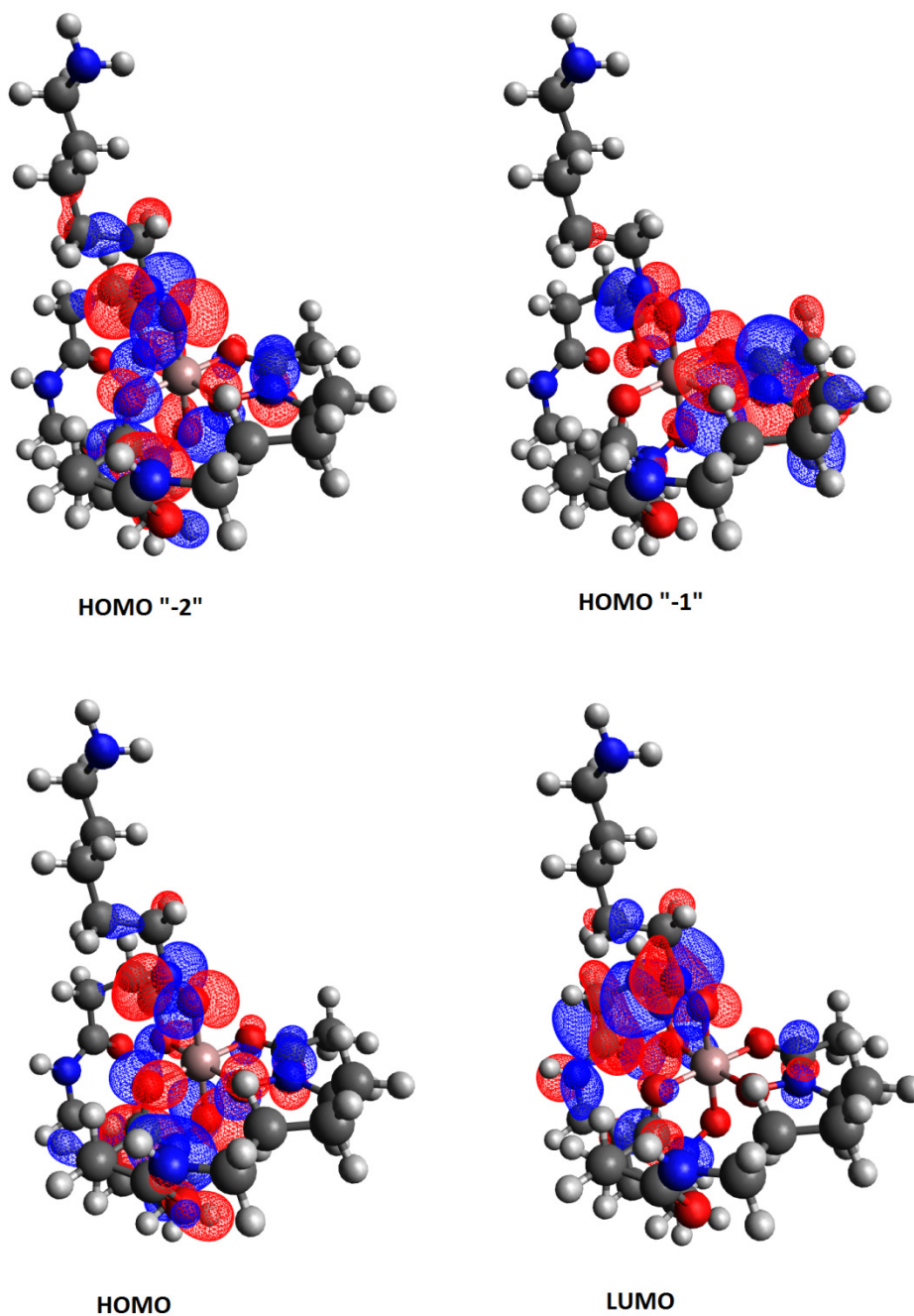


Figura 43. Orbitais HOMO e LUMO para Al(dfo). Input para Gaussian03[®] gerado com Avogadro[®]: #n B3LYP/6-31G(d) Opt SP Pop=Reg FormCheck.

8.3.2. Diagrama de especiação de Al(dfo)

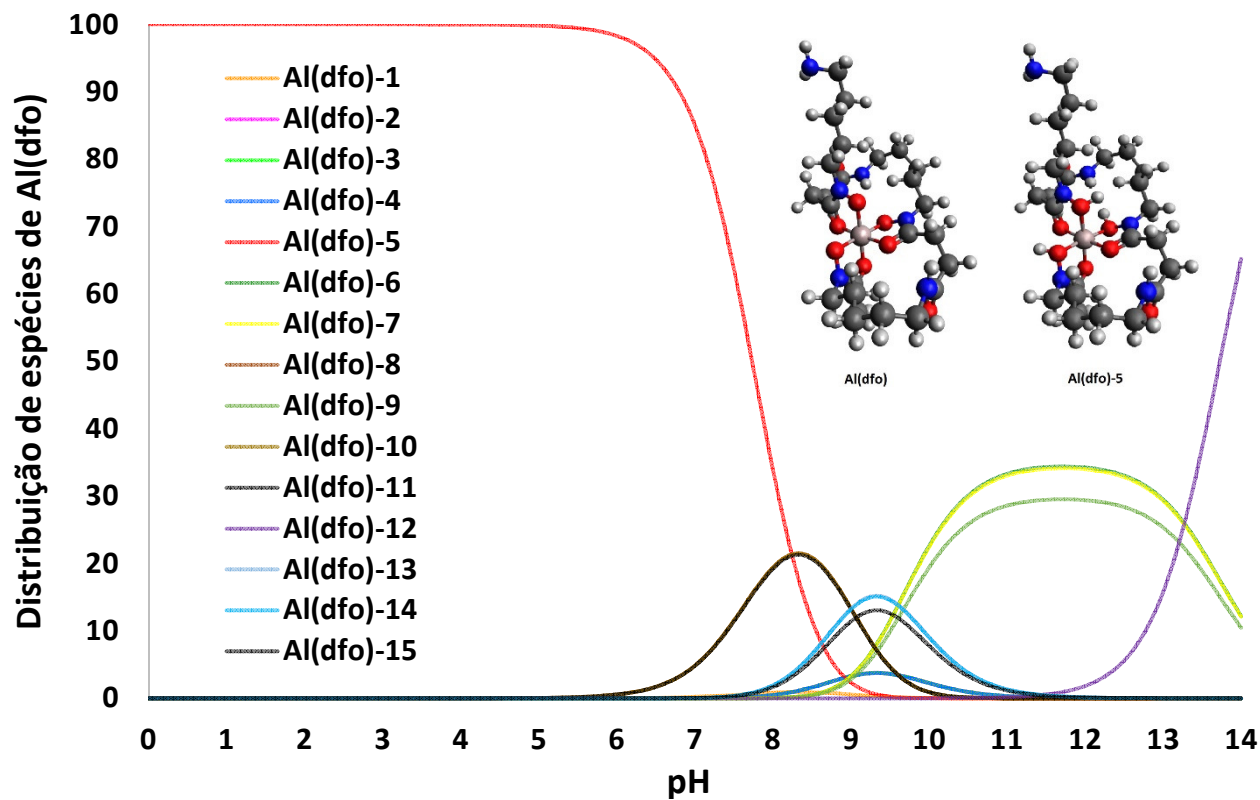


Figura 44. Diagrama da especiação de Al(dfo) a 25 °C, gerado com Marvin Sketch. As estruturas predominantes em pH neutro são apresentadas.

8.3.3. Distribuição de carga parcial no Al(dfo)

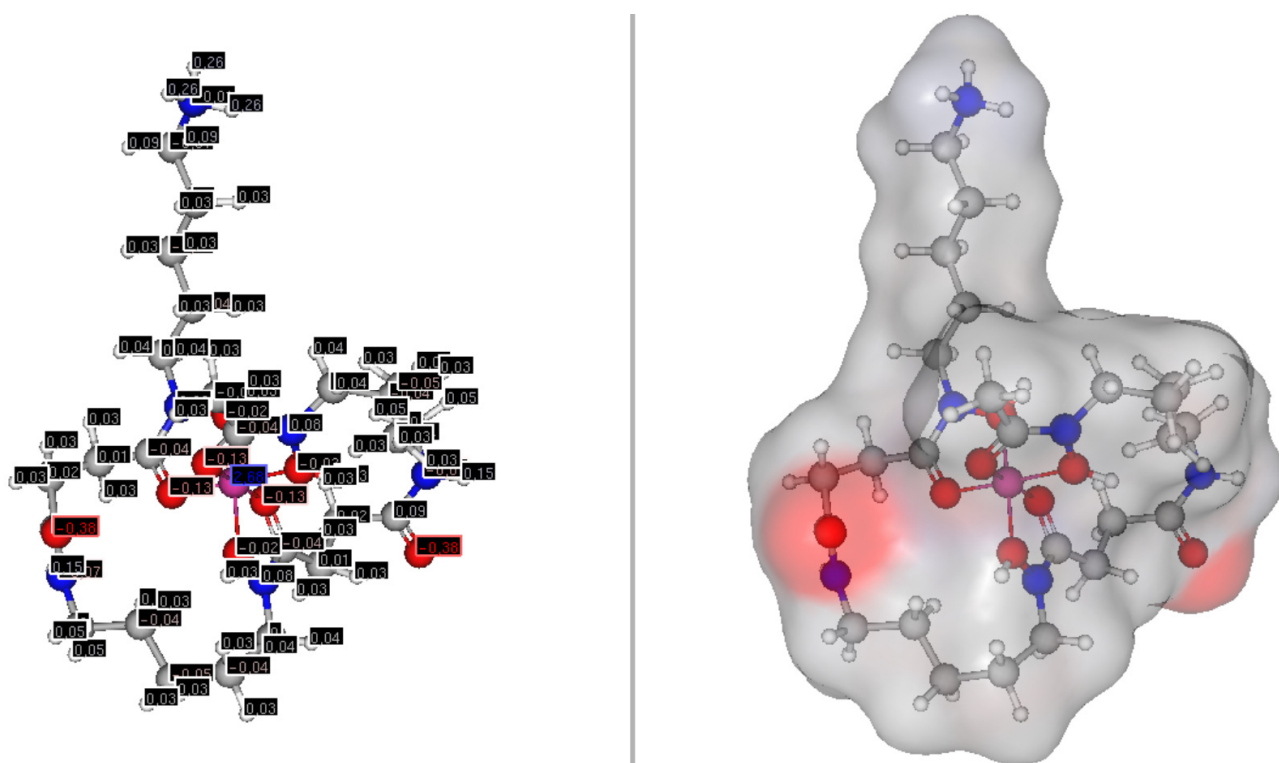
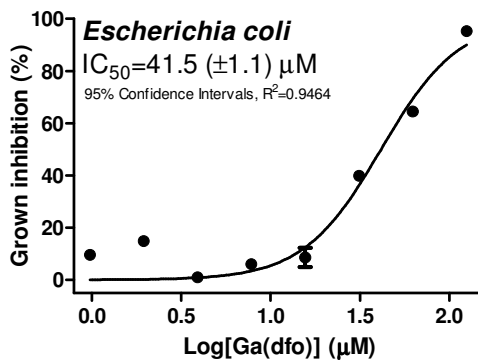
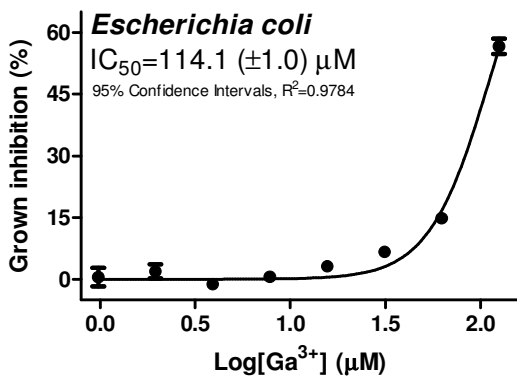
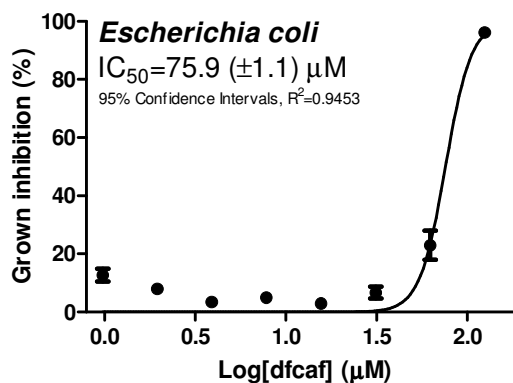
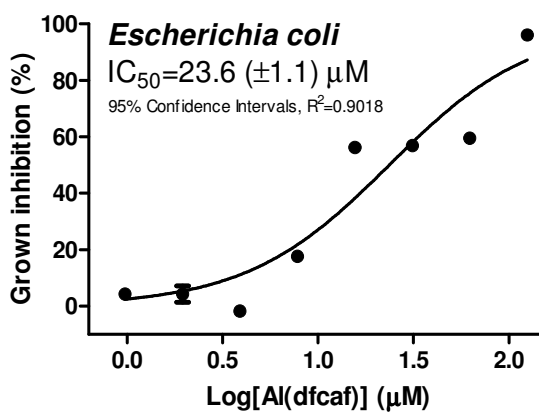
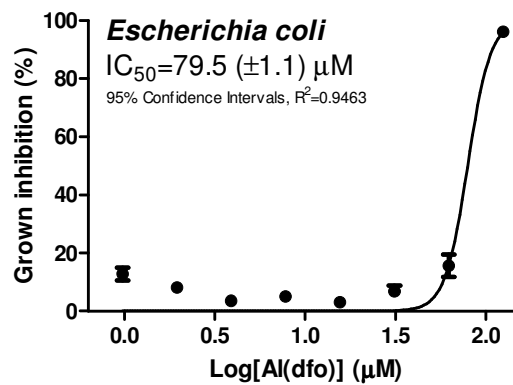
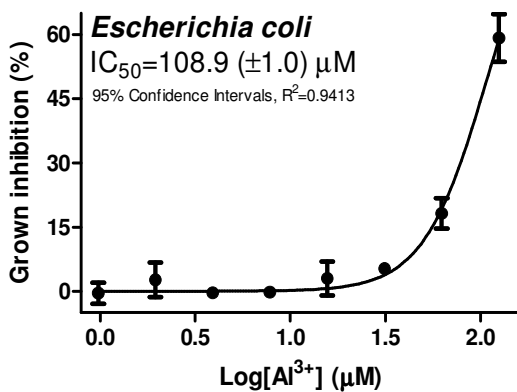


Figura 45. Distribuição da carga parcial positiva (azul), neutra (branco) e negativa (vermelho) de cada átomo em Al(dfo) em pH 7,4; estruturas otimizadas com *UFF* no programa Avogadro e tratadas no programa Marvin Sketch.

8.4. Curvas dose-resposta nos microrganismos.

8.4.1. *E. coli*



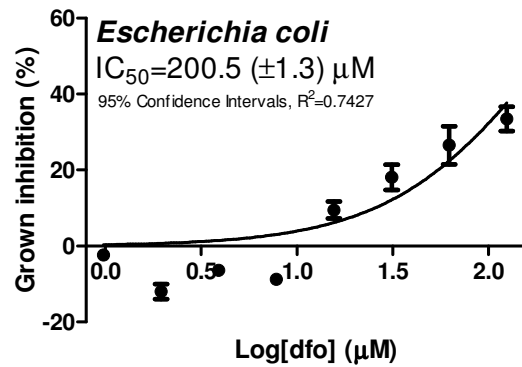
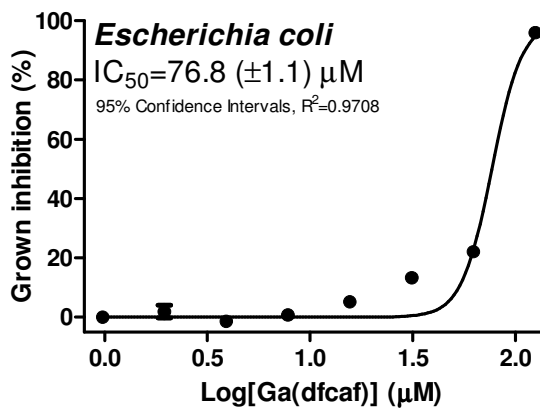
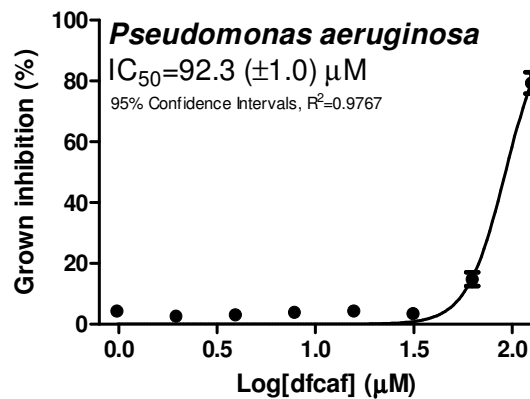
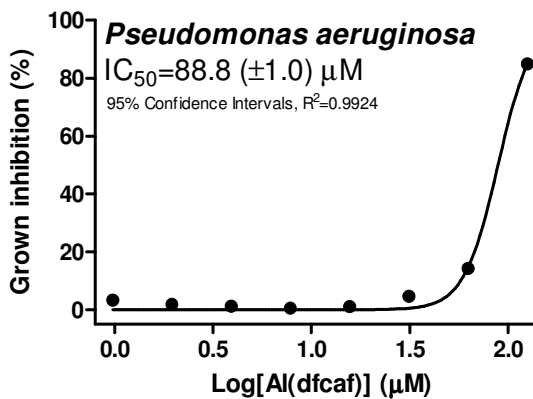
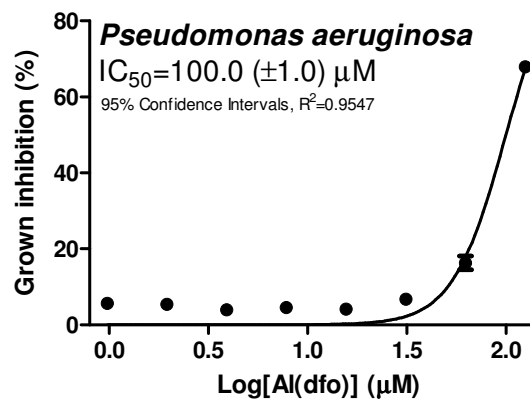
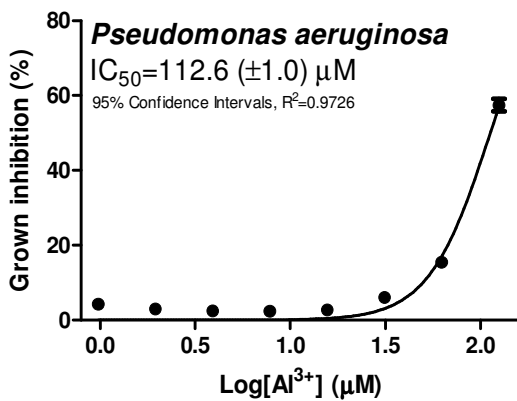


Figura 46. Curvas dose resposta de Al^{3+} , $Al(dfo)$, $Al(dfcaf)$, dfo , Ga^{3+} , $Ga(dfo)$, $Ga(dfcaf)$, dfo em *E. coli*.

8.4.1. *P. aeruginosa*



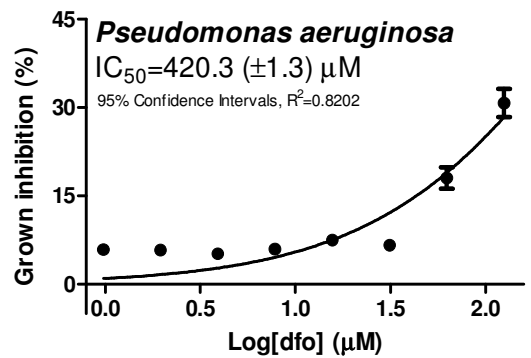
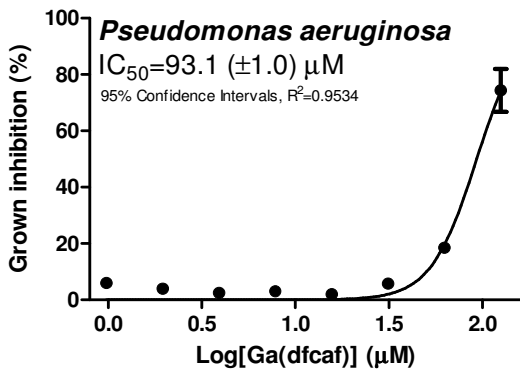
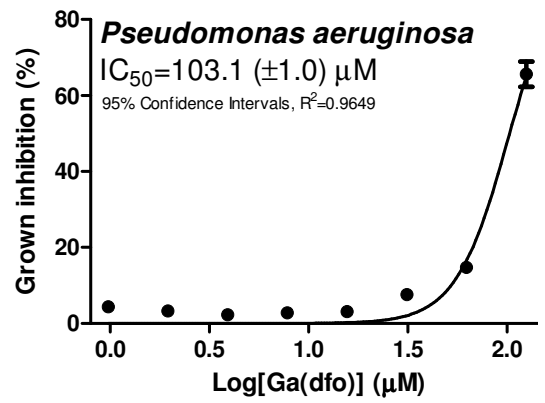
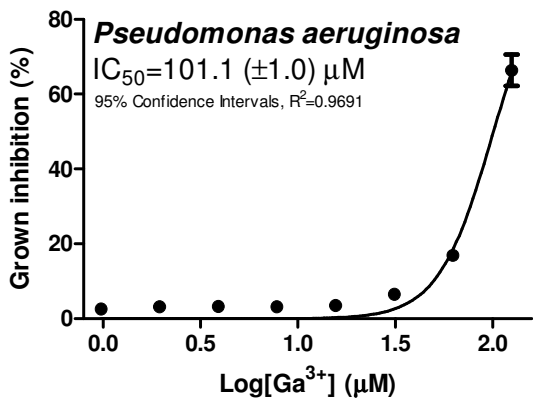
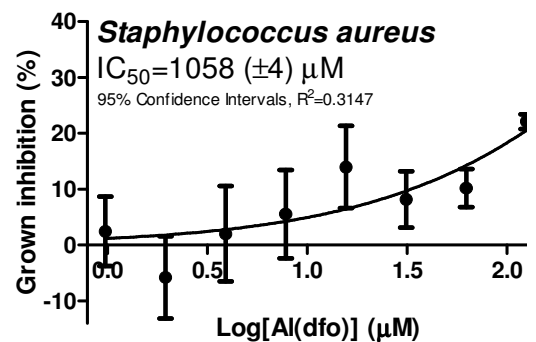
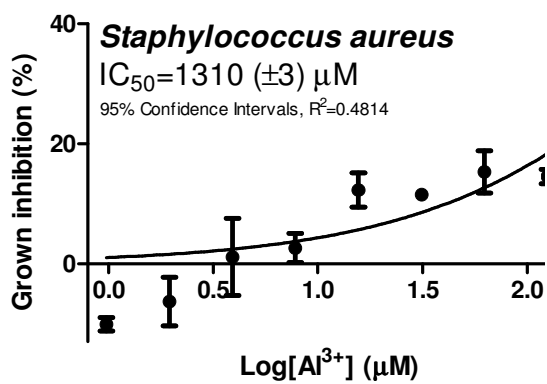


Figura 47. Curvas dose resposta de Al³⁺, Al(dfo), Al(dfcaf), dfcaf, Ga³⁺, Ga(dfo), Ga(dfcaf), dfo em *P. aeruginosa*

8.4.1. *S. aureus*



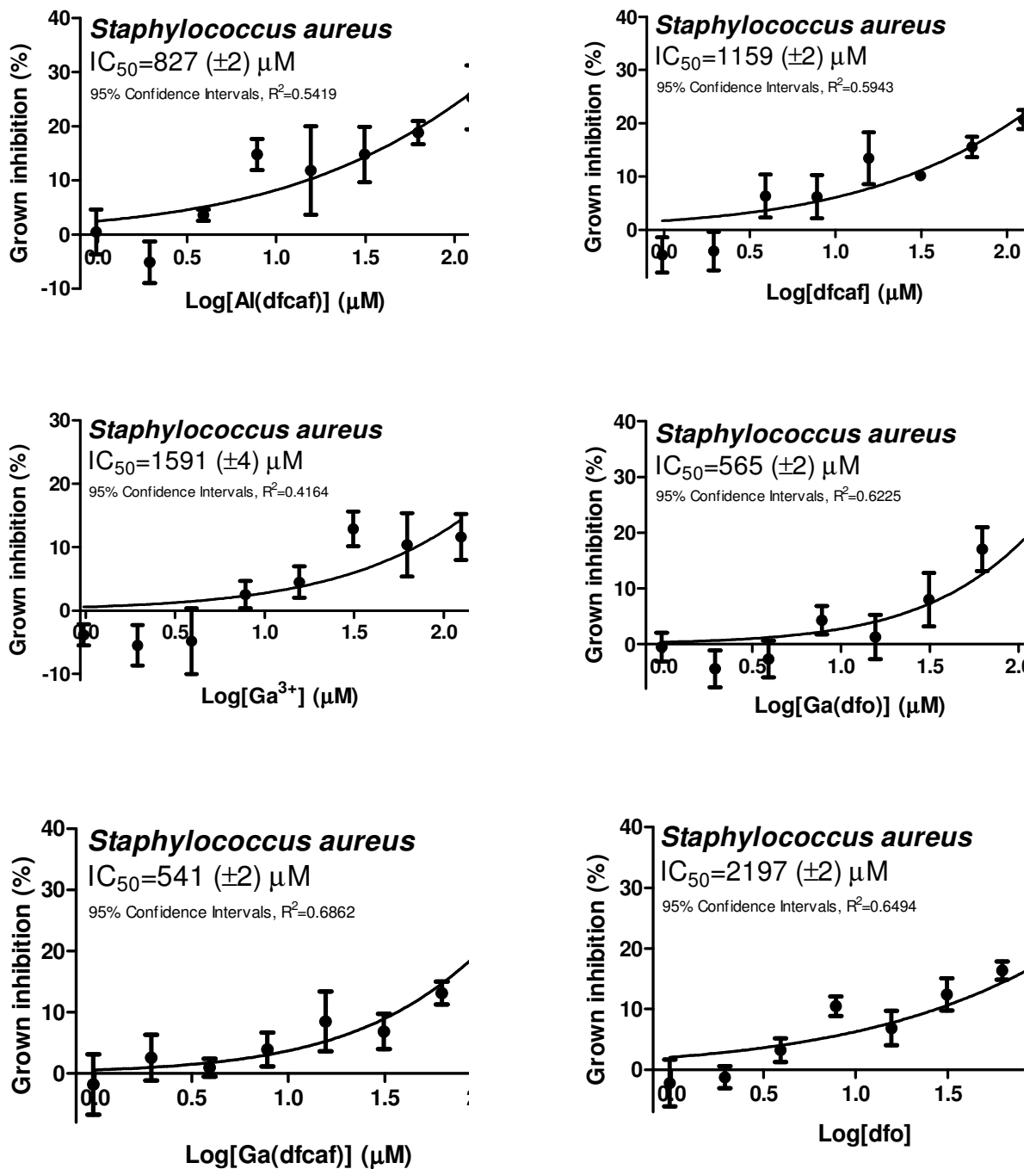
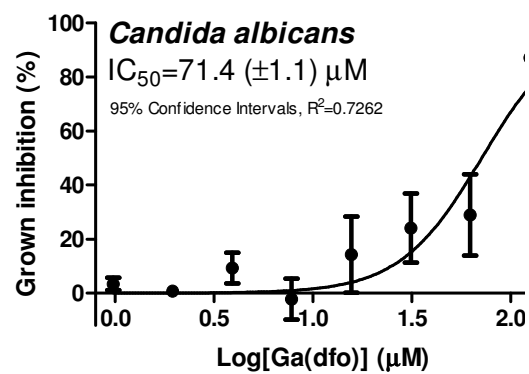
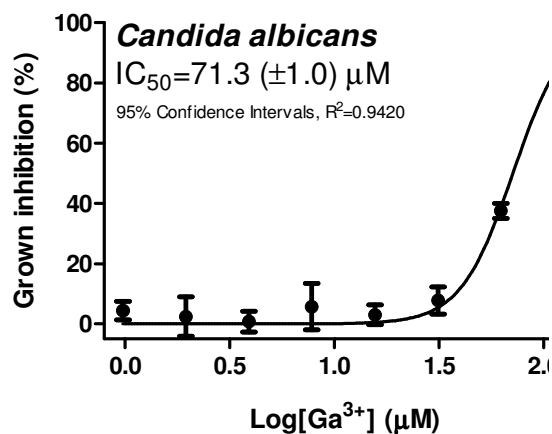
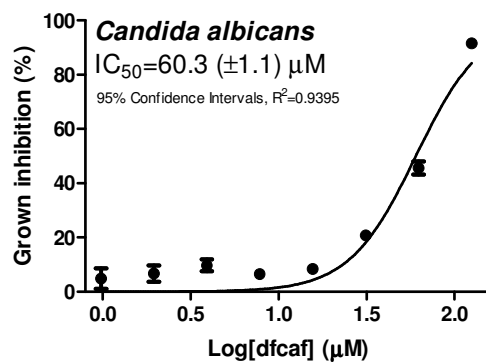
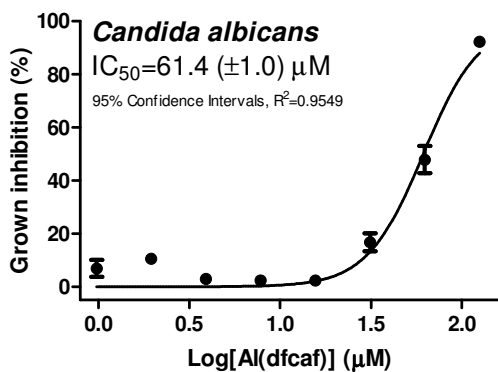
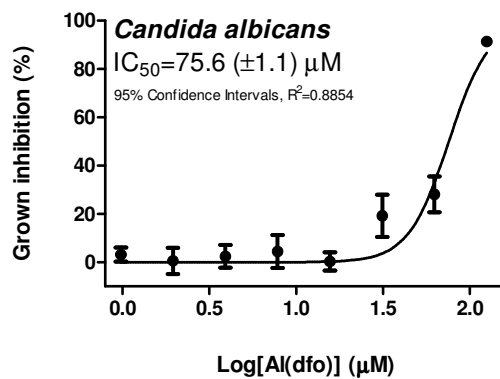
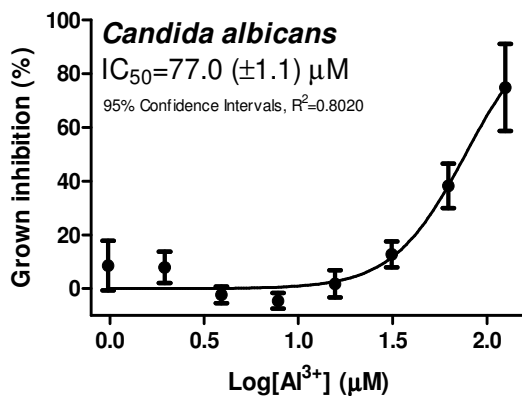


Figura 48. Curvas dose resposta de Al^{3+} , Al(dfo), Al(dfcaf), dfcaf, Ga^{3+} , Ga(dfo), Ga(dfcaf), dfo em *S. aureus*

8.4.1. *C. albicans*



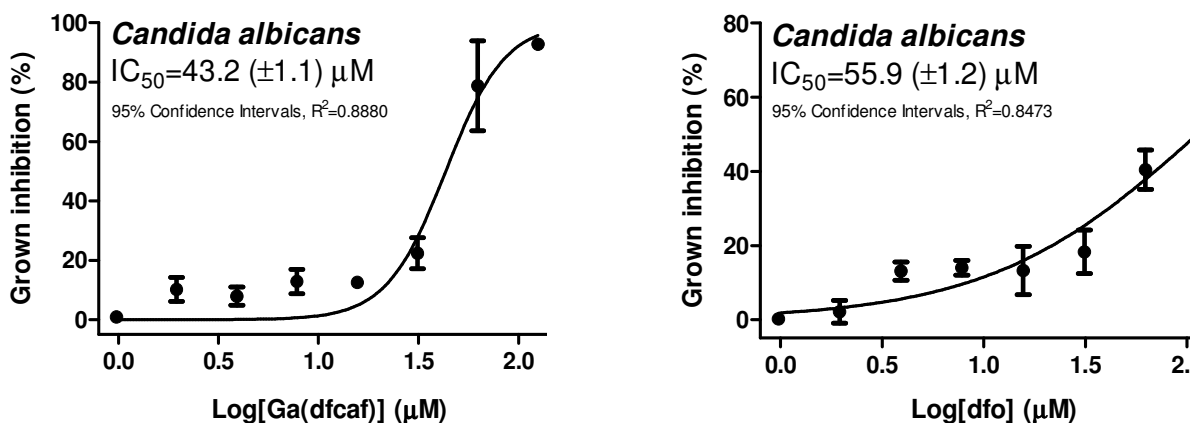


Figura 49. Curvas dose resposta de Al^{3+} , $Al(dfo)$, $Al(dfcaf)$, $dfcaf$, Ga^{3+} , $Ga(dfo)$, $Ga(dfcaf)$, dfo em *C. albicans*

8.5. Docagem molecular: $Fe(dfcaf)$ / FhuA

Tabela 6. Energia de afinidade $Fe(dfcaf)$ em FhuA. Valores obtidos do docagem molecular com AutoDock.

Modo	Afinidade Kcal/mol	RMSD l.b.
1	-11,0	0,000
2	-10,7	11,147
3	-10,3	4,883
4	-10,2	10,563
5	-10,1	10,149
6	-10,1	9,638
7	-10,0	12,561

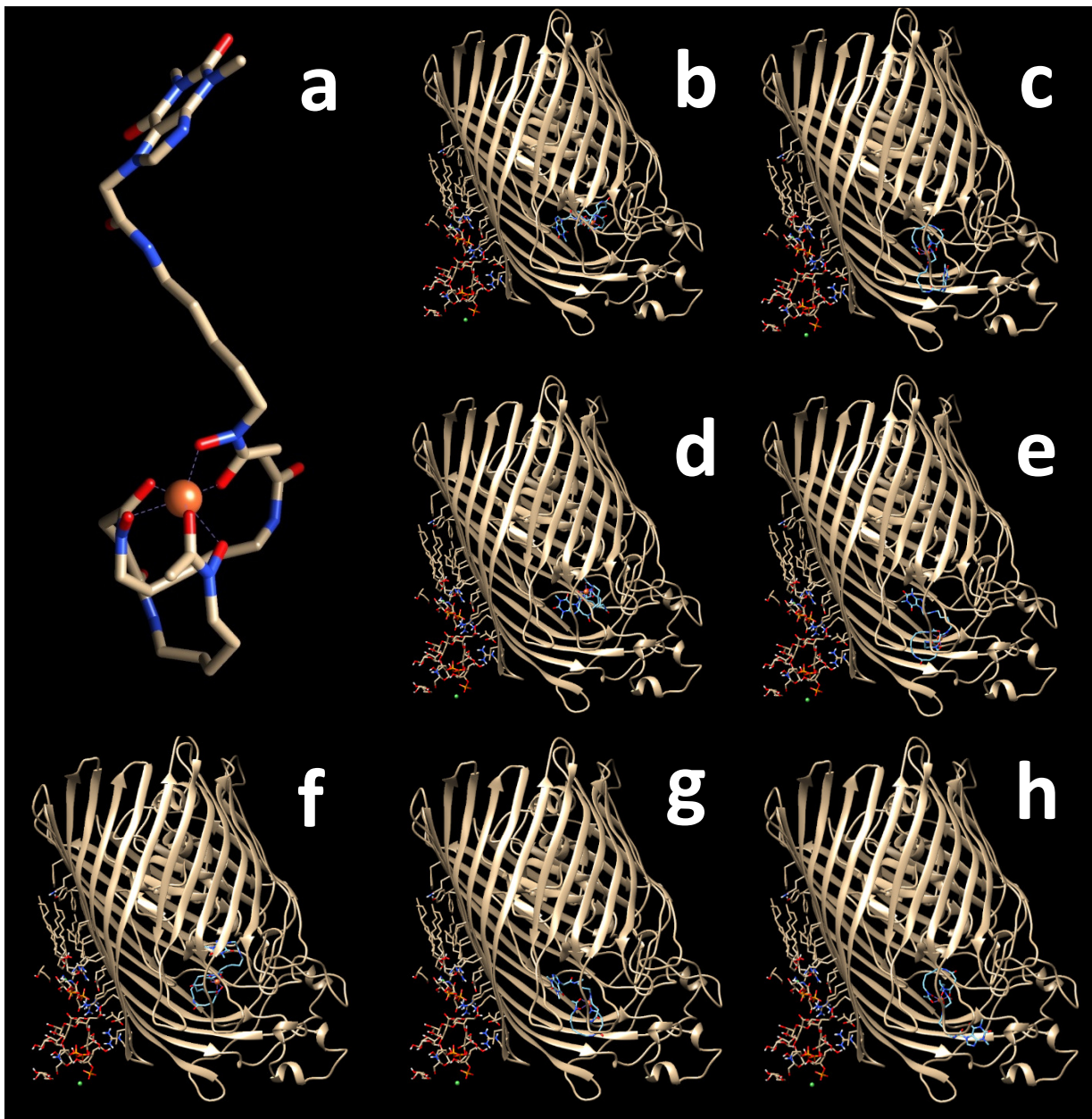


Figura 50. (a) Fe(dfo). (b-h) Esquema comparativo do sitio de ligação de Fe(dfcaf) em FhuA.

9. Súmula curricular

1. DADOS PESSOAIS

- Nome: Jesús Antonio Alvarado Huayhuaz
- Local e data de Nascimento: 15 de outubro de 1985

2. EDUCAÇÃO E FORMAÇÃO

- Colégio Peruano-Japonês, Lima (2001)
- Bacharel em Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima (2012)

Trabalho de Conclusão de Curso:

- *Desarrollo de un sensor de cianuro en línea de lectura remota y en tiempo real para el monitoreo de la calidad en cursos de agua para la prevención de accidentes en poblaciones de riesgo.* Orientador: Dr. La Rosa Toro, Adolfo.
- *Síntesis, caracterización e interacción del complejo $[Cu_2(\mu-O_2CCH_3)_4(2-(2\text{-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol})_2]$ con albumina humana.* Orientadora: Dra. Valderrama Negrón, Ana Cecilia.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Desenho de fármacos por computador, UNMSM, 2016 (Seminário).
- PicoQuant: Science in your labs? Time-resolved Microscopy? IQ-USP, 2015 (Seminário).
- Curso de Microscopia Widefield & Confocal, ICB-USP, 2014 (Seminário).
- II Symposium on Cell Death, ICB-USP, 2014 (Simpósio).
- Mini-symposium on oxygen singlet, IQ-USP, 2014 (Simpósio)
- Open eye Workshop, IQ-USP, 2014. (Seminário).
- VIII Congresso institucional, IQ-USP, 2014. (Congresso).
- Biosensores con nanotubos de carbono, FC-UNI, 2013 (Seminário)
- XXVI Congreso Peruano de Química, UNSA, 2012 (Congresso).
- Instrumentación Química Alternativa, UNSA, 2012 (Seminário)

- Metales en Medicina, Libipmet FC-UNI, 2012 (Seminário).
- Gestión de la Calidad en los Laboratorios, FC-UNI, 2011 (Seminário).
- Validación y Cálculo de Incertidumbre, CEPS-UNI, 2011 (Seminário).

3. HISTÓRICO PROFISSIONAL

- Monitor da disciplina teórica/prática Introdução à Química Quântica Computacional, para alunos do curso bacharelado em Química, a cargo do professor Dr. Antônio Carlos Borin, Instituto de Química (USP), com apoio da bolsa ESTADIQ: março-julho 2016.
- Professor de química Projeto HAMULAB, Consulado do Peru no Brasil, oficinas para crianças hispanofalantes em São Paulo: julho 2016.
- Monitor da disciplina teórica/prática Química de Coordenação, para alunos do curso bacharelado em Química, a cargo do professor Dr. Henrique Eisi Toma, Instituto de Química (USP), com apoio da bolsa PAE: agosto-dezembro 2015.
- Monitor da disciplina teórica/prática Química Inorgânica, para alunos do curso bacharelado em Engenharia Química, a cargo do professor Dr. Breno Pannia Espósito, Instituto de Química (USP): março-julho 2015.
- Estágio em docência: auxiliar na Tutoria RP, para alunos do bacharelado da Escola de Arte, Ciências e Humanidades, a cargo do professor Dr. Miguel Angel Garay, USP-EACH: março-julho 2015.
- Professor voluntario de ensino médio na Escola Estadual Professora Nanci Cristina do Espírito Santo em Poá: março-dezembro 2015.
- Mestrando em pesquisa em Química, Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos (LAQBAM), Instituto de Química (USP): 2014-2016.
- Professor de Química de ensino médio na Instituição Educativa Prolog, Lima Peru: março-julho 2014
- Estágio em pesquisa, Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental (LAQBAM), Instituto de Química (USP). Estudo da interação do complexo cobre-metronidazol com albumina humana mediante o uso de técnicas fluorescente: outubro-dezembro 2013
- Analista químico em SGS, na área do Médio Ambiente: junho-setembro 2013
- Estágio em pesquisa, Laboratório de Físicoquímica, Universidad Nacional Agraria de la Molina. Desenvolvimento de produtos do cacau: janeiro-fevereiro 2013

- Professor principal em ciências básicas (Química, Matemáticas e Física), Academia pré-universitária UNICIENCIAS: fevereiro-dezembro 2012.
- Analista químico no Laboratório Central da Superintendência da Aduana Marítima, SUNAT: agosto-dezembro, 2011.
- Professor de química e física, Academia pré-universitária Euler: 2009-2010.
- Professor em ciências básicas, Academia pré-universitária A1: fevereiro-dezembro 2008.

4. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESOS

HUAYHUAZ, J. A.; ESPOSITO, B. P.; KANEKO T.M. *Estudio de equilibrios competitivos de aluminio, galio y hierro mediante sondas fluorescentes para la aplicación del efecto caballo de troya em microbios*. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UNMSM), 2016. Lima Peru. (Apresentação oral).

HUAYHUAZ, J. A.; SALAZAR, B. A.; PACHECO, S.M.; SALAZAR, K. *Modelado in silico de compuestos bioactivos*. Primera Jornada Científica Internacional de Biociencias. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UNMSM), 2016

HUAYHUAZ, J. A.; ESPOSITO, B. P. Sideróforos transportadores de íons tóxicos. *Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment*, Facultad de Ciencias (UNI), 2015. Lima Perú. (Apresentação oral).

5. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

Primera Jornada Científica Internacional de Biociencias Hamutay. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú: 13-15, janeiro 2016.

<http://hamutay.cientificos.pe>

Modelaje in silico de compuestos bioactivos. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú: 11-12, janeiro 2016.

<http://hamutay.cientificos.pe/modelaje-in-silico-compuestos-bioactivos/>

Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, Perú: 21-22, dezembro 2015

<http://www.bicsociety.org/>