**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

CAMILA CRISTINA DE LIMA CASTRO

**Conjugados de ovalbumina e albumina bovina com
desferrioxamina e suas interações com íons metálicos**

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/02/2017

CAMILA CRISTINA DE LIMA CASTRO

Conjugados de ovalbumina e albumina bovina com
desferrioxamina e suas interações com íons metálicos

*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

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Castro, Camila Cristina de Lima

C355c Conjugados de ovalbumina e albumina bovina com desferrioxamina e suas interações com íons metálicos / Camila Cristina de Lima Castro. -- São Paulo, 2016.
66p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Espósito, Breno Pannia

1. Ferro : Química inorgânica 2. Ferro : Toxicologia 3. Albumina
4. Gadolínio 5. Quelato I. T. II. Espósito, Breno Pannia, orientador.

546.621 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Conjugados de ovalbumina e albumina bovina com desferrioxamina e suas interações com íons metálicos”

CAMILA CRISTINA DE LIMA CASTRO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestra em Ciências - no Programa de Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Breno Pannia Espósito
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Maria Teresa Machini
IQ - USP

Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem
IQ - UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
31 de janeiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Prof. Dr. Breno Pannia Espósito pela orientação deste trabalho, pela confiança, compreensão e todo apoio durante a pesquisa, por me aceitar em seu grupo de trabalho e acreditar em meu potencial.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos, em especial ao Hector, Rodrigo, Jesus e à técnica Fabiane, pelo companheirismo, troca de experiências e toda ajuda prestada durante o projeto de mestrado.

À Jéssica Bordotti Nobre Espósito por seu auxílio com os experimentos de eletroforese.

Ao Prof. Dr Luiz Alberto Colnago e seu orientando Rodrigo Santos Garcia pelas medidas de relaxação do complexo de gadolínio e apoio à interpretação e tratamento dos dados.

Agradeço ao Dr. Nelson Gimenez, chefe do departamento de Product Stewardship & Regulatory Affairs da AkzoNobel por me incentivar a fazer mestrado, me apoiando a frequentar aulas, a cumprir todo o programa requerido pela confiança em meu trabalho.

Aos meus pais Nalita e Vitor que sempre me apoiaram em meus estudos e toda a dedicação durante todos esses anos. Aos meus irmãos Vitor, Natalia e Carolina que me auxiliaram e deram muito suporte emocional.

Resumo

Castro, C. C. L. **Conjugados de ovalbumina e albumina bovina com desferrioxamina e suas interações com íons metálicos**. 2016. (68 p). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ferro é essencial para a vida do ser humano, desempenhando um papel fundamental no metabolismo. Contudo, quando não armazenado em compartimentos biológicos adequados, o metal apresenta um potencial tóxico ao organismo, uma vez que contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio. A sobrecarga de ferro é uma condição desfavorável para portadores de algumas disfunções genéticas, como a hemocromatose, ou de anemias crônicas que requeiram transfusões de sangue periódicas, como é o caso da talassemia. Os fármacos atuais que controlam a patologia, como a desferrioxamina (DFO), requerem infusão subcutânea lenta, causando desconforto em pacientes e podendo trazer um série de complicações, como insuficiência hepática e renal.

A modificação dessas moléculas com biopolímeros é uma proposta para minimizar efeitos colaterais e aumentar a biodisponibilidade do fármaco no organismo. Dentre esses biopolímeros, destacam-se as albuminas proveniente do soro bovino (BSA) e do ovo (OVA), que têm baixa toxicidade, baixo custo e abundância de sítios reativos, que quando modificados, favorecem reação com a desferrioxamina.

Como resultado, houve a reação dos biopolímeros com a desferrioxamina, com mudanças em suas estruturas secundárias e possível dimerização, resultando na formação de conjugados possuem afinidade com íon ferro e capacidade antioxidante semelhante ao fármaco original, características que tornam os compostos bons candidatos a uma alternativa à terapia de quelação.

Os conjugados BSA-DFO e OVA-DFO podem reagir, além do ferro, com gadolínio, fazendo com o que os complexos tenham uma potencial aplicação como agentes de contraste em ressonância magnética de imagem (MRI). Neste trabalho, vimos que o complexo entre Gd(III) e BSA-DFO apresentou uma relaxatividade de $52,92 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para T2 e $45,37 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para T1, um valor bem superior aos fármacos disponíveis no mercado, que apresentam relaxatividade entre 4 e $5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, o que foi explicado por sua elevada massa molecular, indicando que poderia ter bons efeitos na qualidade de MRI, com menores doses.

Palavras-chave: Desferrioxamina, ferro, albumina, ovalbumina, agente de contraste, gadolínio

Abstract

Castro, C. C. L. **Conjugates of ovalbumin and bovine albumin with desferrioxamine and their interactions with metallic ions.** 2016. (68 p). Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Iron is essential for human life, playing a fundamental role in metabolism. However, when not stored in appropriate biological compartments, the metal presents a toxic potential to the body, contributing to the formation of reactive oxygen species (ROS). Iron overload is an unfavorable condition for people with certain genetic disorders, such as hemochromatosis, or chronic anemias that require periodic blood transfusions, as thalassemia. Current drugs that control the pathology, as desferrioxamine, require slow subcutaneous infusion, causing discomfort in patients and may lead to a number of complications, such as hepatic and renal failures.

As a result, the biopolymers were reacted with desferrioxamine, with changes in their secondary structures and possible dimerization, resulting in the formation of conjugates with iron ion affinity and antioxidant capacity similar to the original drug, characteristics that make the compounds good candidates for an alternative chelation therapy

As a result, the reaction of the biopolymers with desferrioxamine caused a change in the secondary structure, with possible formation of dimers and showing different mobility when exposed to an electric potential difference. Not all polymer chains have reacted with DFO, however BSA-DFO complex has antioxidant capacity similar to the original drug.

The BSA-DFO and OVA-DFO conjugates can react, in addition to iron, with gadolinium, making the complexes potential contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). In this work, the complex between Gd(III) and BSA-DFO presented a relaxativity of $52.92 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ for T2 and $45.37 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ for T1, values higher than the available drugs in the market ($4 - 5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) which was explained by the high molecular weight, indicating a good effects on the quality of MRI, with lower doses.

Keywords: Desferrioxamine, iron, albumin, ovalbumin, contrast agent, gadolinium

SUMÁRIO

1.	Introdução	8
1.1	Ferro	8
1.2	Sobrecarga de ferro e reações oxidativas	9
1.3	Tratamento de sobrecarga de ferro	12
1.4	Ovoalbumina e Albumina Sérica Bovina	15
1.5	Agentes de contraste à base de Gd(III)	18
2.	Objetivos	19
2.1	Hipótese.....	19
2.2	Objetivo geral	19
2.3	Objetivos específicos	19
3.	Materiais e métodos	20
3.1	Lista de materiais	20
3.2	Síntese BSA-DFO e OVA-DFO	20
3.2.1	Condicionamento dos sacos de diálise	21
3.2.2	Reação com Fe(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Fe e OVA-DFO-Fe.....	21
3.3	Testes com os conjugados	22
3.3.1	Determinação da concentração de proteínas pelo Método de Bradford	22
3.3.2	Quantificação de DFO através da titulação com calceína férrica	22
3.3.2.1	Preparo da solução de calceína férrica (CAFe).....	23
3.3.2.2.	Preparo da placa auxiliar	24
3.3.2.3	Preparo da placa de leitura.....	24
3.3.3	Avaliação de potencial antioxidante dos conjugados	24
3.3.3.1	Preparo do padrão pró-oxidante (nitrilotriacetato férrico)	25
3.3.3.2	Preparo das soluções dos conjugados	25
3.3.3.3	Preparo do coquetel fluorogênico	25
3.3.3.4	Leitura.....	26
3.3.4	Eletroforese em gel	26
3.3.5	Dicroísmo Circular	27
3.3.6	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).....	27
3.3.8	Espectroscopia eletrônica.....	27
3.3.9	Reação com Gd(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Gd e OVA-DFO-Gd	27
3.3.10	Medidas de relaxação dos complexos de BSA-DFO-Gd e OVA-DFO-Gd.....	28
4.	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Determinação da concentração de proteínas pelo Método de Bradford	29
4.2	Espectroscopia Eletrônica.....	33
4.3	Quantificação de DFO através da titulação com calceína férrica	34

4.4	Avaliação de potencial antioxidante dos conjugados	39
4.5	Eletroforese em gel	41
4.6	Dicroísmo Circular	46
4.7	Reação com Gd(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Gd	53
5.	Conclusões.....	62
6.	Bibliografia	63

1. Introdução

1.1 Ferro

O ferro é metal de transição, o quarto elemento e segundo metal mais abundante na crosta terrestre, que desempenha um papel fundamental nas atividades biológicas, dentre elas como cofator de proteínas, participando de diversos processos biológicos de oxirredução [1].

O ser humano absorve entre 0,5 – 2,0 mg de ferro por meio da alimentação. Dentre os alimentos ricos em ferro, pode-se citar a carne e frutos do mar, além de vegetais como nozes, feijão, legumes e produtos de cereais enriquecidos [2, 3]. A absorção acontece no duodeno, com perdas em sangramentos e descamação de células. Além de fazer parte do grupo heme da hemoglobina e mioglobina, responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio, respectivamente, o metal se encontra estocado em diversos compartimentos, dentre elas a ferritina, como cofator de grupos prostéticos, como a aconitase, enzima do ciclo do ácido cítrico, estando envolvido na respiração mitocondrial e na síntese do DNA. Considerando todos esses compartimentos, um adulto humano com metabolismo normal apresenta níveis diferentes do metal, de acordo com o sexo: homens têm aproximadamente 2,4 g de ferro estocado, enquanto mulheres tem 1,7 g. O ferro é encontrado majoritariamente na medula óssea eritróide e nos eritrócitos maduros, ligado ao sítio heme da hemoglobina. A partir de um processo de reciclagem de hemácias velhas, o ferro para síntese de novos glóbulos vermelhos é fornecido principalmente por macrófagos reticuloendoteliais [3].

1.2 Sobrecarga de ferro e reações oxidativas

O íon ferro pode estar presente no organismo em ambiente extracelular, em que é carregado pela proteína transferrina (Tf). Essa forma de ferro, conhecida como TBI (*Transferrin-Bound Iron*; ferro ligado à transferrina), impede que o Fe(III) seja reativo, ou seja, torna o metal não lábil.

Ferro em excesso pode ser encontrado em reservatórios plasmáticos ou citossólicos. Os primeiros são conhecidos como NTBI (*Non-Transferrin-Bound iron*; ou ferro não-ligado à transferrina), de composição química indefinida, envolvendo formas com citrato ou albumina, podendo o metal ser monomérico ou oligomérico [4-6]. O reservatório citossólico é o LIP (*labile iron pool*; reservatório de ferro lábil), caracterizado pela presença de complexos do metal, quelado com ânions orgânicos, polipeptídios e componentes de membrana de superfície, em formas redox-ativas [7].

Clinicamente, a sobrecarga de ferro é diagnosticada através de saturação de Tf (> 45%) e/ou dos níveis de ferritina plasmática (> 300 ng/mL). Esse ferro em excesso pode se depositar nos tecidos hepático, cardíaco ou cerebral e, fora dos seus compartimentos bioquímicos, pode causar toxicidade através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) [8].

In vivo, o ferro(III) catalisa reações que formam radicais livres, iniciadas pela presença de peróxido de hidrogênio e superóxido, decorrentes da respiração aeróbica, conhecidas como reações de Haber-Weiss (Equações 1,2). A primeira etapa é a redução de ferro(III), e a segunda etapa é a reação de Fenton (2). Experimentos *in vitro* indicam que o H₂O₂ oxida Fe²⁺ produzindo hidróxido e o radical hidroxil (•OH), espécie altamente reativa [9].

O ferro trivalente pode também ser reduzido por meio de redutores celulares, tais como a glutatona, a L-cisteína, NAD(P)H e FADH₂. O •OH gerado pela reação de Fenton reage com biomoléculas a velocidades controladas por difusão, para formar uma série de radicais livres adicionais [10].

Como consequência, tais espécies afetam as funções celulares. As ERO's podem afetar diretamente o DNA mitocondrial, que afeta a atividade dos fatores de crescimento, proteínas quinases, fosfatases de proteínas ou fatores de transcrição. Alterações nas atividades de um ou mais destes elementos podem, por sua vez, alterar expressão de proteínas responsáveis pela respiração mitocondrial, ou induzir a morte programada de células, conhecida como apoptose [11] (Figura 1).

Figura 1: Efeito da presença de ERO's em células, o que leva a uma expressão anormal de genes e/ou apoptose, a morte programada de células [9].

A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 25% da população mundial pode sofrer a qualquer momento da vida um problema com o metabolismo do ferro. Elevadas concentrações de NTBI podem dar origem à septicemia, doença causada por infecções bacterianas [12, 13]. Intervenções como transfusão de sangue e diálise, além de enfermidades como a talassemia e hemocromatose hereditária, propiciam o estabelecimento de sobrecarga de ferro no organismo [14, 15].

As talassemias são desordens na hemoglobina causadas pela expressão anormal dos genes de globinas, que resultam na redução parcial ou total da síntese dessas proteínas. A alfa-talassemia é caracterizada por deleções no cluster de quatro genes da alfa-globina, resultando em perda de função. Quando os quatro genes são deletados, o resultado é conhecido por alfa-talassemia maior, extremamente letal. Já as beta-talassemias são ocasionadas por mutações pontuais de alguns nucleotídeos [16]. O tratamento indicado para tal patologia é muitas vezes a transfusão de sangue, que causa o acúmulo de ferro no organismo. No Brasil, estima-se que milhões de pessoas tenham o gene da doença, mas que 90% deles sejam assintomáticas e, portanto, sem necessidade de tratamento. Segundo dados da Abrasta (Associação Brasileira de Talassemia), há cerca de 800 casos notificados da doença [17].

A hemocromatose hereditária é definida pela deposição de ferro no fígado, coração, pâncreas e outros órgãos, causada pela absorção excessiva de ferro da dieta. Essa absorção exacerbada é, por sua vez, causada por mutações na proteína reguladora HFE (C282Y ou H63D) que, em situação normal, liga-se ao TfR e modula a ligação da Fe_2Tf . Trata-se de uma doença de afeta 100.000 nascidos por ano, sendo considerada endêmica no Sudeste Asiático, Oriente Médio e Mediterrâneo [18].

1.3 Tratamento de sobrecarga de ferro

O tratamento da sobrecarga de ferro pode se dar por simples flebotomia, que é uma incisão na veia, mas normalmente é aliado a uma terapia de quelação. A introdução de quelantes como fármacos tem origem na Primeira Guerra Mundial. O objetivo desse tipo de tratamento é usar uma molécula solúvel em água, que possa entrar em contato com metais na corrente sanguínea e formar complexos, a fim de diminuir sua atividade em meio biológico, para em seguida serem excretados de forma simples. Inicialmente, os primeiros quelantes usados foram o dimercaprol, EDTA, DMSA (ácido dimercaptosuccínico), DMPSM (ácido dimercaptopropanil-1-sulfônico), para a desintoxicação de mercúrio ou arsênio. Nos anos 1970, a terapia de quelação para ferro surgiu como uma alternativa à flebotomia [19].

Em linhas gerais, a terapia de quelação de ferro envolve a administração de um quelante por via intravenosa ou oral dentro de um regime de tratamento voltado a mobilizar o ferro dos seus reservatórios para posterior excreção. Atualmente existem três opções de fármacos, a desferrioxamina, deferiprona e deferasirox (Figuras 2-4). No Brasil, o SUS (Sistema Único de Saúde) disponibiliza os três fármacos para pacientes com talassemia [17]. Eles diferem entre si quanto a administração, dose, estequiometria, dentre outros, conforme mostrado na Tabela 1 [20]:

Tabela 1: Propriedades dos fármacos desferrioxamina, deferasirox e deferiprona [20]

Propriedades	Desferrioxamina	Deferasirox	Deferiprona
Estequiometria (quelante:Fe(III))	Hexadentado (1:1)	Tridentado (2:1)	Bidentado (3:1)
Dose Usual	25-60 mg/kg/dia 8-24 horas	20-40 mg/kg/dia dose única	75-100 mg/kg/dia, divididas em 3 doses
Administração	Intravenoso, subcutâneo	Tabletes para suspensão oral	Tablete ou solução oral
Excreção	Urinária, fecal	fecal	Majoritariamente urinária
Remoção íon do fígado	+++	+++	++
Remoção íon do coração	++	++	+++
Reversão de disfunção cardíaca relacionada ao íon ferro	++	?	+++
Reações adversas	Reações locais, audiológicos, oftalmológicos, reações alérgicas, anormalidades ósseas e pulmonares, neurológicas	Gastrointestinais, erupções cutâneas, aumento de creatinina, sangramentos gastrointestinais, insuficiência renal, elevação de enzimas hepáticas	Gastrointestinais, neutropenia, artralgia, elevação de enzimas hepáticas

Figura 2: Estrutura química da desferrioxamina (DFO).

Figura 3: Estrutura química da deferiprona (DFO).

Figura 4: Estrutura química do deferasirox.

A desferrioxamina (Figura 2), de acrônimo DFO, é um quelante hexadentado, capaz de capturar o ferro livre encontrado no plasma, dando origem ao complexo ferrioxamina (FO; Figura 3), com elevada afinidade ($\log K_{ML} = 42,33$) [21], graças aos seus grupos hidroxamatos. O ferro pode ser quelado a partir da ferritina e da hemossiderina, mas a quelação é relativamente lenta em concentrações clinicamente relevantes de DFO. Entretanto, a DFO não remove o ferro da transferrina, da hemoglobina ou de outras substâncias contendo grupo heme [22].

Figura 5: Ferrioxamina, o complexo formado pela reação de desferrioxamina e ferro [23]

A desferrioxamina é rapidamente absorvida após injeção intramuscular ou infusão subcutânea lenta, mas pouco absorvida a partir do trato gastrintestinal, na presença de mucosa intacta. Geralmente trata-se de uma dose por dia, mas pode chegar a duas em

alguns casos. A biodisponibilidade absoluta é menor do que 2% após a administração oral de 1 g da desferrioxamina (seu tempo de depuração renal é curto). O fármaco é administrado com ajuda de uma bomba de infusão, durante 12 a 14 horas contínuas (usualmente à noite, durante o sono), de cinco a sete vezes por semana [24].

O uso continuado dos quelantes de uso clínico pode trazer uma série de complicações, tais como anormalidades ósseas, artralgia, complicações audiológicas, aumento de creatinina, enzimas hepáticas elevadas, erupção cutânea, insuficiência e falência renal, insuficiência hepática, complicações neurológicas em altas doses, neutropenia/agranulocitose, complicações oftalmológicas, complicações pulmonares em altas doses, reações alérgicas, irritação e sangramento gastrointestinal [20].

1.4 Ovoalbumina e Albumina Sérica Bovina

A fim de aumentar o tempo em que determinadas moléculas ficam em circulação (ou seja, a fim de aumentar seu tempo de depuração), as mesmas poderiam ser modificadas por proteínas de baixa toxicidade e baixo custo. No caso específico da desferrioxamina, essa estratégia seria particularmente interessante, dado que sua hidrofobicidade diminui muito seu tempo de circulação.

A desferrioxamina pode ligar-se covalentemente a biopolímeros, principalmente através de grupos amino, tiol e carbonil [25]. Existe uma série de evidências na literatura que mostram a conjugação da molécula com proteínas e peptídeos. Desde a década de 1990, rotas de síntese têm sido desenvolvidas, especialmente reagindo grupos SH ou resíduos de lisina [26]. Para que tais reações ocorram com mais facilidade, é comum que essa molécula seja modificada.

Estruturas derivadas da desferrioxamina como o p-isotiocianatobenzil-desferrioxamina, e N-succinil-desferrioxamina podem reagir com metais e com proteínas, uma vez que

há grupos carboxílicos livres para também serem conjugados a proteínas. Esses conjugados podem potencialmente desempenhar papéis como fármacos, especialmente em radioterapia, além da desmineralização da ferritina. Complexos de proteínas ligadas à desferrioxamina apresentam estabilidade *in vivo* [26-29].

Dentre as vantagens de se utilizar tais moléculas é que a desferrioxamina conjugada pode proteger as células do stress oxidativo, uma vez que impede a reação de Fenton [30]. Além da reação esperada com ferro, ainda pode haver reações com metais como zircônio, gálio e gadolínio [31-33].

Conjugados com desferrioxamina modificada quimicamente com glutaraldeído, utilizando albumina humana como biopolímero, apresentam alta afinidade a gálio [34].

A ovoalbumina (OVA) e a albumina sérica bovina (BSA) são solúveis em água e com capacidade natural de ligação com ferro, mas com muito baixa afinidade [35]. A ovoalbumina está presente na clara do ovo de galinha em uma proporção que pode variar entre 60-65%. Trata-se de uma glicoproteína, com massa molar de 45000 Da, cuja sequência de aminoácidos conta com 386 resíduos. Seu grupo aminoterminal é acetilado, diferindo-se de outros tipos. Apesar de pertencer ao grupo das serpinas, que atuam como inibidores da protease (ou seja, são coagulantes), ela não possui tal característica, sendo sua função desconhecida [36]. Elas possuem estrutura secundária mista, ou seja possuem α -hélice, folhas β , estruturas indefinidas e *turns* nas proporções 41, 34, 13 e 12%, respectivamente [37]. Sua extração foi primeiramente proposta em 1900, usando sulfato de amônio saturado em excesso em meio ácido, porém na década de 1950 descobriu-se que tal método não proporcionava uma separação com alto grau de pureza. Atualmente utiliza-se fracionamento por espuma [38].

A albumina sérica bovina é a principal proteína do plasma do sangue do boi. Possui boa capacidade de ligação de água, íons metálicos, ácidos graxos, hormônios e fármacos. Sua função principal é a regulação da pressão osmótica coloidal do sangue. Com cerca de

66000 Da, trata-se de um polímero fundamental para o transporte de zinco no plasma, ligando-se a cerca de 80% desse metal. Dentre suas vantagens para modificação e utilização, destacam-se a estabilidade e ausência de imunogenicidade [39].

Ambas as proteínas apresentam também sítios reativos, como aminas, tióis, fenóis e imidazóis, que são nucleófilos. Os aminoácidos mais reativos são a lisina, tirosina, triptofano, histidina, cisteína, prolina, serina, glicina e arginina, que por meio de um agente de *crosslink* como o glutaraldeído, poderiam formar ligações com a desferrioxamina [40]. O número de resíduos em cada cadeia varia, conforme Tabela 2 (banco de dados online UniProtKB (*Protein knowledge base*; <http://www.uniprot.org>) O glutaraldeído é um composto bifuncional largamente usado para modificação de proteínas, pela fato de ligar a grupos amina, criando estruturas estáveis [41].

Tabela 2: Aminoácidos reativos com glutaraldeído, presentes nas estruturas de BSA e OVA

Aminoácido	OVA		BSA	
	Número de resíduos	% na cadeia	Número de resíduos	% na cadeia
Lisina	20	5.2	60	9.9
Tirosina	10	2.6	21	3.5
Triptofano	3	0.8	3	0.5
Histidina	7	1.8	17	2.8
Cisteína	6	1.6	35	5.8
Prolina	14	3.6	28	4.6
Serina	38	9.8	32	5.3
Glicina	19	4.9	17	2.8
Arginina	15	3.9	26	4.6

1.5 Agentes de contraste à base de Gd(III)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das principais técnicas não-invasivas que permite revelar detalhes anatômicos de forma concisa e clara, para diagnosticar diversos tipos de doença. Os tecidos biológicos são opacos a radiações de comprimentos de onda curtos, como o raio-X e ultravioleta, mas por outro lado são transparentes a comprimentos de onda maiores, como as ondas de rádio, utilizadas na técnica.

Em presença de agentes de contraste (ACs), a aquisição de imagem é melhorada, pois eles causam uma variação grande do tempo de relaxação do próton da água, o que causa um aumento do sinal de RMN. Atualmente, cerca de 35% dos diagnósticos são feitos com ACs. Dentre as moléculas mais utilizadas, destacam-se os complexos à base de Gd(III), terra rara possui alto grau de paramagnetismo por conta dos sete elétrons desemparelhados, característica fundamental para um bom agente de contraste. O metal não possui atividade biológica conhecida em mamíferos e não pode ser administrado isoladamente, devido à sua toxicidade (10-20 $\mu\text{mol/kg}$). Por essa razão, é necessário o uso de quelantes estáveis [42, 43].

Os fármacos de mercado como o gadopentato dimeglumina (Magnevist®), gadoterato meglumina (Dotarem®), gadoteridol (ProHance®) e gadodiamide (Omniscan®), com surfactantes como o N-Alquill-N-metilglucamina, possuem grupos aminocaboxilatos que se ligam ao metal.

Uma das estratégias para se desenvolver ACs de melhor desempenho é o aumento da massa molar, uma vez que se diminui a rotação molecular e aumenta o tempo de relaxação do próton da água [43]. Considerando essa abordagem, a ovoalbumina e albumina bovina são moléculas de alta biocompatibilidade e alto peso molecular [44].

2. Objetivos

2.1 Hipótese

Frente ao problema da depuração de DFO ser muito rápida, com uma meia-vida de distribuição média de 0,4 horas, é necessária a administração via uma bomba injetora, o que causa um desconforto ao paciente. A fim de aumentar a biodisponibilidade do fármaco no organismo a proposta é a síntese de dois novos materiais: desferrioxamina ligada a ovalbumina (OVA-DFO) ou a albumina sérica bovina (BSA-DFO), com propriedades quelantes ao íon ferro semelhantes e com características antioxidantes semelhantes ao fármaco não ligado.

Tais compostos serão adicionalmente reagidos com Gd(III), a fim de propor uma alternativa de agentes de contraste, melhorando diagnósticos por ressonância magnética de imagem. -

2.2 Objetivo geral

Modificação da ovoalbumina e albumina bovina com desferrioxamina, formando os conjugados OVA-DFO e BSA-DFO, e estudo das suas interações com íons metálicos.

2.3 Objetivos específicos

- Síntese dos conjugados OVA-DFO e BSA-DFO por *crosslink* com glutaraldeído
- Caracterização dos conjugados
- Estudo da ligação a ferro e atividade antioxidante dos materiais
- Estudo da relaxação magnética dos derivados de OVA-DFO e BSA-DFO com Gd³⁺

3. Materiais e métodos

3.1 Lista de materiais

A lista de reagentes está detalhada na Tabela 1.

Tabela 3: Lista de Reagentes

Reagente	Fabricante
(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanossulfônico) HEPES	Sigma Aldrich
(N,N,N,N Tetrametilenodiamina) TEMED	Vetec
2-Mercaptoetanol	Sigma Aldrich
Ácido Acético	Sigma Aldrich
Ácido Ascórbico	Vetec
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	Cromoline
Água deionizada	Equipamento Milipore
Albumina Bovina*	Sigma Aldrich
Bromofenol blue	Fluka
Calceína	Vetec
Carbonato de Sódio Anidro	Cromoline
Cloreto de Diidrorodamina (DHR)	Biotium
Cloreto de Sódio	Synth
Coomassie Blue	Vetec
Glicerol	Sigma Aldrich
Glicina	Cromoline/Acros/Sigma
Glutaraldeído	
Lisina	Vetec
Mesilato de Desferrioxamina	Novartis
Metanol	Synth
Nitrilo Acetato de Sódio	Sigma Aldrich
Ovalbumina**	Acros
Persulfato de Amônio	Sigma
Sulfato ferroso amoniacal	Sigma Aldrich
Tris hidroximetil-aminometano	Cromoline

*Grau de Pureza – 98%, **Grau de Pureza – 80%

3.2 Síntese BSA-DFO e OVA-DFO

Uma amostra de 100 mg de proteína (OVA ou BSA) foi dissolvida em 10 mL de tampão HBS (Hepes Buffered Saline), pH = 6,8, 20 mmol L⁻¹ HEPES, 150 mmol L⁻¹ NaCl. Uma alíquota de 500 µL de glutaraldeído foi adicionado na solução. Após 24 horas de reação em temperatura ambiente, a proteína funcionalizada foi purificada por meio de uma

diálise. Em seguida, 25 mg de DFO foram dissolvidos em 2,5 mL de carbonato de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), $\text{pH} = 9,5$, e tal solução foi adicionada à proteína modificada, permanecendo sob agitação por 24 h a 4°C . Ao final desse período, 620 μL de uma solução contendo 0,02 g de lisina em carbonato de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi acrescentada ao meio, para que sítios reativos fossem bloqueados. A fim de remover polímeros insolúveis que foram formados, o conjugado foi centrifugado e depois purificado por meio de diálise, com uma solução HBS $\text{pH} = 7,4$ [45].

3.2.1 Condicionamento dos sacos de diálise

Os sacos de diálise tinham um cut-off de 14 kDa, ou seja, todas as moléculas acima dessa massa molecular são retidas no plástico, enquanto moléculas menores migram para o exterior. Tais membranas precisam ser condicionadas, a fim de remover impurezas que vêm com o material comercial. Para isso, preparou-se 500 mL de uma solução de EDTA tetrassódico 10 mmol L^{-1} , contendo 1% de carbonato de sódio. Um pedaço da membrana foi fervido por 1 h nessa solução. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de água destilada morna, fervendo posteriormente por mais 1 h. Após esfriamento a temperatura ambiente, os sacos foram armazenados em geladeira, nessa solução [46].

3.2.2 Reação com Fe(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Fe e OVA-DFO-Fe

Às soluções das amostras de BSA-DFO e OVA-DFO adicionou-se 44 μmol de sulfato de amônio amoniacal sólido, a temperatura ambiente, com posterior agitação, até total solubilização.

3.3 Testes com os conjugados

Ambos os conjugados, BSA-DFO e OVA-DFO, foram submetidos aos mesmos ensaios individualmente.

3.3.1 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

Preparou-se uma solução de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio, que serve como branco para uma medida espectrofotométrica. Foram preparadas soluções estoque de concentração $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada um dos biopolímeros, e a partir delas foram preparadas outras seis soluções por diluições seriais de 50%. Separou-se em microplacas, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de cada uma, adicionando 5 mL de Coomassie Blue (reagente de Bradford), a temperatura ambiente, com agitação. O espectrofotômetro Spectramax M4 (Molecular Devices) foi ajustado a 596 nm e mediu-se a absorbância de cada um dos preparados. Com os dados, foi possível montar uma curva de calibração [47]. Paralelamente, $100 \mu\text{L}$ das soluções dos conjugados BSA-DFO e OVA-DFO foram tratados da mesma maneira.

3.3.2 Quantificação de DFO através da titulação com calceína férrica

A fim de quantificar o número de moléculas de DFO conjugadas a cada uma das proteínas, procedeu-se à reação dos conjugados com o complexo $\text{Fe}(\text{calceína})$ (calceína férrica ou CAFe). A calceína é um quelante fluorescente que forma complexos não fluorescentes 1:1 com Fe^{3+} . Na presença de quelantes de maior afinidade pelo metal (Q), este é removido de CAFe e a fluorescência da calceína é regenerada, permitindo uma quantificação de Q (Figura 4).

Figura 6. (a) Princípio do método de quantificação de quelantes através de competição com calceína férrica. (b) Constantes de afinidade efetiva K_{eff} podem ser obtidas através desse ensaio, se o efeito da afinidade e concentração de Q por Fe^{3+} for maior do que a da calceína [48, 49].

O teste com calceína férrica é constituído por três etapas, que envolvem o preparo da solução de CAFe, o preparo da placa auxiliar e o preparo da placa de leitura no equipamento Spectramax M4 (Molecular Devices).

3.3.2.1 Preparo da solução de calceína férrica (CAFe)

Foram pesados 6,2 mg de calceína em microtubo Eppendorf, seguida da adição de 950 μL de HBS pH 7,4. Foram adicionadas alíquotas de 5 μL de calceína até a dissolução total do sólido, completando o volume total até 1000 μL . Foram então adicionados 3,9 mg

de sulfato ferroso amoniacal (FAS), observando-se imediatamente a formação de uma solução vermelho-sangue intenso. A partir desse estoque, foi preparada uma solução de trabalho em concentração final de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HBS.

3.3.2.2. Preparo da placa auxiliar

Os ligantes OVA-DFO e BSA-DFO foram diluídos ambos a uma concentração de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ (em proteína). Alíquotas de $200 \mu\text{L}$ de cada solução foram dispostas em diferentes fileiras de uma microplaca de 96 poços, e diluídas serialmente (50%) com HBS pH 7,4 de modo com que cada uma tivesse um volume final de $100 \mu\text{L}$. Para efeito de controle, o mesmo procedimento com as mesmas condições foi feito para soluções de OVA, BSA e DFO.

3.3.2.3 Preparo da placa de leitura

Separadamente em uma microplaca de 96 poços transparente de fundo chato (Corning), foram adicionados em duplicata $190 \mu\text{L}$ de calceína complexada com ferro ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) em todos os poços. Com uma micropipeta multicanal, $10 \mu\text{L}$ do conteúdo de cada um dos poços da placa auxiliar foram adicionados à placa de leitura. A fluorescência foi registrada a 37°C no aparelho BMG Fluorostar Optima com $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emiss}} = 495/515 \text{ nm}$ [14].

3.3.3 Avaliação de potencial antioxidante dos conjugados

O ensaio de potencial antioxidante através da supressão da geração de ERO's a partir da reação entre ferro e ascorbato [48] necessita de um preparo prévio, sendo ele o preparo do padrão pró-oxidante, soluções dos quelantes e do coquetel fluorogênico, para realização do experimento.

3.3.3.1 Preparo do padrão pró-oxidante (nitrilotriacetato férrico)

Para o preparo da solução oxidante, inicialmente, preparou-se 1,2 mL de uma solução de nitrilotriacetato de sódio (nta) 30 mmol L⁻¹, em água. Separadamente foram pesados 39 mg de sulfato ferroso amoniacal (FAS) e após ser dissolvido em 1 mL de nta 30 mmol L⁻¹, a solução foi incubada a 37°C por 2 h. Essa solução formada, Fe(nta) 10 mmol L⁻¹ em ferro, foi armazenada em geladeira. A partir do estoque, a solução foi diluída a uma concentração de 10 µmol L⁻¹ em água destilada.

3.3.3.2 Preparo das soluções dos conjugados

Separadamente, as soluções de quelantes BSA-DFO e OVA-DFO foram diluídas a 50 µmol L⁻¹ (em DFO) em HBS, o mesmo solvente utilizado na síntese do material. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi transferida para um poço de uma microplaca de 96 poços. Na mesma coluna foram dispostas alíquotas de 50 µL em cada poço. Foram feitas então diluições seriais, de forma que a placa de trabalho houvesse concentrações que variam de 0 a 50 µM.

3.3.3.3 Preparo do coquetel fluorogênico

Em um tubo Falcon de 50 mL, foram adicionados 20 mL de tampão HBS pH 7,4, pré-aquecido a 37°C, 100 µL de ascorbato a 8 mmol L⁻¹ e 10 µL de dihidrorodamina (DHR) a 100 mmol L⁻¹. O tubo foi agitado por alguns segundos até a dissolução total da DHR, para preparo do coquetel antioxidante.

3.3.3.4 Leitura

Na microplaca de leitura, 10 μL da solução de Fe(NTA) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi adicionado em cada um dos poços. Em seguida, adicionou-se 10 μL de cada solução de conjugado 0→50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em seguida, transferiu-se 180 μL do coquetel fluorogênico para cada poço da solução desejada, iniciando a leitura no leitor de microplacas BMG FluoStar Optima, com o protocolo de fluorescência “LPI” (parâmetros: 96 poços; excitação: 485 nm; emissão: 520 nm; ganho: 1000; número de ciclos: 60 ; intervalo de cada ciclo: 60 s). O procedimento foi feito em duplicata [48].

3.3.4 Eletroforese em gel

As amostras BSA, BSA-DFO, OVA e OVA-DFO foram diluídas em quatro diferentes concentrações de proteína: 0,125; 0,075; 0,050 e 0,025 mg/mL.

Foi utilizado sistema de mini-gel da BioRad, e os géis foram preparados de acordo com o protocolo 9413 da BioRad para 40% Acrilamida/Bis 29:1) [50]. A concentração de gel de contenção foi de 4% e do gel de corrida foi 12%. Para as soluções e método, para determinação de proteínas em SDS-Page, foi utilizado o boletim 6040 da BioRad [51]. Foram adicionados 0,25 μL de β -mercaptoetanol para quebrar ligações de dissulfeto e minimizar que os efeitos de estruturas secundárias possa causar na migração. As amostras foram aquecidas entre 90 - 100°C por cinco minutos. O tempo de corrida foi de 2h40', seguido de 10 min após a saída do tampão de amostra, aplicando uma voltagem de 100 V.

Após a eletroforese as amostras foram coradas com Coomassie blue (0,1%) solubilizado em metanol (50%), ácido acético (10%) e água (50%), a temperatura ambiente, por 12 horas, seguido da descoloração até o gel ficar claro e as bandas proteicas coradas de azul.

3.3.5 Dicroísmo Circular

As amostras de BSA, BSA-DFO, BSA-DFO-Fe, OVA, OVA-DFO e OVA-DFO-Fe foram todas diluídas 10 vezes em água. As medidas de dicroísmo circular foram obtidas no equipamento J-815 da Jasco, na Central Analítica do IQUSP, a 25°C, com corridas de 190 a 350 nm e velocidade de 20 nm/min.

3.3.6 Espectrometria de Massas por Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)

As amostras de BSA, BSA-DFO, OVA e OVA-DFO foram diluídas 50 e 100 vezes em HBS, pH 6,8, com adição de 1% em volume de ácido sinapínico, para leitura no aparelho MALDI-TOF Ultraflextreme Bruker Daltonics (Central Analítica do IQ-USP).

3.3.7 Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis

Os complexos [Fe(BSA-DFO)], [Fe(OVA-DFO)] e [Fe(DFO)] dissolvidos em HBS, foram analisados por espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível, em microplacas por meio do equipamento SpectraMax M4, de caminho ótico de 1 cm

3.3.8 Reação com Gd(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Gd e OVA-DFO-Gd

As amostras de BSA, BSA-DFO, OVA e OVA-DFO foram diluídas em concentrações de 10, 15 e 20 $\mu\text{mol/L}$ (em DFO) em tampão HBS pH 7,4. Às soluções adicionou-se, em proporções estequiométricas 1:1, $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a temperatura ambiente.

3.3.9 Medidas de relaxação dos complexos de BSA-DFO-Gd e OVA-DFO-Gd

Em concentrações de 10, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as leituras dos dados de relaxação, por CPMG (Car-Purcell-Meiboom-Gil) e IR (Inversion Recovery) foram obtidas por meio espectrômetro Minispec - MG 20 (Bruker), em um campo de 0.5 T, a 27°C. Os experimentos foram realizados no laboratório do Dr. Luiz Alberto Colnago, da Embrapa, São Carlos,

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

A concentração das proteínas em solução é determinada por meio do teste de Bradford. Trata-se de um método simples, proposto na década de 1970, baseado no comportamento colorimétrico do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, existente nas cores azul e vermelha. Quando a proteína está ligada ao agente corante (Figura 5) a solução deixa sua cor avermelhada e passa a ser azul [47].

Figura 7: Estrutura do Coomassie Brilliant Blue G-250, corante que permite a determinação da concentração de proteínas por conta de seu comportamento colorimétrico, frente a presença de proteínas.

Trata-se de um método espectrofotométrico, sendo que o comportamento molecular segue a lei de Lambert-Beer (Equação 3), em que a absorbância é proporcional ao caminho ótico da cubeta utilizada para análise, a concentração e a absortividade molar da molécula [52]:

$$A = \varepsilon b c \quad (3)$$

De uma maneira geral, esse método quantifica resíduos básicos de aminoácidos, como arginina, lisina e histidina, que fazem parte da ligação para formação do complexo estável proteína-corante, que tem alto coeficiente de extinção, o que garante a sensibilidade do método [47].

Trata-se de um método simples, rápido, mais sensível e pouco suscetível a interferentes, quando comparado a outros como o de Lowry, que também é colorimétrico, à base do reagente Folin–Ciocalteu (mistura de fosfomolibdato, tungstanato e ácido fosfórico), seguido de tratamento alcalino em presença de cobre [53, 54].

A forma catiônica do Coomassie Brilliant Blue G-250, ou seja, não ligada à proteína, tem máximo de absorção em 470 nm, enquanto que na proteína em sua forma aniônica, o máximo encontra-se em 595 nm, comprimento de onda portanto usado na análise para determinação de quantidade de proteína [54].

Com a concentração de padrões de proteína variando entre 0 - 1,5 mg mL⁻¹, montou-se uma curva de calibração, monitorando-se o comprimento de onda 595 nm (Figura 6).
Análise feita em duplicata

Figura 8: Curva de calibração para determinação da concentração de BSA na amostra BSA-DFO. ua = unidades arbitrárias de absorvância.

Aplicando a função de regressão linear, obtém-se a Equação 4, com um coeficiente de correlação de 0,997:

$$y = -0,00912 + 0,23552 x \quad (4)$$

Analogamente, o teste foi realizado para o padrão de ovalbumina (Figura 7).

Figura 9: Curva de calibração para determinação da concentração de OVA na amostra OVA-DFO. ua = unidades arbitrárias de absorbância.

Aplicando a função de regressão linear, obtém-se a Equação 5, com um coeficiente de correlação de 0,990:

$$y = -0,00548 + 0,05703x \quad (5)$$

Por meio de tais curvas, foi possível determinar a concentração das proteínas nos estoques como sendo: [OVA-DFO] = 4,02 mg mL⁻¹ e [BSA-DFO] = 5,68 mg mL⁻¹.

A partir dessas soluções concentradas, foram preparadas soluções de concentração conhecida para os demais testes.

4.2 Espectroscopia Eletrônica

As amostras dos conjugados complexados com ferro foram analisadas por espectroscopia eletrônica no UV-Visível (Figura 8). Os máximos de absorção encontrados são 433 nm para [Fe(OVA-DFO)], 447 nm para [Fe(BSA-DFO)] e 435 nm para [Fe(DFO)].

Figura 10 – Espectro eletrônico na região do UV-Visível das amostras dos complexos [Fe(DFO)], [Fe(BSA-DFO)] e Fe(OVA-DFO)]

Os complexos [Fe(BSA-DFO)] e [Fe(OVA-DFO)] apresentam máximo de absorção em valores próximos ao [Fe(DFO)], o que indica reação entre os ligantes sintetizados e o metal. O espectro mostra que a proteína BSA causa pouca perturbação na formação do

complexo com ferro. No caso do $[\text{Fe}(\text{DFO})]$, sabe-se que acima de pH 3 o complexo é estável, com um λ_{max} de ~ 425 nm e um coeficiente de extinção ϵ de $2460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que se acredita ser causado por uma transferência de carga ligante-metal (TCLM) [55]. Nesse tipo de fenômeno, um elétron se desloca entre orbitais de caracteres predominantes distintos. No caso, especificamente, um elétron de um par isolado π do oxigênio é promovido a um orbital molecular com caráter predominantemente de orbital d do metal [56].

4.3 Quantificação de DFO através da titulação com calceína férrica

A calceína é um composto usado como sensor químico para ferro(III), uma molécula importante como um indicador fluorocrômico para metais. Semelhante ao EDTA, o composto orgânico possui um braço diaminotetraacético (Figura 8), capaz de reagir com ferro [49].

Figura 10- Estrutura química da calceína.

Quando não complexada, ela emite fluorescência em 520 nm, após ser excitada em 485 nm. Ao ligar-se com o ferro, a molécula tem sua fluorescência suprimida. Tal característica permite que seja possível a quantificação da estabilidade de um complexo metálico em relação ao complexo calceína-ferro [57].

O teste partiu da calceína já complexada com ferro, e se tentaria recuperar a fluorescência utilizando um quelante (DFO ou seus conjugados) com maior afinidade pelo metal. As constantes de estabilidade do complexo calceína-ferro (CAFe) e DFO-Fe são expressas pelas Equações 6 [58] e 7 [21], respectivamente:

É importante notar que a estequiometria da ligação calceína–ferro é 1:1, e a mesma da ligação DFO–ferro. Portanto, tanto a supressão quanto a regeneração de fluorescência da calceína podem ser diretamente relacionadas a uma concentração respectivamente maior ou menor de ferro. É esperado que a conjugação de DFO com a OVA ou BSA mantenha a capacidade quelante do DFO intacta. Sua interação com o complexo CAFe deveria portanto causar a dissociação deste, e se observaria a regeneração de fluorescência da calceína, de acordo com os mecanismos equacionados abaixo (Equações 8 e 9). Os biopolímeros de partida também foram estudados para efeito de comparação (Figura 9).

Figura 11– Recuperação da fluorescência da calceína, quando adicionados os quelantes DFO, OVA-DFO e BSA-DFO. As proteínas OVA e BSA originais também foram adicionadas para efeito comparativo. As concentrações de DFO para os conjugados são nominais, assumindo que cada molécula de proteína (concentrações determinadas no item pelo teste de Bradford) foi marcada com uma molécula de DFO.

Os biopolímeros sem o fármaco quelante, ou seja, BSA e OVA, não apresentam fluorescência, o que indica uma afinidade menor pelo ferro, quando comparados à calceína. Essa observação é compatível com o fato de que as cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas apresentam muitas vezes ambientes de coordenação interessantes para metais,

como por exemplo tiol (cisteína), carboxilatos (aspartato e glutamato) ou imidazol (histidina). Entretanto, as constantes de formação entre Fe(III) e tais sítios de coordenação são relativamente baixas, e várias ordens de grandeza inferiores às da calceína, que é da ordem de $10^{24} \text{ mol L}^{-1}$ [58]. Proteínas séricas, como por exemplo, a BSA, tem reconhecido papel como transportadores de íons metálicos livres, mas devem cedê-los prontamente a outras moléculas de maior afinidade [59].

O teste permite a determinação da quantidade de moléculas marcadas de proteínas que estão marcadas com a desferrioxamina. No ponto em que DFO livre provoca 50% de recuperação de fluorescência (Figura 3), caso houvesse a mesma concentração de DFO nos conjugados OVA-DFO e BSA-DFO, estes também deveriam apresentar a mesma porcentagem de recuperação de fluorescência. No entanto, as fluorescências de OVA-DFO e BSA-DFO nesse ponto são, respectivamente, ~4 vezes e 2 vezes menores. Pode-se inferir então que ao reagir a ovoalbumina com desferrioxamina, uma em cada quatro cadeias foi marcada. Analogamente, uma a cada duas proteínas de albumina bovina, uma delas está marcada com a desferrioxamina.

O glutaraldeído é um líquido de característica oleosa de fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ contendo dois grupos aldeídos (Figura 10).

Figura 12: Estrutura do glutaraldeído. Os dois grupos aldeído da cadeia são grupos eletrofílicos que podem reagir com aminas

Ambas as proteínas possuem diversos sítios nucleófilos reativos, como aminas, tióis, fenóis e imidazóis. O aminoácido mais reativo é a lisina, pois seu grupo ϵ -amino, uma amina primária, que frente ao glutaraldeído, reage formando uma base de Schiff, ou seja, uma imida [40]. De acordo com a base de dados online UniProtKB (*Protein knowledge base*; <http://www.uniprot.org>), a lisina consiste em 20 dos 386 aminoácidos de OVA, e em 60 dos 607 aminoácidos de BSA (sequências P01012 e P02769, respectivamente), mas a conformação das proteínas pode não permitir que todos esses sítios estejam disponíveis para que a reação ocorra. A desferrioxamina possui um grupo amino-terminal primário, que, assim como a lisina, pode reagir com o glutaraldeído.

Os resultados evidenciam a modificação das estruturas originais das proteínas pela conjugação com DFO e mostram que em ambos os casos, elas se tornaram agentes quelantes mais fortes que a calceína, frente ao ferro, o que evidencia a reação dos biopolímeros com o glutaraldeído e deste por sua vez com a desferrioxamina.

A baixa marcação da proteína com DFO pode ser explicada não só pela estrutura secundária da proteína impedir estericamente a reação com glutaraldeído, mas também pelo fato desta ser um agente de *crosslink*. Trata-se um composto usado amplamente em reações com proteínas, ou seja, a molécula é capaz de promover uma ligação entre duas proteínas, ou até mesmo entre aminoácidos presentes na própria proteína [60]. Um experimento para determinação da massa molar da amostra foi realizado pela técnica de espectrometria de massas, MALDI, porém com resultados que indicam a formação de dímeros, que serão explicadas com mais detalhes no item 3.3.6.

Considerando que há influência de fatores conformacionais, e da natureza do glutaraldeído como agente de *crosslink*, pode-se dizer que os dados obtidos indicam que os resultados obtidos pela titulação com CAFé são coerentes com o esperado.

4.4 Avaliação de potencial antioxidante dos conjugados

A atividade antioxidante dos compostos foi determinada pelo seu efeito sobre o sistema ferro/ascorbato. O ascorbato atua como um reagente pró-oxidante, que propicia a formação de radicais, catalisada por ferro. Sua detecção é feita por meio de uma sonda fluorimétrica sensível, a diidrorodamina 123 (DHR). Essa molécula em sua forma reduzida não apresenta fluorescência, mas em presença de espécies reativas de oxigênio, forma-se o cátion rodamina 123, que é fluorescente. Tal comportamento permite a detecção de formação de EROs.[48], conforme Figura 11:

Figura 13 – (a) Reação da DHR (sonda não fluorescente) para formação da Rodamina, que é a forma fluorescente. O ascorbato atua como agente pró-oxidante, que em presença de

Fe^{3+} , inicia a produção de ERO's, responsável pela conversão das sondas. (b) Curvas cinéticas de fluorescência da rodamina. Variando-se a concentração de ferro, pode-se calcular a taxa de fluorescência por meio do coeficiente angular do gráfico. Uma vez que a taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração de Fe, é possível determinar a concentração do metal [61].

No experimento, a concentração de ferro foi mantida constante, a fim de comparar o comportamento da oxidação da DHR, em presença dos ligantes (Figura 12).

Figura 14: Capacidade antioxidante dos ligantes DFO, BSA-DFO e OVA-DFO

Conforme se aumenta a concentração dos ligantes, há uma queda da taxa de fluorescência, o que significa uma diminuição na velocidade de oxidação da sonda DHR (e,

portanto, um aumento da capacidade antioxidante do composto). Os dados foram corrigidos para a concentração real de DFO. O decaimento em presença de OVA-DFO é menos acentuado, quando comparado aos outros ligantes, o que indica uma menor capacidade antioxidante, uma vez que para uma mesma concentração de ligante, a diminuição da taxa de fluorescência é menor. Já o BSA-DFO é um antioxidante com capacidade semelhante à desferrioxamina, ou seja, está dentre as características desejadas para o composto sintetizado.

O padrão de ferro pró-oxidante deste teste é o complexo nitrilotriacetato férrico, Fe(NTA). Portanto, a fim de exercer atividade antioxidante, os complexantes devem conseguir remover o íon metálico desse complexo (de forma análoga ao que ocorreu no teste com a sonda CAFE). Neste experimento, as concentrações de DFO foram normalizadas, o que significa que, para OVA-DFO, havia cerca de 2x mais proteína do que no caso do conjugado BSA-DFO. Esse excesso de proteína pode ter dificultado a interação do Fe(NTA) com o sideróforos em OVA-DFO. Outra possibilidade seria o fato de que o sideróforo em OVA-DFO esteja em um ambiente químico menos acessível do que o do BSA-DFO ou DFO livre, embora isso também devesse ter perturbado a interação OVA-DFO com CAFE.

Complementarmente, a BSA possui 239 aminoácidos com possível reação com glutaldeído, conforme Tabela 3, enquanto a OVA possui 132. A albumina bovina possui três vezes mais resíduos de lisina que a ovalbumina.

4.5 Eletroforese em gel

A eletroforese em gel é uma técnica que permite que moléculas carregadas, quando expostas a um campo elétrico e uma diferença de potencial, sejam separadas de acordo com a razão massa/carga.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (também denominada PAGE, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), é muitas vezes executada em condições desnaturantes, para que apenas a massa molecular da proteína (e não efeitos hidrodinâmicos) seja responsável pela sua separação no gel [62]. Nestes casos, utiliza-se o SDS (dodecilsulfato de sódio) como detergente aniônico, capaz de desnaturar as proteínas. Tal molécula interage com a proteína formando uma micela carregada negativamente.

Após a eletroforese, as amostras foram coradas com Coomassie blue solubilizado em metanol, ácido acético e água.

Foi necessária uma otimização de alguns parâmetros para a realização do teste, e para isso foi necessária a montagem de uma corrida em gel específica para essa finalidade. Primeiramente, utilizaram-se géis de espessura de 1,0 mm, em que as amostras dispersaram lateralmente para fora da canaleta, enquanto que para 1,5 mm, observou-se melhor resolução das bandas.

Quanto à concentração das proteínas, as amostras de concentrações de 0,05 até 0,125 mg/mL de BSA apresentaram 14 bandas (Figura 13) após uma corrida de 2h40, com a adição de 10 minutos após a saída do tampão de amostra. Entre 0,05 e 0,75 mg mL⁻¹ houve melhor equilíbrio entre separação e intensidade de bandas. Apesar da amostra de 0,025 mg/mL apresentar melhor separação das primeiras bandas, as finais não podem ser observadas no gel.

Já em relação ao teste com OVA, foram identificadas quinze bandas (Figura 13). As amostras com 0,075 mg apresentaram melhor separação e resolução das bandas.

Figura 15– SDS PAGE para diferentes concentrações de proteínas OVA-DFO e BSA-DFO para otimização de concentração de análise.

Um dos géis foi submetido à luz ultravioleta por alguns minutos (Figura 14). Algumas bandas de amostras com maior massa ficaram aparentes, principalmente o BSA, mas as outras bandas não ficaram visíveis. É esperado que as proteínas, tanto a ovoalbumina quanto a albumina bovina apresentem fluorescência natural quando expostas a tal irradiação, uma vez que possuem em suas cadeias triptofano, que é bastante fluorescente. Sua frequência de em ambas as proteínas, entretanto, é de apenas três resíduos [63].

Figura 16– Gel exposto à luz ultravioleta. As amostras mais concentradas apresentam fluorescência, uma vez que as proteínas possuem resíduos de triptofano.

Com base nos resultados obtidos, escolheu-se a concentração de trabalho de proteína de 0,05 mg/mL.

Foram realizados dois testes, com diferentes tempos de corrida. O tempo de análise do Gel 1 foi 1 hora após a saída do tampão de amostra, enquanto que o Gel 2 correu por 30 min, ambos a 100 V (Figuras 15-16).

Figura 17: SDS-PAGE das amostras de OVA e OVA-DFO, em concentração 0,05 mg/mL, em corrida de uma hora

Figura 18: SDS-PAGE das amostras de BSA e BSA-DFO, em concentração 0,05 mg/mL, em corrida de meia hora

Em ambos os casos se observou diferença da mobilidade e das bandas das proteínas originais e seus conjugados, o que sinaliza a mudança de estrutura por conta da reação de conjugação. Especificamente, pode-se observar uma maior quantidade de proteínas de maior massa molecular (mais próximas à origem do gel) nos casos em que houve conjugação. A massa molecular do DFO, cerca de 600 g/mol, não é suficiente para explicar essa observação. O que pode ter ocorrido é que parte das moléculas de proteína se dimerizaram durante o procedimento de conjugação mediado por glutaraldeído. No final da corrida da OVA, observa-se uma banda que não está presente da corrida do OVA-DFO, provavelmente uma impureza que deve ter reagido ao adicionar glutaraldeído.

Uma evidência para esse fenômeno originou-se de um teste de espectroscopia de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MS-MALDI) usando o ácido sinapínico como matriz. As amostras de OVA-DFO ou BSA-DFO foram diluídas em 20, 30, 50 e 100 vezes, porém nenhuma delas gerou um sinal, o que indica a possível formação de dímeros [41], pois o glutaraldeído é um agente de *crosslink*. Com o aumento da massa polimérica, o laser torna-se ineficiente para fazer a volatilização das moléculas. A técnica permite que razões de massa/carga maiores sejam detectadas, porém é necessária a calibração adequada para tal situação, como calibrante um dímero de BSA [64].

4.6 Dicroísmo Circular

Esta técnica consiste em irradiar uma amostra com um feixe de luz circularmente polarizado, a fim de verificar se há absorção diferenciada em função da direção de polarização e, portanto, determinar sua quiralidade. A leitura é feita pela resultante de dois vetores, que resultam em círculos, que rotacionam em sentido horário ou anti-horário. As ondas estão em 90 graus fora de fase. Quando as moléculas de proteína, intrinsecamente assimétricas, interagem com a luz polarizada na região do ultravioleta, elas podem absorvê-

la em diferentes graus. O CD ($\Delta\epsilon$) se dá pela soma da adição dos vetores, como demonstrado na Equação 10:

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_L(\lambda) + \epsilon_R(\lambda) \quad (10)$$

onde ϵ_L e ϵ_R correspondem aos coeficientes de extinção das polarizações anti-horária e horária, respectivamente, a um determinado comprimento de onda λ .

A elipticidade molar é outra medida também proporcionada por CD definida pela Equação 11:

$$[\theta] = \frac{100 \theta}{c l} \quad (11)$$

Em que C é a concentração molar e l é o caminho ótico da cubeta. A relação entre ambas as medidas podem ser convertidas em $\text{deg cm}^2 / \text{dmol} = 3298\Delta\epsilon$ [65, 66].

O CD é usado largamente para a elucidação das estruturas secundárias de proteínas, pois o espectro é dependente da conformação do biopolímero, uma vez que as transições eletrônicas dos polipeptídeos em diferentes conformações dão origem a um espectro de absorção [67].

As amostras OVA, OVA-DFO, OVA-DFO-Fe, BSA, BSA-DFO e BSA-DFO-Fe foram submetidas a essa análise, conforme as Figuras 17-22.

Figura 19 - Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra BSA em concentração de proteína 1,42 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Figura 20 - Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra BSA-DFO em concentração de proteína 1,42 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Figura 21- Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra BSA-DFO-Fe, em concentração de proteína 1,42 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Figura 22- Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra OVA em concentração de proteína 1,00 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Figura 23 - Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra OVA-DFO em concentração de proteína 1,00 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Figura 24- Espectro de Dicroísmo Circular da Amostra OVA-DFO-Fe, em concentração de proteína 1,00 mg/mL, em tampão HBS, pH = 7,4

Por meio da ferramenta Dichroweb, disponível online, foi possível determinar alguns parâmetros da estrutura secundária dos compostos sintetizados, comparando com suas matrizes não modificadas. Mantido pelo Departamento de Cristalografia do Birkbeck College, Universidade de Londres, trata-se de uma ferramenta que utiliza algoritmos como o CONTINLL, SELCON3, CDSSTR, VARSLC e K2D, que são capazes de elucidar a estrutura secundária por meio dos dados introduzidos, fazendo o uso de bases de dados cristalográficas [67]. Os dados dos nossos espectros foram tratados pelo algoritmo SELCON3 para elucidar a análise da estrutura secundária das proteínas.

Os resultados obtidos revelam as proporções dos elementos das estruturas secundárias das proteínas modificadas e não modificadas, com valores percentuais, detalhados na Tabela 2. A análise permitiu elucidar seis estruturas secundárias, ou seja, a conformação local de seu esqueleto, para cada amostra, sendo elas as α -hélices (divididas em duas subclasses: α -hélice regular (α_R) e distorcida (α_D)), folhas β pregueadas (também dividida entre regular (β_R) e distorcida (β_D)), voltas indefinidas (*turns*), além de partes desordenadas, que são aminoácidos que não formam nenhum tipo de estrutura secundária.

Estima-se que um a cada quatro resíduos de uma cadeia de conformação α -hélice são responsáveis pela distorção, assim como um a cada dois resíduos no caso das folhas β pregueadas. Tanto a α -hélice quanto a folha β , são caracterizadas pelos ângulos diedros ϕ e ψ . O ângulo ϕ corresponde ao ângulo da ligação C-N de cada um dos aminoácidos, enquanto o ψ corresponde à ligação C-C. Os valores típicos para α -hélices e folha β são $(-57^\circ, -47^\circ)$ e $(-120^\circ, -120^\circ)$ respectivamente.

Além dos ângulos, a α -hélice é caracterizada por conter 3,6 resíduos de aminoácidos por volta, a uma distância de 5,4 Å [68].

A forma distorcida das α -hélices é geralmente atribuída à presença de prolina na estrutura, que faz com que haja um impedimento estérico entre resíduos, fazendo com que a estrutura helicoidal tenha uma distorção e enfraquecimento da ligação de hidrogênio [69].

Os *turns* são caracterizados por diversos ângulos diedros, em sucessivos resíduos, sem a necessidade de haver ligação de hidrogênio.

As proteínas globulares como a ovoalbumina e albumina bovina são constituídas em média por cerca de 31% de α -hélice e 28% de folha β [68].

A soma das proporções das estruturas secundárias pode variar, passando dos 100% pois o algoritmo usa aproximações nos cálculos das proporções individuais, fazendo com que o erro se propague até a soma de todas as contribuições.

Tabela 4. Proporção (%) dos elementos de estruturas secundárias das amostras de BSA, BSA-DFO, BSA-DFO-Fe, OVA, OVA-DFO e OVA-DFO-Fe calculadas pelo método SELCON3.

Amostra	α_R (%)	α_D (%)	β_R (%)	β_D (%)	Turns	Desord.	Total
BSA	46	14	7	6	9	19	101
BSA-DFO	36	6	17	12	7	21	99
BSA-DFO-Fe	45	13	8	7	7	21	101
OVA	43	10	14	10	6	19	102
OVA-DFO	41	9	13	11	7	20	101
OVA-DFO-Fe	22	3	24	15	16	19	99

Os resultados da Tabela mostram que os polipeptídios, tanto a ovoalbumina (OVA) quanto a albumina bovina (BSA), tiveram sua conformação mudada após a reação com a desferrioxamina, uma vez que se observa variação da proporção das diferentes estruturas secundárias.

A formação clássica da estrutura de α -hélice se dá pela ligação de hidrogênio entre os grupos C=O de um resíduo com o grupo N-H de quatro resíduos posteriores na cadeia proteica [69]. A reação entre o grupo amina dos peptídeos e o glutaraldeído pode romper esse tipo de interação, ocasionando uma diminuição da proporção desse elemento estrutural na molécula, além do fato do glutaraldeído ser um agente de cross-link entre proteínas e provocar a dimerização de proteínas conforme sugerido no teste de espectrometria de massas por MALDI e eletroforese. A presença de DFO (altamente hidrofílico) perturba a vizinhança química e expõe mais a proteína ao contato com o solvente. Espera-se também que haja variação da quantidade de estruturas do tipo folha β -pregueada, uma vez que o ligante também pode provocar mudanças na geometria nesse tipo de estrutura secundária, portanto a variação podendo ser positiva ou negativa da porcentagem. O programa SELCON define as voltas indefinidas e desordenadas como estruturas que estão presentes devido a ligações de hidrogênio, ou conformações que estejam posicionadas ao menos de 70° da cadeia do polipeptídeo.

O ferro provoca também mudanças nas estruturas secundárias de ambas as proteínas, quando adicionados aos ligantes, uma vez que se há quelação com metal, espera-se que as interações entre aminoácidos mudem.

4.7 Reação com Gd(III) para formação dos complexos BSA-DFO-Gd

Basicamente, em termos físicos, pode-se explicar o fenômeno da ressonância magnética por meio do comportamento do spin nuclear, responsável pela geração de um momento angular de rotação. O número de estados de spin é quantizado e pode ser determinado pelo número quântico de spin nuclear.

Na ausência de campos magnéticos aplicados, todos os estados de spin de um determinado núcleo têm a mesma energia, ou seja, são degenerados, possuem população

igual em todos os estados. Na presença de um campo magnético aplicado, há alinhamento dos momentos magnéticos dos núcleos. Na presença de um campo magnético externo B_0 os núcleos executam um movimento de precessão com uma frequência angular (ω , frequência de Larmor) proporcional ao campo. Irradiando esses núcleos com radiação eletromagnética de mesma frequência, ocorre absorção de energia, mais comumente chamada de ressonância, com mudança de spin $+\frac{1}{2}$ para $-\frac{1}{2}$. A ressonância magnética é uma técnica fundamental utilizada em química, com larga aplicação também em medicina [70].

Antes da década de 1970, havia poucas técnicas médicas que permitiam a obtenção de informações e diagnósticos. Até então somente técnicas com raios-X eram comuns, capazes de proporcionar imagens de ossos, mas não de tecidos moles, que são transparentes a esse tipo de radiação. Frente a outros comprimentos de onda, como ultravioleta, micro-ondas e infravermelho, o resultado é uma imagem opaca, porém em comprimentos maiores, como ondas de rádio, que é a radiação usada na ressonância magnética, observa-se permeação. A intensidade do campo aplicado em seres humanos varia entre 0,02 e 5 T [43, 70].

Complexos de gadolínio são comumente utilizados como agentes de contraste (AC) para aquisição de imagens por ressonância magnética. Cerca de 35% dos diagnósticos atuais contam com o uso de tais compostos. Dentre as aplicações típicas se destacam estudo da perfusão de órgãos, avaliação da função renal e fisiologia da barreira hematoencefálica. O gadolínio é um lantanídeo que apresenta alto grau de paramagnetismo, uma vez que possui sete elétrons desemparelhados. O íon Gd^{3+} não tem função biológica conhecida em mamíferos, apresentando alta toxicidade, e por isso é administrado em sua forma quelada. Os agentes de contraste que existem hoje no mercado têm propriedades farmacocinéticas semelhantes, sendo distribuídos no fluido extracelular e eliminados via filtração glomerular [43].

Os agentes de contraste causam um aumento da taxa de relaxação do próton da água, o que permite melhor visualização e resolução da imagem, com a intensificação do sinal. Com um ou dois sítios de coordenação livres para ligação com a água, tais moléculas atuam no tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2), característica principal para se avaliar a eficácia da molécula nessa função [42]. Fisicamente, pode-se dizer que se trata dos tempos necessários para o retorno à distribuição de Boltzman de equilíbrio entre os diferentes estados de spin. O valor de T_1 está relacionado diretamente à magnetização do próton, a um pulso de 180° como mostrado na Equação 12 [70]:

$$M = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (12)$$

T_1 é portando o tempo necessário para que haja o retorno ao momento magnético inicial. O seu valor referente à água pura é de 3 s. A distância média entre essas moléculas no organismo é cerca de $1,5 \times 10^{-10}$ m. Quando um próton tem um momento magnético, é gerado um campo magnético na vizinhança na magnitude 5×10^{-4} T, de valor variável por conta da mobilidade das moléculas de água, também denominado tempo de correlação.

Já T_2 é o tempo de relaxação em 90° em relação ao campo magnético aplicado, ou seja o momento em que o campo é perpendicular à magnetização. O decaimento é transversal e decresce longitudinalmente. Para a molécula de água $T_1 = T_2$ [70].

Para o planejamento de novos AC's, dois fatores são importantes por aumentar suas relaxações: o número de águas ligadas ao complexo (q) e o tempo de reorientação rotacional (τ). O maior problema relacionado à coordenação de muitas moléculas de água é a diminuição da estabilidade termodinâmica do quelato e o consequente aumento da toxicidade pela maior quantidade de Gd^{3+} livre liberada no organismo [43].

T_1 e T_2 foram determinados por meio das técnicas de Inversion-Recovery (IR) e Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), respectivamente e estão representadas nas Figuras 23-25

A técnica de CPMG se baseia no uso de sequência de pulsos, na espectroscopia por ressonância magnética (RMN). Primeiramente aplica-se tal sequência no eixo x, de 90° , em um tempo τ , no qual há máxima intensidade. Em seguida é aplicado uma sequência de pulsos a 180° no eixo y, separado por um tempo 2τ . O motivo para uso de tal técnica é fazer com que ecos, causados pela aplicação de um campo magnético não homogêneo não interfiram na determinação de T2 [71].

Já técnica por Inversão de Recuperação permite a determinação de T1, em que aplica-se um pulso π que inverte a magnetização inicial do equilíbrio térmico no eixo z, em 180° , até que ela retorne gradualmente ao eixo original, em um tempo t. São feitas várias medidas, variando-se os valores de t, obtendo-se uma evolução temporal da magnetização, e consequentemente, valores de T1 (Equação 12) [72].

Figura 25 : Sinais de CPMG para diferentes concentrações do complexo BSA-DFO-Gd

A técnica CPMG permite a obtenção da curva de decaimento exponencial do tempo de relaxação T_2 da amostra BSA-DFO-Gd em três diferentes concentrações, descritos na Tabela 2. Conforme esperado, com o aumento da concentração de ligante, aumenta-se a eficiência da relaxação, uma vez que o tempo de relaxação é maior. A partir desses dados, por meio do software Origin® 7.0, ajustou-se as curvas, para cada uma das distintas concentrações, com a função de decaimento exponencial de primeira ordem (Equação 13):

$$y = y_0 + Ae^{\frac{x}{t}} \quad (13)$$

Em que A é a amplitude, y_0 a variação de intensidade e t é o valor de T_2 . A partir de tais dados, montou-se uma curva de calibração (Figura 24)

Tabela 2 – Tempos de relaxação transversal obtidos por meio da análise CPMG

[BSA-DFO-Gd] (mmol L ⁻¹)	T_2 (ms)	R^2
20	565,9 ± 0,04	0,99
15	650,3 ± 0,07	0,99
10	806,7 ± 0,08	0,99

A relaxatividade r do material pode ser determinada pelo coeficiente angular da regressão linear gerada pelo gráfico da velocidade de relaxação em função da concentração da amostra (Equação 14, Figura 24) [73].

$$\frac{1}{t_i} = \frac{1}{t_{i0}} + r[BSA - DFO - Gd] \quad (14)$$

Em que t_{i0} corresponde ao tempo de relaxação do solvente. Como resultado a Equação 15 é obtida

$$y = 52,92 x + 0,722$$
(15)

Figura 26 - Relações de 1/T2 para as amostras de BSA-DFO-Gd

Para determinação de T1, utilizou-se os dados obtidos por meio da recuperação invertida.

Figura 27: Sinais de IR para diferentes concentrações do complexo BSA-DFO-Gd

Por meio da análise é possível determinar o tempo de relaxação longitudinal. As curvas obtidas com os sinais de IR sofreram também ajuste exponencial, porém diferentemente da análise por CPMG, aqui o ajuste foi de primeira ordem obtendo-se também a Equação 9, em que t é representado para T_1 para as diferentes concentrações de amostras, conforme Tabela 3. Para cada uma das curvas, ou seja, para cada concentração aplica-se a função exponencial Fit Fil ExpGro 1, disponível pelo software Origin®, dentre os parâmetros encontrados, um dos valores encontrados é o tempo de relaxação longitudinal.

Tabela 5 – T_1 para amostras de BSA-DFO-Gd em diferentes concentrações

[BSA-DFO-Gd] (mmol L ⁻¹)	T1 (ms)	R2
20	596,1 ± 7,4	0,99
15	699,8 ± 5,9	0,99
10	817,1 ± 4,1	0,99

Figura 28: Relações de $1/T_1$ para as amostras de BSA-DFO-Gd

De maneira análoga à análise de CPMG, foi determinada Equação para T_1 , por meio de ajuste linear (Equação 16).

$$y = 45,37 x + 0,763 \quad (16)$$

Neste caso, a relaxatividade calculada é $52,92 \text{ s}^{-1}\text{m M}$ para T2 e $45,37 \text{ s}^{-1}\text{m M}$ para T1, um valor bem superior aos fármacos disponíveis no mercado, como o gadopentetato dimeglumina (Magnevist), gadoterato meglumina (Dotarem), gadoteridol (ProHance), e gadodiamida (Omniscan), Gadoversetamida (Optimark) e Gadobenato dimeglumina (MultiHance) (Figura 29), que apresentam relaxividade entre $4 \text{ e } 5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [42]. Quanto maior a relaxatividade, menor é a dose de contraste a ser administrada para se obter o mesmo efeito.

Figura 29: Estruturas dos fármacos disponíveis no mercado, gadopentetato dimeglumina (Magnevist), gadoterato meglumina (Dotarem), gadoteridol (ProHance), e gadodiamida (Omniscan), Gadoversetamida (Optimark) e Gadobenato dimeglumina (MultiHance) [74].

5. Conclusões

As sínteses dos ligantes BSA-DFO e OVA-DFO foram bem sucedidas, uma vez que os testes realizados indicam a presença e formação do conjugado.

As análises por dicroísmo circular revelam que tanto a ovoalbumina quanto a albumina bovina tiveram sua conformação mudada após a reação com a desferrioxamina, uma vez que há variação da proporção das estruturas secundárias, com possível dimerização, conforme indicado pelo teste por dicroísmo circular e MALDI, respectivamente. A eletroforese indica que houve mudança de mobilidade das moléculas, bem como do número de bandas, resultados que corroboram a existência de reação.

A formação do complexo com ferro foi verificada por meio da análise por espectroscopia eletrônica, uma vez que as moléculas apresentam máximos de absorção na região do visível, típica de formação de complexos onde há transferência de carga em comprimentos de onda próximos ao [Fe(DFO)].

O teste de titulação com calceína férrica mostrou que apenas parte dos biopolímeros foi marcada pela desferrioxamina, ou seja, 25% das proteínas de ovalbumina e 50% das proteínas de albumina bovina sofreram reação com o fármaco.

Em relação à atividade antioxidante, o conjugado BSA-DFO demonstra comportamento oxidante semelhante à DFO, enquanto o ligante OVA-DFO apresenta menor capacidade.

Com sua alta massa molecular e com comportamento químico semelhante ao da desferrioxamina, a BSA-DFO é uma molécula candidata a substituir o fármaco, possivelmente aumentando a sua biodisponibilidade no organismo humano. Adicionalmente, o BSA-DFO tem um potencial para atuar também como um agente de contraste em ressonância magnética nuclear, uma vez que é capaz de reagir também com Gd(III). Os resultados de relaxação revelam desempenho superior ao que há hoje disponível no mercado.

6. Bibliografia

1. Baker, H.M., B.F. Anderson, and E.N. Baker, *Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(7): p. 3579-3583.
2. Andrews, N.C., *Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models*. Nature Reviews Genetics, 2000. **1**(3): p. 208-217.
3. Mair, S.M. and G. Weiss, *New Pharmacological Concepts for the Treatment of Iron Overload Disorders*. Current Medicinal Chemistry, 2009. **16**(5): p. 576-590.
4. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. Transfusion Science, 2000. **23**(3): p. 185-192.
5. Evans, R.W., et al., *Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2008. **13**(1): p. 57-74.
6. Shvartsman, M., et al., *Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **293**(4): p. C1383-C1394.
7. Kakhlon, O. and Z.I. Cabantchik, *The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(8): p. 1037-1046.
8. Cabantchik, Z.I., *Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology*. Frontiers in Pharmacology, 2014. **5**.
9. Kehrer, J.P., *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity*. Toxicology, 2000. **149**(1): p. 43-50.
10. Lemire, J.A., J.J. Harrison, and R.J. Turner, *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. Nature Reviews Microbiology, 2013. **11**(6): p. 371-384.
11. Wang, L.K., et al., *Antioxidative Dietary Compounds Modulate Gene Expression Associated with Apoptosis, DNA Repair, Inhibition of Cell Proliferation and Migration*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(9): p. 16226-16245.
12. Anderson, G.J., *Mechanisms of iron loading and toxicity*. American Journal of Hematology, 2007. **82**(12): p. 1128-1131.
13. Fucharoen, S., et al., *Clinical manifestation of beta-thalassemia/hemoglobin E disease*. Journal of Pediatric Hematology Oncology, 2000. **22**(6): p. 552-557.
14. Esposito, B.P., et al., *Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients*. European Journal of Clinical Investigation, 2002. **32**: p. 42-49.
15. Rangel, E.B., et al., *Labile Plasma Iron Generation After Intravenous Iron is Time-dependent and Transitory in Patients Undergoing Chronic Hemodialysis*. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2010. **14**(2): p. 186-192.
16. Rivella, S., *Ineffective erythropoiesis and thalassemias*. Current Opinion in Hematology, 2009. **16**(3): p. 187-194.
17. ABRASTA. *Números da talassemia no Brasil*. 10/11/2016]; Available from: <http://www.abrasta.org.br/estatisticas-talassemia>.
18. Kontoghiorghes, C.N. and G.J. Kontoghiorghes, *Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-*

- transfusion-dependent thalassemia syndromes*. Drug Design Development and Therapy, 2016. **10**: p. 465-481.
19. Dehghan, G., et al., *Interaction of human serum albumin with Fe(III)-deferiasirox studied by multispectroscopic methods*. Journal of Luminescence, 2014. **149**: p. 251-257.
 20. Kwiatkowski, J.L., *Real-world use of iron chelators*. Hematology, 2011. **2011**: p. 451-458.
 21. 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.
 22. Janssen, M.C.H. and D.W. Swinkels, *Hereditary haemochromatosis*. Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology, 2009. **23**(2): p. 171-183.
 23. Raymond, K.N., G. Muller, and B.F. Matzanke, *Complexation of Iron by Siderophores - a Review of Their Solution and Structural Chemistry and Biological Function*. Topics in Current Chemistry, 1984. **123**: p. 49-102.
 24. Franchini, M., *Recent acquisitions in the management of iron overload*. Annals of Hematology, 2005. **84**(10): p. 640-645.
 25. Hedlund, B.E. and P.E. Hallaway, *Fluid resuscitation*, I. Biomedical Frontiers, Editor. 1995.
 26. Vugts, D.J., G.W.M. Visser, and G. van Dongen, *Zr-89-PET Radiochemistry in the Development and Application of Therapeutic Monoclonal Antibodies and Other Biologicals*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013. **13**(4): p. 446-457.
 27. Liu, X.S., et al., *Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of iron recovery from the ferritin mineral*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(44): p. 31821-31825.
 28. Radchenko, V., et al., *Nb-90 - a potential PET nuclide: production and labeling of monoclonal antibodies*. Radiochimica Acta, 2012. **100**(11): p. 857-863.
 29. Zeglis, B.M., et al., *Enzyme-Mediated Methodology for the Site-Specific Radiolabeling of Antibodies Based on Catalyst-Free Click Chemistry*. Bioconjugate Chemistry, 2013. **24**(6): p. 1057-1067.
 30. Baird, S.K., T. Kurz, and U.T. Brunk, *Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization*. Biochemical Journal, 2006. **394**: p. 275-283.
 31. Meijs, W.E., et al., *A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes*. Nuclear Medicine and Biology, 1996. **23**(4): p. 439-448.
 32. Sans, M.Q., et al., *Myeloperoxidase activity imaging using Ga-67 labeled substrate*. Molecular Imaging and Biology, 2005. **7**(6): p. 403-410.
 33. Torchilin, V.P., et al., *Chelating Polymer-Modified Monoclonal-Antibodies for Radioimmunodiagnostics and Radioimmunotherapy*. Journal of Controlled Release, 1993. **24**(1-3): p. 111-118.
 34. Janoki, G.A., J.F. Harwig, and W. Wolf, *Labeling Studies of Proteins Using Bifunctional Chelates - the Desferrioxamine-Human Serum-Albumin (Df-Hsa) Conjugate*. Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 1982. **19**(11-1): p. 1405-1407.
 35. Loban, A., R. Kime, and H. Powers, *Iron binding antioxidant potential of plasma albumin*. Clinical Science, 1997. **93**(5): p. 445-451.
 36. Huntington, J.A. and P.E. Stein, *Structure and properties of ovalbumin*. Journal of Chromatography B, 2001. **756**(1-2): p. 189-198.
 37. Ngarize, S., et al., *Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated ss-lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(21): p. 6470-6477.
 38. Abeyrathne, E., H.Y. Lee, and D.U. Ahn, *Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review*. Poultry Science, 2013. **92**(12): p. 3292-3299.
 39. Thamwattana, N., D. Baowan, and B.J. Cox, *Modelling bovine serum albumin inside carbon nanotubes*. Rsc Advances, 2013. **3**(45): p. 23482-23488.
 40. Migneault, I., et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 790-+.

41. Silva, C., et al., *Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde*. Food Technology and Biotechnology, 2004. **42**(1): p. 51-56.
42. Silva, S.R., et al., *Gadolinium(III) Complexes with N-Alkyl-N-methylglucamine Surfactants Incorporated into Liposomes as Potential MRI Contrast Agents*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2015.
43. Gielen, M. and E.R.T. Tiekink, *Metallotherapeutic Drugs & Metal-based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*. 2005: John Wiley & Sons Ltda.
44. Vlasov, G., *Biodegradable and Biocompatible Carbon-Chain Polymer-Protein Conjugates as Carriers of Biologically Active Substances: Problems of Synthesis, Risks of Application and How to Overcome Them*, in *Silicon Versus Carbon - Fundamental Nanoprocesses, Nanobiotechnology and Risks Assessment*, Y. Magarshak, S. Kozyrev, and A.K. Vaseashta, Editors. 2009, Springer Science. p. 341-352.
45. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed. 2008, Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.
46. Zumstein, L., *Dialysis*. *Current Protocols in Protein Science*. 00:3B:A.3B.1–A.3B.4. 2001: Wiley.
47. Bradford, M.M., *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
48. Esposito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2670-2677.
49. Esposito, B.P., et al., *A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids*. Analytical Biochemistry, 2002. **304**(1): p. 1-18.
50. Bio-Rad, *Bio-Rad Bulletin 9413. Acrylamide and bis-acrylamide solutions. Instructions for use*.
51. Bio-Rad, *Bio-Rad Bulletin 6040. A guide to polyacrilamide gel electrophoresis and detection*.
52. Skoog, D.A., et al., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9 th Ed ed. 2014, Belmont: Brooks/Cole.
53. Lowry, O.H., et al., *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. Journal of Biological Chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-275.
54. Walker, J.M., *Basic protein and peptide protocols*. 1994, Totowa: Humana Press.
55. Monzyk, B. and A.L. Crumbliss, *Kinetics and Mechanism of the Stepwise Dissociation of Iron(III) from Ferrioxamine-B in Aqueous Acid*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(18): p. 4921-4929.
56. Dominguez-Vera, J.M., *Iron(III) complexation of Desferrioxamine B encapsulated in apoferritin*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004. **98**(3): p. 469-472.
57. Molecular Probes, *The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling* 2016, Molecular Probes.
58. Breuer, W., S. Epsztejn, and Z.I. Cabantchik, *Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II)*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(41): p. 24209-24215.
59. Topala, T., et al., *Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes*. Clujul Medical, 2014. **87**(4): p. 215-219.
60. Pawley, J.B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3rd ed. 2006, Boston: Springer.
61. Esposito, B.P., *Toxicidade de Metais Essenciais: Os casos do Ferro e do Manganês. Tese de Livre Docência*, in *Instituto de Química*. 2011, Universidade de São Paulo: São Paulo.
62. Wilson, K. and J. Walker, *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7th ed. 2010, Cambridge: Cambridge University Press.
63. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. 2006, Boston: Springer. 529-575.
64. Lapolla, A., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, enzymatic digestion, and molecular modeling in the study of nonenzymatic glycation of IgG*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(2): p. 153-159.
65. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nature Protocols, 2006. **1**(6): p. 2876-2890.
66. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Computation and analysis of protein circular dichroism spectra*. Methods in Enzymology, 2004. **383**: p. 318-351.
67. Dichroweb. *Dichroweb - On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra*. 10/11/2016]; Available from: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.

68. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 2011, Hoboken: John Wiley & Sons.
69. Sreerama, N., S.Y. Venyaminov, and R.W. Woody, *Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy*. *Protein Science*, 1999. **8**(2): p. 370-380.
70. Gillies, R.H., *NMR in Physiology and Biomedicine*. 1994, San Diego: Academic Press.
71. Carvalho, A.S., *Análises de parâmetros físicos e químicos por ressonância magnética nuclear em baixo campo*, in *Instituto de Química - UFSCar*. 2016: São Carlos.
72. Monaretto, T., *Desenvolvimento de aplicação de pulsos CWPF com alternância de fase em RMN no domínio do tempo*, in *Instituto de Química - UFSCar*. 2016: São Carlos.
73. Rohrer, M., et al., *Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths*. *Investigative Radiology*, 2005. **40**(11): p. 715-724.
74. Kahakachchi, C.L. and D.A. Moore, *Speciation of gadolinium in gadolinium-based magnetic resonance imaging agents by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009. **24**(10): p. 1389-1396.

SÚMULA CURRICULAR

Camila Cristina de Lima Castro

Data de Nascimento: 13/03/1990

São Paulo

Formação

02/2008 – 12/2012 Bacharelado em Química Tecnológica pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP – Campinas, SP

01/2005 – 12/2007 Colégio Albert Sabin – São Paulo, SP

Experiência Profissional

06/2013- Atual AkzoNobel – São Bernardo do Campo, SP, Brasil
Cargo: Especialista em Assuntos Regulatórios

08/2011 – 01/2012 Merck KGaA – Darmstadt, Alemanha
Cargo: Estagiária - Performance Materials

Experiência Acadêmica

02/2011-02/2012 Intercâmbio Acadêmico na Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Alemanha

Projeto: “ Electrospinning for the Synthesis of Micro-structured Materials and Deposition in Semiconductors”

Orientação: Prof. Dr. Joerg Schneider

Projeto: " Synthesis of SBA-15, SBA-V-15 and V-TiO₂ deposition on silica plates"

Orientação: Prof. Dr. Christian Hess

08/2010 – 08/2011

Instituto de Química, UNICAMP – Campinas, São Paulo

Projeto de Iniciação Científica: "Redução de Iminas para obtenção de Aminas Quirais"

Orientação: Prof. Dr. Antonio Cláudio Herrera Braga

Prêmio e Congresso

09/2010

18o Congresso de Iniciação Científica– UNICAMP, Campinas, SP

06/2006

Medalha de Bronze – Olimpíada Estadual de Química – São Paulo, SP