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

Elizabeth Carmen Pastrana Alta

**Derivados da cafeína como moderadores do
estresse oxidativo provocado por sobrecarga de
ferro**

Versão corrigida da Dissertação/Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG

20/05/14

Elizabeth Carmen Pastrana Alta

**Derivados da cafeína como moderadores do estresse
oxidativo provocado por sobrecarga de ferro**

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

2014

Eu dedico este trabalho que representa uma parte muito importante da minha vida

Aos meus pais Mateo Pastrana e Mercedes Alta pelo amor e compreensão

À minha irmã Yesenia pelo apoio e amizade incondicional

Ao Prof. Dr. Breno Pannia Espósito, meu orientador,

Pela paciência e grande dedicação

Obrigada a todos!

“Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância.”

—Simone de Beauvoir

Agradecimentos

Expresso meus mais sinceros agradecimentos ao professor Breno por acreditar em mim e, talvez até mesmo sem saber, pela confiança, compreensão e pelo prazer inestimável de trabalhar com uma pessoa tão íntegra e dedicada, não fazendo distinção entre seus alunos nos diversos níveis acadêmicos em que se encontram.

Pelo apoio financeiro e administrativo, agradeço, respectivamente, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos pelo companheirismo e por toda ajuda sempre prestada que contribuíram para a realização desta dissertação, além de meu aprimoramento profissional.

Pela amizade fraternal, agradeço a meus amigos e amigas no Perú por me apoiarem incondicionalmente nos momentos de felicidade, dificuldade e pelos momentos maravilhosos de descontração.

À Prof^a. Dra. Maria Teresa Machini do laboratório de Química de Peptídeos que me permitiu usar os equipamentos no processo de purificação. Ao Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e a suas alunas do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) pela doação das células e a ajuda prestada. À Prof^a. Dra. Cassiana Seimi Nomura pelas análises de absorção atômica. À Prof^a. Dra. Paola Corio pelas análises de espectroscopia Raman. À Prof^a. Dra. Liane Marcia Rossi que me permitiu usar os equipamentos de seu laboratório.

À Prof^a. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira e Prof. Dr. Gianluca Camillo Azzellini pelas sugestões e críticas ao meu trabalho. À Prof^a. Dra. Vera L. Constantino e Prof^a. Denise de Oliveira pelas aulas tão valiosas.

À Secretaria de Pós-graduação (IQ-USP) em especial à Cíbele e ao Marcelo pela assistência e eficiência na entrega dos documentos requeridos.

Em especial, agradeço à minha família; minha irmã Yesi por me apoiar e incentivar do jeito dela; a meus pais Mateo e Mercedes por seu amor e suporte emocional na minha vida inteira.

Um muito obrigado do fundo do coração!

RESUMO

Alta, Elizabeth Carmen Pastrana. **Derivados da cafeína como moderadores do estresse oxidativo provocado por sobrecarga de ferro. 2014. 120p.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ferro é um elemento químico abundante e importante para os organismos. No ser humano, as reações redox do ferro são essenciais para a grande maioria das suas funções enzimáticas, mas fora dos compartimentos bioquímicos adequados pode se tornar uma toxina potencial para o organismo, já que pode catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A sobrecarga de ferro pode se dar no sistema nervoso central. Várias evidências indicam que o estresse oxidativo é um dos fatores determinantes nas doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (AD). AD é caracterizada pela acumulação de agregados insolúveis de proteína β -amilóide ($A\beta$). Tem-se evidência de que o Fe participaria ativamente no processo de agregação de $A\beta$'s e como gerador de radicais livres. A terapia de quelação é um tratamento convencional na sobrecarga do metal usando ligantes como a desferrioxamina (DFO). A cafeína por outro lado é uma xantina com atividade antioxidante. Estudos em modelos animais de AD indicam que a cafeína pode diminuir a produção de placas amilóides, bem como melhoria de aprendizagem e memória. Neste trabalho se sintetizou um ligante para o Fe baseado na DFO, a desferrioxamina-cafeína (DFCAF), que poderia ajudar a manter a homeostase normal do ferro cerebral. O DFCAF foi caracterizado por análise elementar, termogravimetria e métodos espectroscópicos (RMN, IR, Raman e UV/Vis). Foram avaliadas as propriedades de ligação do DFCAF com íons metálicos (Fe(III), Cu(II) e Mn(II)), onde a estequiometria metal:ligante sempre se manteve em 1:1. A atividade antioxidante do DFCAF foi avaliada frente ao sistema ferro/ascorbato, pelo método ORAC modificado, e por redução do radical DPPH. O DFCAF mostrou uma elevada afinidade por ferro em condições fisiológicas. Nos modelos pró-oxidantes dependentes de ferro, o DFCAF apresentou atividade antioxidante idêntica à do DFO. Tanto o ligante DFCAF livre quanto o complexo Fe(DFCAF) apresentaram permeabilidade em células HeLa, ao contrário do que se observou para DFO ou Fe(DFO). Foi possível observar que a

conjugação da cafeína ao DFO produziu uma molécula nova, que preserva tanto as características de ligação do DFO quanto a estrutura da cafeína. Além disso, a presença de cafeína auxilia na permeabilidade celular de DFCAF, o que pode também ser um acréscimo de função na terapia de AD.

Palavras-chave: ferro, desferrioxamina, cafeína, Alzheimer, antioxidante, fluorescência

ABSTRACT

Alta, Elizabeth Carmen Pastrana. Caffeine derivatives as moderators of oxidative stress induced by iron overload. 2014. 120 p. Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Iron is an abundant and important chemical element for organisms. In human beings, redox reactions of iron are essential to the vast majority of their enzymatic functions. However, outside suited biochemical compartments, iron may behave as a toxin, since it may catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS). Iron overload may affect the central nervous system. Several evidences point to the role of iron in neurodegenerative conditions such as Alzheimer Disease (AD). AD is characterized by the accumulation of insoluble aggregates of the β -amiloid protein ($A\beta$), and iron may both actively induce the aggregation of $A\beta$ and generate free radicals. Chelation therapy is the frontline treatment for iron overload, employing ligands such as desferrioxamine (DFO). Caffeine is a xanthine with antioxidant activity. Studies with animal models of AD indicate that caffeine may decrease the rate of formation of $A\beta$, as well as improve learning and memory. In this work, a ligand was synthesized incorporating the chelator moiety of DFO and the caffeine environment (DFCAF), which could help to maintain normal cerebral iron homeostasis. DFCAF was characterized by elemental analysis, thermal analysis and spectroscopic techniques. Binding of DFCAF with metal ions (Fe(III), Cu(II) and Mn(II)) occurred with a 1:1 metal:ligand stoichiometry. Antioxidant activity of DFCAF was assayed in the iron/ascorbate system, modified ORAC and reduction of DPPH radical. Whenever oxidation was iron-dependent, DFCAF displayed identical antioxidant activity as the parent DFO. Both free DFCAF and Fe(DFCAF) were permeable to HeLa cells, as opposed to the observed by DFO or Fe(DFO). It was possible to show that conjugation of caffeine to DFO lead to a new molecule which preserves both DFO binding properties and caffeine structure. The presence of the xanthine environment in DFCAF assists on its cell permeability, which can be of interest as an adjuvant on the therapy of AD.

Keywords: iron, desferrioxamine, caffeine, Alzheimer, antioxidant, fluorescence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de ferro no corpo humano adulto.

Figura 2. Representação esquemática dos fatores que afetam o equilíbrio delicado entre a acumulação e a deficiência de metal.

Figura 3. Quelantes de uso clínico para o tratamento de sobrecarga de Fe.

Figura 4. Distribuição de ferro no cérebro humano. GP: globus pallidus, SN: substância negra, IPN: núcleo inter-peduncular, TH: tálamo, DG: giro dentado, RH: núcleo vermelho, CC: córtex cerebral, HIPP: hipocampo, CER: cerebelo, FC: córtex frontal.

Figura 5. Homeostase de ferro no cérebro.

Figura 6. Sinais patológicos da AD. Deposição de A β em PS e agregados de PHF da proteína τ .

Figura 7. Esquema da geração de espécies A β e seu envolvimento com íons metálicos em AD.

Figura 8. Representação esquemática da energia da fibrilação de A β . A formação de placas senis é um processo termodinamicamente favorável.

Figura 9. Um via proposta para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por espécies ativas redox metal-A β .

Figura 10. Metal-homeostase nos neurônios.

Figura 11. Molécula de cafeína.

Figura 12. Diagrama de produção, homeostase e controle por cafeína do peptídeo A β no cérebro.

Figura 13. O tratamento com cafeína reduz a deposição presente de A β insolúvel em ratos transgênicos (Tg). Em cima: fotomicrografia (escala = 50 μ m), abaixo: redução de A β .

Figura 14. Redução de A β devido à administração de cafeína em ratos transgênicos em longo prazo.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,001\%$.

Figura 15. Tratamento com cafeína induzi uma diminuição rápida e substancial de A β no plasma.
* $p < 0,05$ - $0,01$.

Figura 16. Ratos transgênicos (APP^{sw} e APP+PS1) tratados por via oral com cafeína. ** $p < 0,05$.

Figura 17. A neuromodulação da adenosina no envelhecimento e os efeitos da ingestão de cafeína.

Figura 18. Testes de memória e aprendizado em ratos PS1/APP tratados com cafeína. A) Teste do labirinto de água. B) Efeito da cafeína no tempo de latência. C) Efeito de cafeína no tempo dispendido para localizar o quadrante onde ficava a plataforma. Tg-control: sem cafeína; Caff-L: cafeína 0,75 mg/dia; Caff-H: cafeína 1,5 mg/dia; WT: rato selvagem sem tratamento com cafeína.

Figura 19. Efeito da cafeína sobre marcadores bioquímicos do hipocampo em ratos PS1/APP. A) expressão de BDNF, $p < 0,05$ e B) expressão TrkB. Tg-control: sem cafeína; Caff-L: cafeína 0,75 mg/dia; Caff-H: cafeína 1,5 mg/dia; WT: rato selvagem sem tratamento com cafeína.

Figura 20. Ingresso da cafeína por a BBB a traves dos receptores da adenosina 2A.

Figura 21. Ingresso da cafeína por difusão passiva.

Figura 22. Reação de acoplamento desferrioxamina-cafeína.

Figura 23. Montagem experimental para a síntese de DFCAF.

Figura 24. Aparelho digital de temperatura de fusão.

Figura 25. Princípio de funcionamento do método de detecção de espécies reativas formadas pela presença de ferro. A adição de um pró-oxidante (ácido ascórbico) inicia a produção de ERO's catalisada pelo Fe^{3+} presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente (a). Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de Fe; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de Fe (b). A taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração de Fe, podendo ser usada para quantificar a concentração do metal na amostra desejada (c).

Figura 26. Distribuição dos ensaios de permeabilidade dos quelantes. Foram estabelecidos dois controles: ausência de ferro (branco 1) e ausência de quelante (branco 2).

Figura 27. Distribuição das células HeLa (2.5×10^4 células/poços) na microplaca de 6 poços.

Figura 28. Aparência física do DFCAF. a) Bruto e b) purificado.

Figura 29. Cafeína e seus metabólitos.

Figura 30. DFCAF bruto (impuro): a1) cromatograma, a2) espectro de íons, b) espectro de massas do primeiro pico e c) espectro de massas do segundo pico.

Figura 31. DFCAF purificado: a1) espectro cromatográfico, a2) espectro de íons, b) espectro de massas do pico nos minutos 13,7-15,3.

Figura 32. Molécula DFCAF.

Figura 33. Diagrama de análise térmica do produto DFCAF.

Figura 34. Diagrama de análise térmica da T7A.

Figura 35. Diagrama de análise térmica do DFO.

Figura 36. Diagrama de análise térmica da mistura física entre DFO e T7A.

Figura 37. Perfis termogravimétricos comparativos do DFO, T7A, DFCAF e mistura física.

Figura 38. Espectro de infravermelho em KBr de mesilato de desferrioxamina (DFO), T7A, DFCAF e a mistura de DFO e T7A (1:1).

Figura 39. Espectro Raman da desferrioxamina (DFO), T7A e DFCAF.

Figura 40. Espectros eletrônicos UV/Vis.

Figura 41. Espectro ^1H RMN do DFCAF.

Figura 42. Supressão e recuperação da fluorescência.

Figura 43. Recuperação de fluorescência (%) em função da concentração de DFCAF.

Figura 44. Espectros eletrônicos do complexo Fe(DFCAF) a várias razões molares.

Figura 45. Diagrama de Job para o complexo Fe(DFCAF).

Figura 46. Espectros eletrônicos do complexo Fe(DFO) a várias razões molares.

Figura 47. Diagrama de Job para o complexo Fe(DFO).

Figura 48. Espectro eletrônico de Fe(DFCAF) e Fe(DFO).

Figura 49. Espectro eletrônico de Cu(DFCAF) e Cu(DFO).

Figura 50. Espectro eletrônico de Mn(DFCAF) e Mn(DFO).

Figura 51. Capacidade anti-oxidante de diversas substâncias ($18\ \mu\text{M}$) no sistema Fe(NTA)/ascorbato.

Figura 52. Capacidade antioxidante através do ensaio com DHR da cafeína, Deferiprona, DFO e DFCAF. Fe(NTA) = $2\ \mu\text{M}$.

Figura 53. Princípio do método ORAC modificado.

Figura 54. Atividade antioxidante do ácido ascórbico em DMSO.

Figura 55. Atividade antioxidante para o BHT em DMSO.

Figura 56. Atividade antioxidante para o trolox em DMSO.

Figura 57. Atividade antioxidante para a cafeína em DMSO.

Figura 58. Atividade antioxidante para o DFO em DMSO.

Figura 59. Atividade antioxidante para o DFCAF em DMSO.

Figura 60. Estrutura do DPPH.

Figura 61. Espectro eletrônico do DPPH ($0,07\ \text{mM}$ em metanol).

Figura 62. Capacidade antioxidante usando DPPH. Soluções em DMSO.

Figura 63. Microscopia de fluorescência das células HeLa. a) células tratadas apenas com cal-AM, b) células tratadas com cal-AM e sobrecarregadas com Fe, c) células tratadas com cal-AM, sobrecarga de Fe e com DFO, d) células tratadas com cal-AM, sobrecarga de Fe e com DFCAF.

Figura 64. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas apenas com calceína-AM (Branco 1).

Figura 65. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM e sobrecarregadas com Fe (Branco 2).

Figura 66. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO.

Figura 67. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM, sobrecarregadas com Fe e com tratadas DFCAF.

Figura 68. Concentração de Fe nas células HeLa tratadas com diferentes complexos de ferro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas de transporte envolvidas e Fe armazenamento no cérebro.

Tabela 2. Reagentes e solventes.

Tabela 3. Testes de solubilidade do DFCAF (1 g/1 mL).

Tabela 4. Proporção metal-ligante, razão molar e número de mols totais.

Tabela 5. Polaridade dos solventes.

Tabela 6. Massa molecular teórica e experimental do DFCAF e seus fragmentos.

Tabela 7: Análise elementar dos produtos E02 e E03.

Tabela 8: Composição elementar teórica dos precursores DFO e T7A.

Tabela 9: Temperaturas de fusão (°C).

Tabela 10: Eventos de termodecomposição (°C). Entre parênteses: % de perda de massa

Tabela 11: Atribuição das bandas de infravermelho (valores em cm^{-1}). Números em destaque com formatos iguais representam as mesmas bandas nos diferentes compostos. ν : estiramento; δ : deformação.

Tabela 12: Atribuição das bandas de Raman (valores em cm^{-1}). ν : estiramento, δ : deformação e ρ : balanço.

Tabela 13. Deslocamentos químicos do espectro ^1H RMN do DFCAF.

Tabela 14. Absorbância de $\text{Fe}(\text{DFCAF})$ a $\lambda = 430 \text{ nm}$.

Tabela 15. Absorbância de $\text{Fe}(\text{DFO})$ a $\lambda = 430 \text{ nm}$.

Tabela 16. xc para cada tratamento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Ferro	16
1.2. Toxicidade do Ferro	18
1.3. Sobrecarga de Ferro	20
1.3.1. Sobrecarga no sistema nervoso central	20
1.3.2. Tratamento por quelação	21
1.4. Ferro no cérebro	22
1.4.1. Homeostase de ferro	23
1.5. Doença de Alzheimer e o Ferro	24
1.6. O papel da cafeína na terapia de DA	28
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Reagentes, solventes e tampões	39
3.2. Síntese do ligante desferrioxamina-cafeína (DFCAF)	41
3.3. Purificação do ligante desferrioxamina-cafeína (DFCAF)	42
3.4. Caracterização do ligante DFCAF	45
3.5. Propriedades do ligante DFCAF	48
3.6. Estudo da permeabilidade de DFCAF em células HeLa	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1. Síntese do ligante desferrioxamina-cafeína (DFCAF)	57
4.2. Purificação do ligante desferrioxamina-cafeína (DFCAF)	58
4.3. Caracterização do ligante DFCAF	62
4.4. Propriedades do ligante DFCAF	78
4.5. Estudo da permeabilidade de DFCAF em células HeLa	98
5. CONCLUSÕES	105
6. BIBLIOGRAFIA	107
SÚMULA CURRICULAR	119

1) INTRODUÇÃO

Uma grande quantidade dos elementos da Tabela periódica consiste de metais. Estes são ubíquos no ambiente terrestre, estando presentes no ar, solo e águas. Dessa forma, estão presentes também nos organismos vivos, sendo alguns metais essenciais para a sobrevivência e bom funcionamento do ser humano como, por exemplo, sódio, cálcio, ferro, manganês, entre outros. Entretanto, sobrecargas desses elementos normalmente não são bem toleradas pelo organismo.

1.1 Ferro

O metal de transição de ferro (Fe) é o elemento 26 da Tabela periódica e é o quarto elemento mais abundante na crosta após Si, O e Al. Representa 5,1% da sua massa total, sendo seu conteúdo no solo 3,8%. A maioria do ferro está presente em estruturas cristalinas de vários minerais (óxidos, carbonatos, sulfetos, silicatos, etc.) [1].

O ferro apresenta como máximo estado de oxidação +6, mas apenas os estados +2 e +3 são comuns em sistemas biológicos [2]. As funções biológicas do ferro baseiam-se nas suas propriedades químicas, tais como a sua capacidade para formar uma variedade de compostos de coordenação com ligantes orgânicos em forma dinâmica e flexível, e o seu potencial redox favorável para mudar entre os estados ferroso Fe^{2+} e férrico Fe^{3+} (+772 mV a um pH neutro) [3]. A biodisponibilidade do ferro é geralmente limitada, pois sob condições aeróbicas, o Fe^{2+} é facilmente oxidado a Fe^{3+} o qual é praticamente insolúvel a um pH fisiológico ($[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-18} \text{ M}$) [3].

Um ser humano contém cerca de 3-5 g de ferro (45-55mg/kg da massa de mulher e homem adulto, respectivamente), e sua distribuição é mostrada na Figura 1. A maior parte do ferro (~ 60-70%) é utilizada na hemoglobina [4-5]

Outros órgãos ricos em ferro são o fígado e os músculos. Aproximadamente 20-30% de ferro no corpo é armazenado em hepatócitos e macrófagos, em grande parte dentro de ferritina e seu produto degradado hemosiderina. O ferro corporal restante fica principalmente na mioglobina,

citocromos e enzimas. Um indivíduo saudável consome 1-2 mg de ferro por dia, que compensa a perda não-específica de ferro como descamação, lesões, sangramentos acidentais, etc. [3]

Figura 1. Distribuição de ferro no corpo humano adulto [3]

Os vertebrados dispõem de uma proteína transportadora de ferro chamada transferrina (Tf). Nos humanos normais (não sobrecarregados com ferro), 30% de Tf circulatória encontra-se tipicamente carregada com ferro, sendo portanto um importante sistema tamponante contra a sobrecarga do metal. O corpo humano não tem um sistema excretor de ferro, portanto os níveis de ferro são controlados na absorção, e as perdas ocorrem como sangramentos, descamação da pele, menstruação e sudorese. Portanto, há um equilíbrio delicado que deve ser mantida para evitar deficiências ou excessos do metal (Figura 2) [6].

Figura 2. Representação esquemática dos fatores que afetam o equilíbrio delicado entre a acumulação e a deficiência de metal [7].

1.2 Toxicidade do ferro

As reações redox do ferro são essenciais para a grande maioria das suas funções enzimáticas, entretanto essas mesmas propriedades são as que podem tornar o ferro “livre” (fora dos compartimentos bioquímicos adequados) uma toxina potencial para o organismo. É por essa razão que, enquanto em circulação, o ferro encontra-se firmemente associado à transferrina (Tf), o que entre outras coisas diminui a possibilidade de que o metal participe em reações redox espúrias [8].

No ambiente celular as espécies de Fe^{2+} e Fe^{3+} formam compostos de coordenação com um grande número de ligantes. Os complexos de ferro mostram uma variedade de potenciais de redução, esta propriedade é determinada por um conceito básico em química de coordenação que afirma que o ligante altera a nuvem de elétrons em torno do metal, o que por sua vez modifica seu potencial de redução. Esta propriedade permite o ajuste fino entre o potencial de redução do ferro e do processo de transferência de elétrons que ele catalisa [2].

O ferro é um produtor intrínseco de espécies reativas de oxigênio (ROS). Quando um ou mais dos seis sítios de coordenação não está fortemente ligado, o ferro pode participar em reações de troca de elétrons com o potencial de produção de radicais livres [9]. De fato, a toxicidade do ferro é resultado dessa capacidade de troca de elétrons combinada com o ambiente intracelular redutor e com a presença de oxigênio [2].

As reações (1) e (2) são conhecidas como reações de Haber-Weiss, e a reação 3 é conhecida como reação de Fenton. As reações 2 e 3 têm um valor de ΔG bem negativo e podem, assim, conduzir a reação 1 para a produção do ânion superóxido [2].

A soma estequiométrica de reações 1-3 dá a reação viável 4 devido ao potencial ΔG favorável:

O meio intracelular fornece poder redutor na forma de ascorbato e glutathione reduzida (GSH), para regenerar o estado ferroso e formar o dissulfeto de glutathione (GSSG):

A soma estequiométrica das reações 1-5 resulta a reação 6:

Num ambiente redutor e na presença de O_2 como o meio intracelular, o ferro promove a produção de radicais hidroxilas, em detrimento do consumo de GSH. A relevância de reação 6 é acentuada pela consideração de que em condições normais o citoplasma tem concentrações milimolares de GSH e concentrações micromolares de ferro reativo [10-11].

Neste meio, o ferro redox-ativo também catalisa a geração de espécies reativas orgânicas tais como peroxila ($\text{ROO}^\cdot$) alcóxila ($\text{RO}^\cdot$), tioíla ($\text{RS}^\cdot$) ou tioperoxila ($\text{RSOO}^\cdot$) [3].

Curiosamente, o ferro heme pode catalisar a formação de radicais, principalmente através da formação do intermediário oxoferrila [12].

Finalmente, o íon ferroso pode também contribuir para a produção de radicais livres por interação direta com o oxigênio, formando as espécies ferrila ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}$) ou perferrila ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$). Tem sido proposto que, quando $[\text{O}_2] / [\text{H}_2\text{O}_2] > 100$, estas reações são uma importante fonte de geração de radicais livres in vivo [13].

Os radicais livres são altamente reativos e podem promover a oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios de membrana e modificação de ácidos nucleicos. O excesso de ferro redox-ativo agrava o estresse oxidativo e acelera a degeneração do tecido [3]. Com o envelhecimento e em condições de sobrecarga, a concentração de ferro redox-ativo aumenta na célula [14-15] e por sua vez, aumenta a concentração de radicais hidroxila, que é um oxidante perigoso [2].

1.3 Sobrecarga de ferro

Na sobrecarga de ferro, o corpo tem mais ferro do que o necessário para a operação normal. Aqui aparecem os reservatórios plasmáticos ou citossólicos de ferro livre. Os primeiros são conhecidos como NTBI (*Non-transferrin-bound iron*; Ferro não-ligado à transferrina), e são o resultado de enfermidades (como a talassemia ou a hemocromatose hereditária), ou de um regime longo de transfusões. A composição química desses reservatórios é indefinida, envolvendo espécies monoméricas ou oligoméricas de Fe com albumina, citrato, aminoácidos ou outros ligantes séricos [6].

A sobrecarga de ferro é diagnosticada quando a Tf está saturada com > 45% e/ou os níveis de ferritina plasmática são > 300 ng/mL. O ferro em excesso é depositado principalmente em tecidos como o fígado, coração ou cérebro, podendo originar a formação do ROS. Também níveis altos de NTBI podem causar septicemia [6].

1.3.1 Sobrecarga no sistema nervoso central

Vários distúrbios neurodegenerativos têm sido associados com a regulação do metabolismo do ferro no sistema nervoso central (SNC) [16]. Altas concentrações foram encontradas nos cérebros de pacientes com as características de doenças como Alzheimer e Parkinson. Nestas condições, o estresse oxidativo induzido pelo ferro, combinado com fraca capacidade antioxidante,

promove a morte neuronal e neurodegeneração. No entanto, ainda é controverso se o extenso acúmulo de ferro cerebral é o evento patológico inicial, ou um efeito colateral [3].

1.3.2 Tratamento por quelação

No tratamento de sobrecarga de Fe é usual a flebotomia e a terapia de quelação. Na terapia de quelação se precisa que um quelante seja fornecido por via intravenosa (desferrioxamina) ou oral (deferiprona, deferasirox) (Figura 3) com a intenção de mobilizar o Fe dos reservatórios para lograr sua excreção. É importante mencionar que a deferiprona e o deferasirox são permeáveis às células, mas a desferrioxamina não [6].

Figura 3. Quelantes de uso clínico para o tratamento de sobrecarga de Fe [6].

Uma parte do ferro que pertence ao NTBI é redox-ativa, chamada LPI (*Labile Plasma Iron*; Ferro Lábil Plasmático), a qual deve ser o alvo de qualquer tipo de terapia de remoção do excesso do metal [6].

As estratégias de quelação para o tratamento de doenças neurodegenerativas estão em crescimento contínuo. O uso de agentes quelantes para remover os metais livres que estão presentes em excesso no cérebro ou que perturbam a homeostase é muito promissor e uma escolha bem fundamentada. Esta terapia poderia ser bem sucedida para algumas doenças, onde o acúmulo de metal é restrito a alguns tecidos ou organelas. O projeto de novas e eficazes moléculas não tóxicas e quelantes é uma tarefa muito difícil com uma série de requisitos específicos que devem ser atendidos para ser candidatos a fármacos [17].

1.4 Ferro no cérebro

O ferro é o metal de transição mais abundante do cérebro, sendo, como visto, uma toxina potencial. Apesar do cérebro corresponde a apenas 2% da massa corpórea, consome 25% do oxigênio. Sendo o ferro necessário para o transporte (hemoglobina) e armazenamento (mioglobina) do oxigênio, é natural que o cérebro use muito esse metal [18].

Figura 4. Distribuição de ferro no cérebro humano. GP: globus pallidus, SN: substância negra, IPN: núcleo interpeduncular, TH: tálamo, DG: giro dentado, RH: núcleo vermelho, CC: córtex cerebral, HIP: hipocampo, CER: cerebelo, FC: córtex frontal [18].

O ferro é um elemento importante na maioria dos tipos de células do cérebro (Tabela 1) e um cofator importante para muitas proteínas envolvidas no funcionamento normal dos tecidos neuronais as quais por sua vez estão envolvidas na síntese de mielina e dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e serotonina [19].

No SNC existem mecanismos específicos para a interiorização, transporte e depósito em que participam diversas proteínas, alguns exclusivos para esse sistema e outros também presentes em vários compartimentos do corpo [18].

Tabela 1. Proteínas de transporte envolvidas e Fe armazenamento no cérebro [18].

<i>Proteína</i>	<i>Função</i>	<i>Distúrbio associado</i>
Melanotransferrina	Transporte	D. Alzheimer, melanoma
Lactoferrina	Transporte Antioxidante	D. Alzheimer D. Parkinson
Ferroportina	Transporte	Hemocromatose hereditária Anemia
Hepcidina	Regula a transição de ferroportina	Sobrecarga de Fe Hipoferremia
DMT1	Transporte	Anemia Hemocromatose
Transferrina (Tf)	Transporte	Aumento de mortalidade
Receptor Tf	Transporte Importador	Hemocromatose
Ceruloplasmina	Antioxidante Pro-oxidante	Aceruloplasminemia Degeneração neuronal
Ferritina	Armazenamento	Hemocromatose
Neuromelanina	Armazenamento Antioxidante Pró-oxidante	D. Alzheimer D. Parkinson
Heme oxigenase 1	Depósito de Fe Antioxidante Pró-oxidante	Resposta inflamatória

1.4.1 Homeostase de ferro

A via de absorção de ferro começa no intestino, onde o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e, em seguida, é transportado para o sangue através da ferroportina (FPN). No sangue a ceruloplasmina (Cp) oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} e promove a sua ligação ao transportador de ferro, transferrina (Tf) [20]. Para internalizar no cérebro, o ferro precisa cruzar duas barreiras diferentes, a barreira hemato-encefálica (BBB) e o líquido cefalorraquidiano (BCSF). O caminho de entrada mais comum de ferro é através da BBB mediante os receptores de transferrina expressados nas células endoteliais. O ferro ligado à transferrina é capturado pelo receptor de transferrina (TfR), que entra na célula por endocitose e é depois translocado através da membrana endossômica, provavelmente através do transportador de metal bivalente 1 (DMT1) [19]. Em adição à via Tf-TfR, tem sido sugerido a via do receptor

lactotransferrin-lactotransferrin (LfR-Lf) que pode participar no transporte de Fe através da BBB. O Fe^{2+} no citoplasma também pode ser transportado para a mitocôndria pela mitoferrina, ou participar de reações de troca de elétrons [21]. A Figura 5 resume as vias de absorção de Fe no cérebro.

Figura 5. Homeostase de ferro no cérebro [19].

A disomeostase de íons metálicos é um cofator reconhecido em várias enfermidades neurodegenerativas, especialmente no caso de íons metálicos endógenos como o ferro e outros [22-23].

1.5 Doença de Alzheimer e o Ferro

A doença de Alzheimer (AD) é a causa mais comum de neurodegeneração relacionada com a idade e é caracterizada por perda progressiva de memória, linguagem e reconhecimento de pessoas e objetos [24]. Pode-se observar a massa reduzida em regiões do hipocampo e no córtex, e aumento ventricular ao longo da doença [25] (Figura 6). A AD é caracterizada pela presença das placas senis (PS) e de emaranhados neurofibrilares (EN), formados pela acumulação de agregados

de proteína β -amilóide ($A\beta$) e compostos precipitados/agregados devido à hiperfosforilação (PHF) da proteína tau [19].

Figura 6. Sinais patológicos da AD. Deposição de $A\beta$ em PS e agregados de PHF da proteína τ [7].

O peptídeo $A\beta$ monomérico é constituído por 39-43 aminoácidos e é produzido pela divisão da proteína precursora de amilóide (APP), por β -secretase e γ -secretase (Figura 7). As duas principais formas de peptídeos $A\beta$ encontrados em cérebros de pacientes com AD são $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$, sendo $A\beta_{1-42}$ o componente predominante em placas senis e considerado mais tóxico do que $A\beta_{1-40}$ [26]. As espécies $A\beta$ monoméricas têm a capacidade de se agregar, principalmente, por meio de interações hidrofóbicas e se acha que podem reconhecer os locais de ligação no peptídeo para a agregação com outras espécies $A\beta$. A interação contínua de monômeros $A\beta$ e oligômeros $A\beta$ com espécies agregadas podem levar a estruturas de ordem maior e mais estáveis através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Figura 8) [25].

Figura 7. Esquema da geração de espécies Aβ e seu envolvimento com íons metálicos em AD [25].

Figura 8 Representação esquemática da energia da fibrilação de Aβ. A formação de placas senis é um processo termodinamicamente favorável [17].

Várias evidências indicam que o estresse oxidativo é um dos fatores determinantes na neurodegeneração [27]. Tal estresse, nos neurônios, é produzido pela geração de radicais livres através de processos oxidativos e/ou por espécies reativas provenientes do ambiente ou da dieta. A importância do estresse oxidativo no desenvolvimento de AD se evidencia através de estudos epidemiológicos que demonstram que indivíduos com hemocromatose hereditária (uma patologia do transporte de ferro, que leva ao acúmulo desse metal) apresentam níveis significativamente superiores de AD em comparação com indivíduos normais. Deve-se destacar que o dano oxidativo se localiza naqueles sítios onde há EN ou PS presentes [28].

Com o passar dos anos, acumula-se o efeito das espécies reativas de oxigênio (ROS), às quais o sistema nervoso central (SNC) parece ser especialmente vulnerável. Vários fatores contribuem a tal suscetibilidade, como os níveis naturalmente baixos de glutathione dos neurônios, os elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas e finalmente o aumento relativo da demanda de oxigênio pelo cérebro, devido às suas elevadas necessidades metabólicas [29].

Encontraram-se nas placas amilóides altas concentrações de metais de transição, tais como Cu, Zn e Fe ([Fe] = 900 μ M). Esta observação poderá explicar a ausência de homeostase do íon metálico no cérebro de um paciente com AD [25]. A neurotoxicidade é associada com o estresse oxidativo. Vários estudos relacionam de dois modos a neurotoxicidade das espécies metal-A β : facilitação da agregação de A β e a indução do estresse oxidativo por meio da geração de ROS, que conduz à morte de neurônios e deficiências cognitivas. Os íons metálicos Cu(I/II) e Fe(II/III) são redox-ativos e podem sofrer ciclos redox em presença de A β e oxigênio (O₂) produzindo ROS (Figura 9) [25].

Figura 9. *Um via proposta para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por espécies ativas redox metal-A β [25].*

A compreensão da AD é complicada devido aos mecanismos de transporte que causam redistribuição do metal em compartimentos inadequados, levando à neurodegeneração. O ferro em pessoas saudáveis é importado pelo receptor de transferrina e DMT1 através de endocitose e

exportados através da ferroportina. A APP é uma ferroxidase que é necessária para a liberação de ferro dos neurônios e a proteína tau está envolvida no tráfego de APP para a superfície neuronal. Em pacientes com AD, a proteína tau está hiperfosforilada e APP é inibida conduzindo assim a acumulação de ferro nos neurônios (Figura 10) [24].

Figura 10. Metal-homeostase nos neurônios [24].

1.6 O papel da cafeína na terapia de AD

A cafeína é um alcalóide derivado da purina 1,3,7-trimetilxantina, cujos metabólitos são a para-xantina (81,5%), a teobromina (10,8%) e a teofilina (5,4%) (Figura 11) [30]. A interação coordenativa da cafeína com íons metálicos em princípio pode se dar através dos átomos de nitrogênio e oxigênio (provavelmente O2 e O6) [31], embora ela forme complexos muito pouco estáveis com metais em geral, e com ferro(III) em particular [32].

Figura 11. Molécula de cafeína

A cafeína tem a capacidade de aumentar o estado de alerta e excitação que envolve principalmente o antagonismo dos receptores de adenosina no SNC. A cafeína é rápida e completamente absorvida via oral através do trato gastrintestinal, sendo os níveis de cafeína no sangue rapidamente equilibrados com os níveis de cafeína em tecidos cerebrais, porque a cafeína atravessa a BBB sem impedimentos [33].

A possível relação entre a cafeína e a bioquímica de A β é apresentada na Figura 12. Quando o A β é produzido, imediatamente entra em um equilíbrio dinâmico entre peptídeos solúveis e insolúveis (placas) no cérebro, além de se dar a liberação de A β para o plasma (Figura 12A). Em ratos transgênicos (APPsw), acredita-se que a cafeína possa diminuir a produção de A β devido à sua capacidade de inibição da β -secretase e da γ -secretase. Acredita-se que, devido aos baixos níveis de peptídeo solúveis, se tem como resultado baixos níveis do peptídeo no plasma (Figura 12B) e ao longo do tempo, com a ingestão continuada de cafeína, as próprias placas poderiam se solubilizar (Figura 12C) [33]. Esta hipótese baseia-se na observação de que o A β produzido é rapidamente eliminado do cérebro [34].

Figura 12. Diagrama de produção, homeostase e controle por cafeína do peptídeo Aβ no cérebro [33].

A relação benéfica direta entre o consumo de cafeína e a AD em humanos veio de um estudo recente que envolveu um acompanhamento de 21 anos, verificando-se que, à meia-idade, a ingestão de 3-4 xícaras de café ao dia reduzia significativamente o risco de desenvolver AD em idades mais avançadas [35]. Também se verificou uma correlação inversa entre o consumo de cafeína e o diagnóstico de AD em idade avançada [36]. Esses estudos sugerem que a cafeína consumida habitualmente pode proteger contra a incapacitação associada ao envelhecimento e à AD [37].

Numa tentativa de isolar o efeito do consumo da cafeína de outros fatores como estilo de vida individual, foram conduzidos estudos com ratos transgênicos (Tg) para AD com níveis elevados de placas β-amilóides e acentuada deterioração cognitiva na fase idosa [38-39]. A administração de cafeína de maneira prolongada começou na fase adulta, diminuindo os problemas cognitivos e a formação das placas β-amilóides. Tais efeitos foram alcançados com um consumo de 500 mg de cafeína na água dos ratos por dia (equivalente, em humanos, a cinco xícaras de café) [40].

Observou-se que a cafeína poderia reverter o quadro em ratos velhos já com deterioração cognitiva. Após alguns meses, foram obtidos resultados extremamente promissores. Observou-se a redução de 40 e 46% na deposição de placas β-amilóides no hipocampo e no córtex entorrinal,

respectivamente, bem como nos níveis de A β solúveis, que são precursores das placas amilóides (Figura 13) [41].

Figura 13. O tratamento com cafeína reduz a deposição presente de A β insolúvel em ratos transgênicos (Tg). Em cima: fotomicrografia (escala = 50 μ m), abaixo: redução de A β [41].

Neste estudo também se mostrou que o tratamento de cafeína por via oral em longo prazo (dois meses) com um grupo de ratos velhos Tg, de 20 a 21 meses de vida, reduz os níveis de A β solúveis (A β ₁₋₄₀ e A β ₁₋₄₂), no córtex cerebral e no hipocampo (Figura 14A). Além disso, mostra a redução de cerca de 40% dos A β insolúvel no hipocampo (Figura 14B) [41].

Figura 14. Redução de Aβ devido à administração de cafeína em ratos transgênicos em longo prazo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ [41].

Outro estudo mostra que o tratamento de cafeína através de injeção intraperitoneal ou catéter em ratos transgênicos (APPsw) na idade adulta e velha reduz o Aβ no plasma [33]. Em adultos (3 - 4 meses de idade), foi administrado 1,5 mg de cafeína e os níveis de Aβ₁₋₄₀ no plasma foram reduzidos em 41% após 3 horas de tratamento, em comparação com os ratos tratados no tempo 0 (Figura 15A). O resultado é análogo para ratos de 14 meses de idade, ao fim de 3 horas após a mesma dose de cafeína (Figura 15B). Além disso, nestes ratos de 14 meses de idade foram correlacionados o nível de cafeína no plasma e o nível de Aβ no plasma, apresentando uma relação inversa (Figura 15C). Trabalhou-se também com ratos velhos (19 meses), mostrando resultados semelhantes após 3 horas de administração de cafeína nas mesmas condições (Figura 15D) [33].

Figura 15. Tratamento com cafeína induzi uma diminuição rápida e substancial de Aβ no plasma. * $p < 0,05-0,01$ [33]

O papel neuroprotetor da cafeína através da ingestão oral foi outra vez comprovado neste trabalho, onde se observou uma redução nos níveis de A $_{\beta 1-40}$ e A $_{\beta 1-42}$ no plasma para ratos velhos APPsw (1,5 mg, duas vezes por dia) durante uma semana, mas também mostra um efeito "rebote", quando após a interrupção do tratamento (9 dias), os níveis destes peptídeos no plasma voltaram aos níveis basais em comparação com a ausência de tratamento (Figura 16A). Além disso, em um estudo de 2 meses de acompanhamento, a redução de ambos os peptídeos no plasma começa a se observar ao início e após o tratamento (Figura 16B) [33].

Figura 16. Ratos transgênicos (APPsw e APP+PS1) tratados por via oral com cafeína. ** $p < 0,05$ [33].

A cafeína pode atuar como uma ferramenta farmacológica, já que é um dos psicoativos mais consumidos e atua principalmente por bloqueio dos receptores de Adenosina A_1 e os A_{2A} (A_1R e A_{2AR}). Estes receptores regulam a transmissão sináptica, modulando diretamente respostas sinápticas ou por interferência com outros receptores [42]. Os receptores de adenosina estão acoplados à G-proteína, os receptores que regulam, em direções opostas, o segundo mensageiro cAMP. Enquanto A_1R inibe $G_{i/o}$ diminuindo assim os níveis de cAMP, os A_{2AR} são excitatórias acoplado a G_s , aumentando assim os níveis de cAMP. A ativação destes receptores modulam os canais Ca^{2+} e fosfolipase. Através dessas ações e modulando tanto a liberação e absorção de vários neurotransmissores, o equilíbrio entre A_1R e receptores A_{2AR} , permite o ajuste fino da transmissão sináptica no hipocampo. Em situações de patologias, o equilíbrio no sistema neuromodulador adenosina é comprometido, bloqueando os receptores de adenosina. A cafeína aparece como uma droga importante para modular as funções e cognição no cérebro (Figura 17) [43].

Figura 17. A neuromodulação da adenosina no envelhecimento e os efeitos da ingestão de cafeína [43].

Os efeitos da cafeína em disfunções da memória e na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu principal receptor (TrkB) em ratos transgênicos PS1/APP (modelo da AD) também foram estudados, mostrando melhoras na memória e na expressão de BDNF e TrkB [44]. O BDNF é uma proteína essencial para o crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurônios, estando relacionado à aprendizagem e memória juntamente com o seu principal receptor funcional (TrkB) no hipocampo, córtex e do prosencéfalo basal. Níveis reduzidos de BDNF e TrkB se apresentam em pacientes de AD [45]. Os ratos PS1/APP (Tg) foram tratados com cafeína (0 – 1,5 mg/dia) durante 8 semanas, e em seguida foram submetidos ao teste do labirinto de água (Figura 18A) para estudar o comportamento, a aprendizagem espacial e a memória. O primeiro teste foi a “navegação”, onde o animal foi colocado aleatoriamente em um dos quadrantes da piscina, e se determinou o tempo que ele levava para encontrar a plataforma (“tempo de latência”; Figura 18B). O segundo teste foi o “espacial”, onde a plataforma foi removida da piscina e o rato foi colocado aleatoriamente em um dos quadrantes, sendo considerado o tempo que ele levou para alcançar o quadrante onde a plataforma ficava (Figura 18C). No final do estudo os

animais foram sacrificados e os níveis de BDNF e TrkB no hipocampo foram avaliados por meio de electroforese (Figura 19) [45].

Figura 18. Testes de memória e aprendizado em ratos PS1/APP tratados com cafeína. A) Teste do labirinto de água. B) Efeito da cafeína no tempo de latência. C) Efeito de cafeína no tempo dispendido para localizar o quadrante onde ficava a plataforma. Tg-control: sem cafeína; Caff-L: cafeína 0,75 mg/dia; Caff-H: cafeína 1,5 mg/dia; WT: rato selvagem sem tratamento com cafeína. [45]

Figura 19. Efeito da cafeína sobre marcadores bioquímicos do hipocampo em ratos PS1/APP. A) expressão de BDNF, $p < 0.05$ e B) expressão TrkB. Tg-control: sem cafeína; Caff-L: cafeína 0,75 mg/dia; Caff-H: cafeína 1,5 mg/dia; WT: rato selvagem sem tratamento com cafeína. [45]

Os resultados demonstram que ambas as doses de cafeína aumentam a aprendizagem espacial, memória e a expressão no hipocampo do BDNF e TrkB em PS1/APP, podendo também ser invertida a deficiência da cognição [45]. Os níveis de BDNF são cruciais para a plasticidade neuronal e, ao lado dos principais receptores TrkB, têm sido relatados como mais baixos para

pacientes com AD [46]. Estes resultados suportam a hipótese de que a cafeína pode desempenhar um papel protetor contra a perda de memória, embora os mecanismos bioquímicos precisos em humanos ainda não sejam completamente entendidos.

1.7 Permeabilidade da cafeína

A barreira hematoencefálica (BBB, *Blood-Brain Barrier*) é uma barreira passiva constituída por células endoteliais que atua como um conduto dinâmico para nutrientes, proteínas e células do sistema imunológico. A função principal é proteger o cérebro de agentes tóxicos, para o que utiliza carregadores, sistemas transportadores, enzimas e receptores [47].

A molécula da cafeína pode atravessar a BBB por duas vias. A primeira é através de um transportador saturado de baixa afinidade ($K_M = 9,8 \text{ mM}$; K_M é a constante de afinidade Michaelis-Menten que reflete a afinidade do substrato por a enzima). A cafeína tem uma estrutura tridimensional similar à das purinas nucleosídicas. No caso da adenosina, a cafeína é capaz de ligar-se ao receptor da adenosina 2A, bloqueando assim a entrada desta no cérebro, o que explica o estado de alerta ao se ingerir cafeína (Figura 20) [48-49].

Figura 20. Ingresso da cafeína na BBB através dos receptores da adenosina 2A [49].

A segunda e mais provável via de ingresso da cafeína é através de difusão passiva devido à solubilidade lipídica da cafeína (coeficiente de partição igual a 0,85). A cafeína pode se dissolver na membrana das células endoteliais e atravessar a BBB (Figura 21 [47]).

Figura 21. Ingresso da cafeína por difusão passiva [47]

2) OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Dada a provável correlação deletéria entre níveis de ferro e doença de Alzheimer, por um lado, e a correlação benéfica entre consumo de cafeína e a mesma doença, por outro, sugere-se que a síntese de um conjugado quelante-cafeína seria interessante para uma terapia de quelação voltada a restaurar o equilíbrio do metal no cérebro e dessa forma mitigar os efeitos dessa enfermidade.

2.2 Objetivo geral

Síntese, caracterização e estudo da atividade antioxidante de um novo ligante para o ferro baseado na desferrioxamina (DFO) e cafeína: DFCAF.

2.3 Objetivos específicos

- a) Estudo da atividade antioxidante de metabólitos da cafeína em um modelo de oxidação biológica catalisada por ferro.
- b) Determinação das propriedades de complexação de DFCAF com íons metálicos.
- c) Estudo da permeabilidade celular do ligante DFCAF em um modelo celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, SOLVENTES E TAMPÕES

Tabela 2. Reagentes e solventes

<i>Reagente</i>	<i>Procedência</i>	<i>Grau</i>
1,2-dimetil-3-hidroxipirid-4-ona (deferiprona)	Apotex (Canadá)	99,0%
2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hydrazila (DPPH)	Sigma Aldrich	$\geq 99,0\%$
2-propanol	Sigma Aldrich	99,5%
Acetato de etila	<i>Synth</i>	Analítico
Acetometoxi-calceína (calceína-AM)	Biotium	Analítico
Acetonitrila (ACN)	Vetec Química Fina Ltda	Analítico
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox)	Sigma Aldrich	97%
Ácido L-(+) ascórbico	Cromoline Química fina	Analítico
Ácido nitrilotriacético (NTA)	Vetec	Analítico
Ácido teofilina-7-acético (T7A)	Sigma Aldrich	$\geq 99,0\%$
Ácido trifluoroacético (TFA)	Merck KGaA (Darmstadt, ALEMANHA)	Espectroscópico
Água deionizada	Equipamento Millipore (Bedford, EUA)	Ultra-pura
Bicarbonato de sódio	QM Reagentes	Analítico
Butilhidroxitolueno (BHT)	Sigma Aldrich	$\geq 99,0\%$
Cafeína anidra	Cromoline Química fina	Analítico
Cloreto de dihidrorodamina (DHR)	Biotium	Analítico

Calceína	Sigma	Analítico
Cloreto de metileno	<i>Synth</i>	Analítico
Cloreto cúprico dihidratado	Quimibrás-Reagen	Analítico
Cloreto férrico	Synth	Analítico
Cloreto de manganês(II) tetrahidratado	Sigma Aldrich	Analítico
<i>Clorofórmio</i>	<i>Synth</i>	Analítico
Dicloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidino) (AAPH)	Sigma Aldrich	97%
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich	Analítico
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich	Espectrométrico
Eter dietílico	Vetec Química Fina Ltda	Espectroscópico
Fitato de sódio (PHYT), sal dodecassódico	Sigma Aldrich	Analítico
Mesilato de desferrioxamina (DFO)	Novartis (Suíça)	99,0%
Metanol	<i>Synth</i>	Analítico
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
N-hidroxibenzotriazol (HOBt)	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (FAS)	Sigma Aldrich	98%
Teobromina	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Teofilina	Sigma Aldrich	≥ 99,0%

Tampão HBS/Chelex: Hepes (20 mM), NaCl (150 mM), lavado com Chelex®-100 (sódica) a 1 g/100 mL, pH 7,4. Tampão PBS: NaCl (0,1711 M), KCl (3,35 mM), Na₂HPO₄ (0,01 M), KH₂PO₄ (1,83 mM), CaCl₂ (9,01 mM), MgCl₂.6H₂O (4,918 mM) em água deionizada.

3.2 SÍNTESE DO LIGANTE DESFERIOXAMINA-CAFEÍNA (DFCAF)

A síntese do ligante DFCAF foi realizada pelo acoplamento em fase orgânica iniciado por EDC, HOBt, DFO e da T7A em refluxo a atmosfera inerte com N₂. A reação mostra-se na Figura 22. A síntese foi realizada de acordo ao processo já descrito por um artigo de conjugados de desferrioxamina [50], e baseado no mecanismo de Williams e Ibrahim [51]

Figura 22. Reação de acoplamento desferrioxamina-cafeína

No balão de três bocas adicionou-se 10 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) contendo excesso dos precursores 0,288 g de EDC (1,5 mmol) e 0,203 g de HOBt (1,5 mmol), seguido de 0,6568 g de desferrioxamina (1 mmol) e 0,238 g de T7A (1 mmol). A mistura permaneceu em refluxo por 5 h a 75°C. A solução formada foi resfriada à temperatura ambiente. O solvente foi roto-evaporado até a formação de sólido de cor bege, que foi secado com ajuda do dessecador a vácuo. O sólido seco foi lavado três vezes com 7 mL de éter dietílico, em agitação com ajuda de uma barra magnética, devido à baixa solubilidade o solvente foi simplesmente decantado e secado no dessecador a vácuo. O produto seco lavado novamente cinco vezes com 7 mL de água, em

agitação com ajuda de uma pastilha de agitação, seguido de centrifugação (7500 rpm por 8 min a 25°C) para decantar o líquido, seguido de nova secagem no dessecador a vácuo. Repetiu-se o procedimento de lavagem nas mesmas condições com metanol. Na Figura 23 se mostra a montagem experimental da síntese do DFCAF.

Figura 23. Montagem experimental para a síntese de DFCAF

3.3 PURIFICAÇÃO DO LIGANTE DESFERRIOXAMINA-CAFEÍNA (DFCAF)

3.3.1 Solubilidade do DFCAF

Os testes de solubilidade DFCAF foram conduzidos para determinar os melhores solventes. O melhor solvente foi usado na purificação por cromatografia e avaliações de estabilidade,

capacidade de quelação, comportamento estequiométrico, atividade anti-oxidante, e ensaios de permeabilidade celular. Na Tabela 3 são mostrados os resultados da inspeção visual, positivos e negativos da solubilidade com diferentes solventes.

Tabela 3. Testes de solubilidade do DFCAF (1 g/1 mL)

<i>Solventes</i>	<i>Agitação</i>	<i>Solubilidade</i>
2-propanol	Forte	Nenhuma
Acetato de etila	Forte	Baixa
Acetonitrila	Forte	Baixa
Água	Forte	Baixa
Clorofórmio	Forte	Nenhuma
Diclorometano	Forte	Baixa
Dietiléter	Forte	Nenhuma
DMSO	Moderada	<u>Alta</u>
Metanol	Forte	Nenhuma

3.3.2 Purificação cromatográfica do DFCAF

Dado que o DFCAF apresenta maior solubilidade em DMSO, foi dissolvido neste solvente para depois ser purificado. Na preparação de eluentes para cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCOMMS), prepararam-se os seguintes solventes:

- Solvente A: 0,1% TFA em H₂O
- Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O.

3.3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

O DFCAF bruto (100 mg) foi purificado usando o sistema RP-HPLC Waters (EUA), modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C₁₈, 10µm, 300Å, 2,2x25 cm). O sistema de cromatografia preparativa a gradiente e tempo foram ajustados da seguinte forma:

5%B (95%A) $\xrightarrow{5\text{min}}$ 20%B $\xrightarrow{90\text{min}}$ 65%B $\xrightarrow{5\text{min}}$ 95%B (5%A)

A análise do DFCAF purificado foi realizada usando um sistema da LDC Analytical composto por um controlador de gradiente automático, duas bombas (ConstaMetric 3500 e ConstaMetric 3200), um detector UV (Milton Roy, spectromonitor 3100), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um integrador (TermoSeparation Products, Data Jet integrator) e uma coluna analítica (Vydac C₁₈, 5µm, 300Å, 0,46x25 cm). Foram injetados 7µL de amostra de uma solução 1 g/L de DFCAF dissolvido em DMSO, com gradiente linear de 5%-95% do Solvente B por 30 min.

Esses equipamentos são de responsabilidade da Profa. Maria Teresa Machini (Laboratório de Química de Peptídeos, IQUSP).

3.3.2.2 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)

O DFCAF foi injetado num equipamento composto por um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão, fluxo 0,8 mL/min), composto por um degaseificador modelo DGU-20A₃, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C₁₈ (5 x 2 mm, 4,6mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C₁₈ (150 x 2mm, diâmetro de partícula = 4,6 µm e diâmetro de poro = 12 nm) Shim-pack GVP-ODS

acoplada a um espectro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Alemanha) com fonte de ionização do tipo eletrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo ‘Ion trap’. As voltagens aplicadas foram 3500 V (capilar) e 37 kV (cone). Para as análises dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2. Os solventes utilizados na cromatografia foram: solvente A, gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 min [52].

Esses equipamentos são de responsabilidade da Profa. Maria Teresa Machini (Laboratório de Química de Peptídeos, IQUSP).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE DFCAF

3.4.1 Análise elementar

A composição elementar do ligante DFCAF obtido na forma sólida foi determinada no equipamento Perkin Elmer Elemental Analyzer CHN 2400 (Central Analítica do IQUSP) para a quantificação de C, H, N e S, a fim de determinar preliminarmente sua composição. Também foram analisadas as composições elementares dos reagentes de partida, DFO e T7A.

3.4.2 Ponto de fusão

Determinaram-se as temperaturas de fusão do ligante DFCAF e também dos reagentes de partida T7A e DFO no equipamento MQAPF 301 (Laboratório Didático de Química Orgânica, IQUSP) (Figura 24).

Figura 24. Aparelho digital de temperatura de fusão

3.4.3 Termogravimetria

O ligante DFCAF, os precursores T7A e DFO, e a mistura física entre ambos (nas proporções estequiométricas usadas na síntese, ou seja, 1:1) foram encaminhados para análise termogravimétrica no equipamento Hi-Res TGA modelo 2950 HR V5.4 (Central Analítica, IQUSP), em atmosfera de N_2 com uma rampa de aquecimento de $10^\circ C/min$.

3.4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O ligante DFCAF, os precursores T7A e DFO, e a mistura física entre ambos (nas proporções estequiométricas usadas na síntese, ou seja, 1:1) foram encaminhados também para espectroscopia na região do infravermelho em pastilhas KBr no equipamento Bomem MB100 (Central Analítica do IQUSP) a fim de determinar os grupos funcionais presentes.

3.4.5 Espectroscopia vibracional Raman

O ligante DFCAF foi investigado no microscópio Raman Renishaw in-Via equipado com uma lente de amplificação de 50× (Abertura Numérica, NA = 0,75). O comprimento de onda de excitação foi 785 nm de um laser de estado sólido (modelo HPNIR785). A potência do laser na amostra foi ajustada para aproximadamente 5 mW. O equipamento é de responsabilidade da Profa. Dra. Paola Corio (Laboratório de Espectroscopia Molecular, IQUSP).

3.4.6 Espectroscopia UV/Visível

Registraram-se os espectros eletrônicos do DFCAF, de cafeína e do DFO (todos 100 µM em HCl 0,1 M contendo 10% de DMSO). O aparelho usado foi um leitor de microplacas multimodal SpectraMax M4 controlado pelo software SoftMax Pro 6.1, em cubetas de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm, de propriedade do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos (IQUSP).

3.4.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (¹H RMN)

O espectro ¹H RMN do DFCAF foi obtido no espectrômetro Bruker modelo A3-500 disponível na Central Analítica do IQUSP. As amostras foram preparadas em DMSO deuterado e medidas a 298 K.

3.5 PROPRIEDADES DO LIGANTE DFCAF

3.5.1 Determinação da constante de estabilidade efetiva do complexo $\text{Fe}^{(\text{III})}\text{DFCAF}$

A determinação da constante de estabilidade efetiva (K_{ef}) do complexo entre ferro(III) e DFCAF foi feita a partir da recuperação da fluorescência da calceína, através do equilíbrio competitivo entre DFCAF e calceína pelo ferro [53].

Inicialmente, a fluorescência de 95 μL de calceína 2 μM em tampão HBS/Chelex foi medida até a estabilização (~15 min) em microplacas transparentes de 96 poços (TPP). Adicionaram-se em seguida 95 μL de uma solução aquosa 2 μM de sulfato ferroso amoniacal (FAS) a fim de formar *in situ* o complexo $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -calceína¹ e, assim, induzir a imediata supressão da fluorescência da calceína. A leitura foi feita até a estabilização do sinal (~ 25 min). Finalmente, a recuperação da fluorescência foi tentada através da adição de alíquotas de 10 μL de DFCAF (concentração final de 0 a 5 μM , em DMSO 50% em água). A fluorescência foi registrada a 37°C no aparelho BMG Fluorstar Optima com $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/520 \text{ nm}$.

3.5.2 Titulação espectrofotométrica

Usamos o método dos gráficos de Job (Job's plots), os quais servem essencialmente para obter informação sobre a estequiometria de formação de complexos, adutos ou compostos de inclusão. Neste caso, investigamos a estequiometria de ligação de íons ferro com o ligante polidentado DFCAF a fim de determinar se o ambiente de coordenação (DFO) permanecia inalterado após a conjugação à cafeína. Comparamos o gráfico de Job do DFCAF com o gráfico Job do DFO, posto que a estequiometria do $\text{Fe}(\text{DFO})$ é conhecida (1:1) [54].

¹ O complexo férrico da calceína é o mais estável. Adiciona-se à solução ferro(II) para diminuir reações de hidrólise e aumentar a velocidade de complexação. No momento da coordenação, o íon metálico é oxidado a ferro(III).

As soluções aquosas de ferro FAS (sulfato ferroso amoniacal), DFO e DFCAF foram preparadas em DMSO 10%, devido à baixa solubilidade do DFCAF em água, a partir de estoques 1 mM. Os espectros eletrônicos UV/visível dos complexos ligante-ferro foram obtidos em placas transparentes de 96 poços utilizando um leitor de microplacas SpectraMax M4, fazendo uma varredura de comprimento de onda λ : 350-750nm, a 30°C. As combinações Fe-DFO e Fe-DFCAF foram preparadas em diferentes proporções de ferro e ligante (7 proporções), sendo o número de mols totais constante como se mostra na Tabela 4. O tempo de equilíbrio após a mistura dos reagentes foi de 30 minutos.

Tabela 4. Proporção metal-ligante, razão molar e número de mols totais

Fe^{2+} (μ L)	DFO ou DFCAF (μ L)	Razão: $\frac{[metal]}{[metal]+[Ligante]}$	Mols totais ($\times 10^{-9}$)
0	90	0,00	90
15	75	0,17	90
30	60	0,34	90
45	45	0,5	90
60	30	0,67	90
75	15	0,84	90
90	0	1,00	90

3.5.3 Avaliação da capacidade quelante do DFCAF com Fe(III), Cu(II) e Mn(II)

O DFCAF é um conjugado desferrioxamina-cafeína, portanto espera-se que a parte correspondente à desferrioxamina no novo ligante tenha atividade quelante. Para estabelecer isso, foi avaliada a atividade do DFCAF como ligante de três metais: Fe, Cu e Mn, através dos espectros eletrônicos dos complexos formados. Tais espectros foram obtidos em microplacas transparentes de 96 poços (TPP), utilizando um leitor de microplacas SpectraMax M4.

A solução do metal Fe(II) e dos ligantes foram preparados em água com 10% de DMSO em pH= 6. A solução do metal Cu(II) e dos ligantes foram preparados em água com 32,5% de DMSO em pH= 8 (ajustado com NaOH) em agitação por 2 horas. A solução do metal Mn(II) e dos ligantes foram preparados no DMSO, devido à baixa solubilidade na formação do complexo com DFCAF em água, e em agitação ao ar livre por 24 horas. As proporções estequiométricas metal:ligante foram sempre 1:1, e as concentrações dos metais foram 1 mM (Fe), 7 mM (Cu) e 42 mM (Mn). Tais concentrações foram diferentes porque as absorvidades molares de cada um dos complexos eram diferentes.

3.5.4 Atividade antioxidante frente ao sistema ferro/ascorbato

A detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pela presença de ferro, em meio fisiológico, é possível através da reação de uma mistura pró-oxidante (ascorbato e ferro) com a sonda fluorimétrica cloreto de dihidrorodamina (DHR). Na forma reduzida, essa sonda não é fluorescente, entretanto, uma série de substâncias (ERO's, O₂) pode convertê-la à forma oxidada, fluorescente (Figura 25). Adaptamos o método para nosso estudo, sendo originalmente concebido para a detecção de ferro redox-ativo em meio fisiológico [55-56].

Figura 25. Princípio de funcionamento do método de detecção de espécies reativas formadas pela presença de ferro. A adição de um pró-oxidante (ácido ascórbico) inicia a produção de ERO's catalisada pelo Fe^{3+} presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente (a). Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de Fe; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de Fe (b). A taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração de Fe, podendo ser usada para quantificar a concentração do metal na amostra desejada (c) [6].

O complexo padrão para esses ensaios é o nitrilotriacetato férrico, $\text{Fe}(\text{NTA})$. $\text{Fe}(\text{III})/\text{NTA}$ foi formado pela mistura de ácido nitrilotriacético 70 mM, titulados para pH 7,0 com NaOH, com uma massa de FAS suficiente para produzir a concentração final de 20 mM em ferro. A razão molar Fe:NTA é 1:7. A mistura foi aquecida a 37°C por 30 minutos, sob agitação, para permitir que o $\text{Fe}(\text{II})$ se oxidasse a $\text{Fe}(\text{III})$ [55].

Em microplacas transparentes de 96 poços foram adicionados 180 μL de uma mistura de dihidrorodamina (DHR) 50 μM com ácido ascórbico (40 μM) em tampão HBS/Chelex. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de solução de $\text{Fe}(\text{NTA})$ a distintas concentrações finais (entre 0 e 1 μM). Em seguida, foram adicionados 10 μL da solução dos quelantes (DFO, DFCAF e do padrão de atividade anti-oxidante deste ensaio, a deferiprona) a concentração final constante de

18 μM . A leitura foi feita em equipamento BMG Fluostar Optima, com incubação a 37°C e $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/520$ nm. A intensidade de fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de um minuto durante uma hora. Os resultados são apresentados como taxas de fluorescência (intensidade de fluorescência/tempo).

Uma modificação desse ensaio foi manter a concentração de Fe(NTA) constante em 2 μM e variar a concentração dos quelantes de 0 a 10 μM .

O mesmo teste foi realizado para a cafeína e seus outros dois metabólitos (teofilina e teobromina) variando as concentrações de 0 a 100 μM , e mantendo a concentração constante do Fe(NTA) em 2 μM .

3.5.5 Atividade antioxidante pelo método ORAC modificado

O *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) é um método de medição de capacidade antioxidante. O ensaio originalmente proposto mede a degradação oxidativa de uma molécula fluorescente (fluoresceína) promovida por radicais livres como 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) (AAPH). Candidatos a antioxidantes devem proteger a molécula fluorescente de tal degradação oxidativa. Nós utilizamos como sonda fluorimétrica a DHR em lugar da fluoresceína, em função dos melhores resultados obtidos. Espera-se que, quanto maior seja o efeito antioxidante, menor será a intensidade fluorescente [57].

O protocolo original [58] foi portanto adaptado como segue. Em microplacas transparentes de 96 poços foram adicionados 10 μL das soluções de estudo 0 – 100 μM em DMSO. Posteriormente, foram adicionados 150 μL de uma solução de dihidrorodamina (DHR) 0,5 μM em tampão HBS/Chelex deixando em incubação a 37°C por 25 min. Finalmente foram adicionados 25 μL de AAPH 0,3 M preparado em tampão HBS/Chelex. A leitura foi feita no equipamento BMG Fluostar Optima, a 37°C e $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/520$ nm com incubação a 37°C. A intensidade de

fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de um minuto durante uma hora. Os resultados são apresentados como intensidade de fluorescência/tempo.

3.5.6 Atividade antioxidante por absorbância por DPPH

O 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) é um radical livre estável de coloração violeta intensa em solução metanólica ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) que, quando neutralizado, perde a coloração. É tradicionalmente usado, portanto, para estudar a atividade anti-radicalar de uma série de candidatos a antioxidantes [59]. Medimos a atividade antioxidante do DFCAF, DFO, cafeína e outros padrões através do monitoramento da banda característica do DPPH [60].

O procedimento foi seguido conforme descrito na literatura [58]. Em microplacas transparentes de 96 poços foram transferidos 125 μL de DPPH 0,1 mM em metanol e em seguida foi adicionados 56,3 μL de HBS/Chelex®. Finalmente foram adicionados 6,3 μL das soluções de estudo 0 – 100 μM em DMSO, deixando em incubação por 30 min a temperatura ambiente e no escuro. A leitura foi feita em um leitor de microplacas SpectraMax M4 a temperatura ambiente, a $\lambda=520 \text{ nm}$.

3.6. ESTUDO DA PERMEABILIDADE DE DFCAF EM CÉLULAS HeLa

Utilizaram-se células de câncer cérvico-uterino (HeLa) cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle (DMEM) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, a 37°C e 5% de CO_2 numa incubadora modelo COM-18AC-PA. As células foram repicadas com tripsina-EDTA 0,25% por 5 minutos a 37°C e, quando necessário, foram transferidas a microplacas estéreis tratadas de 6 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço; 1 mL) e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas para completar a aderência e confluência das células nos poços.

3.6.1 Microscopia de fluorescência

As células foram tratadas com acetometoxi-calceína, ou Cal-AM, a forma permeável a células da calceína, que na forma esterificada não é fluorescente mas que, quando no citosol, o grupo acetometoxi é clivado por esterases e a molécula torna-se fluorescente. A adição de ferro na combinação sulfato ferroso/ácido ascórbico induz uma rápida sobrecarga de ferro nas células, o que suprime sua fluorescência. A adição de quelantes ao meio somente recuperará a fluorescência da sonda caso sejam também capazes de penetrar a célula [53].

No experimento, as células plaqueadas (microplacas de 6 poços) tiveram o meio removido e foram lavadas com tampão (HBS/Chelex®) pré-aquecido a 37°C. Foi adicionado a cada poço 1 mL de Cal-AM 1 µM em tampão, e a placa foi incubada a 37°C por 20 min. Foi removida a solução e cada poço lavado com 1 mL de tampão a 37°C, sendo em seguida adicionado a cada poço (menos ao Branco 1) 1 mL de uma solução de FAS 10 µM/ácido ascórbico 100 µM em água. Após nova incubação a 37°C por 20 min, os poços foram lavados com 1 mL de tampão a 37°C; em seguida, foram adicionados 1 mL de tampão e 50 µL da solução dos ligantes (DFO ou DFCAF 1 mM em DMSO; Figura 26) e a placa foi incubada a 37°C por 30 min. A incubação foi feita no leitor de microplacas BMG Fluostar Optima. As imagens foram obtidas no microscópio Axiovert 200 (Carl Zeiss 146 Göttingen, Alemanha). O conjunto de filtros usados foram: λ_{ex} = 450-490nm; λ_{em} $\geq$ 515nm. As imagens foram registradas em câmera digital Canon Power Shot G10. O estudo da densidade de pixels foi feito com o programa ImageJ (v. 1.43u).

Figura 26. Distribuição dos ensaios de permeabilidade dos quelantes. Foram estabelecidos dois controles: ausência de ferro (branco 1) e ausência de quelante (branco 2)

3.6.2 Espectroscopia de Absorção Atômica

Outra maneira de quantificação da permeabilidade dos quelantes é monitorar o aumento na concentração de ferro intracelular promovido pelos ferro-derivados dos quelantes (DFO ou DFCAF). Esse monitoramento pode ser feito através da técnica de absorção atômica. Foram preparados os complexos entre ferro e o fitato (em princípio permeável às células [61, 62]), DFO e DFCAF. Todos os estoques dos complexos foram obtidos em DMSO, exceto o Fe(PHYT) (água). Todos foram obtidos na razão molar 1:1. Um poço foi mantido como branco (Figura 27).

Figura 27. Distribuição das células HeLa ($2,5 \times 10^4$ células/poço) na microplaca de 6 poços

As células foram plaqueadas conforme descrito acima. O meio foi removido e as células foram lavadas com tampão (HBS/Chelex®) a 37°C. Foi adicionado a cada poço (menos ao Branco 1 ao qual se adicionou 1 mL de tampão) 1 mL de solução dos complexos 50 µM em tampão, e em seguida incubou-se a microplaca a 37°C por 30 min. A solução dos complexos foi removida e os poços foram lavados duas vezes (exceto o branco 1, ao qual se lavou com 1 mL de tampão) com 1 mL de uma solução de DFO 100 µM em tampão. Finalmente cada poço foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão a 37°C. A incubação se realizou no BMG Fluostar Optima.

A microplaca foi deixada em dessecador por 24 horas. As células foram raspadas e pesadas. Em seguida foram tratadas com 300 µL de ácido nítrico (67%) e 100 µL de peróxido de hidrogênio (30%) com agitação por 5 minutos e avolumação para 2 mL com água deionizada. A quantificação de ferro foi realizada num espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite ZEEnit® 60, Analytikjena AG (Jena, Alemanha). Como fonte de radiação foi usada uma lâmpada de cátodo oco de Fe ($\lambda = 302,1$ nm), fenda de 0,8 nm e corrente de 4 mA. O experimento foi executado pela equipe da Profa. Dra. Cassiana Seimi Nomura (IQUSP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE DO LIGANTE DESFERRIOXAMINA-CAFEÍNA (DFCAF)

Completada a síntese, e depois de lavar e secar o produto, como já foi descrito, pesou-se o DFCAF bruto. O produto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e uma porção do produto (DFCAF puro) foi obtido da liofilização da fração mais pura, 41 mg. Na Figura 28 mostram-se as fotografias do DFCAF bruto e purificado.

Figura 28. Aparência física do DFCAF. a) Bruto e b) purificado.

A reação estequiométrica na síntese é:

A massa molecular teórica do DFCAF é 780,8 g/mol.

4.2 PURIFICAÇÃO DO LIGANTE DESFERRIOXAMINA-CAFEÍNA (DFCAF)

Solubilidade do DFCAF

Encontrar um bom solvente para o DFCAF foi importante para o desenvolvimento das análises subsequentes, começando com a purificação por cromatografia. O DFCAF teve pouca solubilidade com solventes comuns, da mesma forma com a cafeína e seus metabólitos teofilina e teobromina (ao contrário do DFO, que apresenta grande solubilidade aquosa).

A cafeína e seus metabólitos são xantinas pertencentes à família dos alcalóides de purina e, portanto, são bases naturais fracas [63]. A cafeína é uma molécula com polaridade relativamente baixa em comparação com a água, tal que a solubilidade em água é baixa por causa da elevada polaridade do solvente. Teofilina e teobromina, devido à presença de um átomo de H ligado ao N (Fig. 29), podem ter interações fortes do tipo ligação de hidrogênio apresentando melhor solubilidade em solventes polares próticos (2-propanol, metanol e água), ao contrário da cafeína que é totalmente metilada [64].

Figura 29. Cafeína e seus metabólitos.

A solubilidade da cafeína (e DFCAF) é maior em solventes polares apróticos, com polaridade moderada (Tabela 5 [65]), sendo o dimetilsulfóxido (DMSO) o melhor solvente.

Tabela 5. Polaridade dos solventes [65]

<i>Solvente</i>	<i>Momento dipolar μ (D)</i>	<i>Constante dielétrica ϵ</i>
Acetato de etila	$1,78 \pm 0,09$	6,0814
Acetonitrila	3,925	36,64
Diclorometano	$1,60 \pm 0,03$	8,93
DMSO	$3,96 \pm 0,04$	47,24

Purificação cromatográfica do DFCAF

Na purificação por cromatografia se obteve em primeiro lugar o perfil cromatográfico monitorado por luz UV ($\lambda = 210$ nm) e o espectro de massas dos íons do produto bruto, como se mostra na Figura 30. A fonte de ionização por eletrospray (ESI) tem a função de ionizar o produto de maneira suave, preservando assim sua estrutura, e de transferir as espécies a serem analisadas ao analisador de massas, o qual separa os íons formados de acordo com suas relações m/z [66].

O perfil cromatográfico do DFCAF impuro mostrou dois picos, o primeiro deles referente ao solvente DMSO nos minutos 3-5, e o segundo correspondente ao DFCAF no minuto 13. O espectro de íons mostra também dois picos, no qual o segundo pico corresponde ao DFCAF, $m/z = 781,5$ (M_w DFCAF= 780,8 g/mol).

Figura 30. DFCAF bruto (impuro): a1) cromatograma, a2) espectro de íons, b) espectro de massas do primeiro pico e c) espectro de massas do segundo pico.

A purificação foi realizada por RP-HPLC nas condições já descritas. A verificação da pureza do DFCAF foi realizada através de um novo cromatograma e espectro de íons como se mostra na Figura 31.

Figura 31. DFCAF purificado: a1) espectro cromatográfico, a2) espectro de íons, b) espectro de massas do pico nos minutos 13,7-15,3.

O perfil cromatográfico mostra a presença de um único pico, entre os minutos 13,7-15,3. O espectro de íons mostra uma alta intensidade do íon principal (DFCAF: $m/z = 781,5$) além da presença de outros íons que correspondem às fragmentações e rearranjos da molécula, tal como é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Massa molecular teórica e experimental do DFCAF e seus fragmentos

Molécula (Mw teórica g/mol)	Mw experimental (g/mol)	Carga	Massa (g/mol)
DFCAF (780,8)	780,4	2+	391,2
	780,5	1+	781,5
(DFCAF+CH ₃ CN) ⁺ (865,4)	866,4	1+	867,4
2 DFCAF (1561,6)	1560,7	1+	1561,7
Parte do DFCAF: C ₂₃ H ₃₇ N ₈ O ₇ (537,2)	538,3	1+	539,3
DFCAF + (DFCAF+CH ₃ CN) ⁺ (1646,2)	1646,8	1+	1648,6

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE DFCAF

Procedeu-se à caracterização do produto sintetizado DFCAF (Figura 32).

Figura 32. Molécula DFCAF

4.3.1 Análise elementar

O sólido formado foi encaminhado para análise elementar a fim de determinar preliminarmente sua composição. Sintetizou-se duas vezes o DFCAF e as amostras foram chamadas E02 e E03 (DFCAF bruto). Os valores teóricos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Análise elementar dos produtos E02 e E03

	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
Teórico	52,25	7,17	17,93
E02	50,96	7,42	17,21
E03*	50,96	7,65	17,09

(*) apresentou também 0,75% de enxofre.

Embora haja presença de enxofre como contaminante presente na amostra E03 (proveniente do mesilato de desferrioxamina), a porcentagem é menor do que 1%.

Para o cálculo da possível presença de solventes na molécula, aplicamos o software Jasper V.2.0², sendo o melhor ajuste correspondente à fórmula $C_{34}H_{56}N_{10}O_{11} \cdot 0,5CH_4O \cdot 0,9H_2O$ (massa molecular = 813,08 g/mol). A fórmula molecular esperada do DFCAF é $C_{34}H_{56}N_{10}O_{11}$ (massa molecular = 780,88 g/mol). A presença de metanol e água coincide com os solventes usados na lavagem do produto, e representa 3,9% da massa total.

Também foram calculadas as composições dos reagentes de partida (Tabela 8). Esses valores não coincidem com os resultados do estudo obtidos para amostras E02 ou E03, evidenciando que tais amostras são diferentes dos reagentes precursores.

² <http://www.chem.yorku.ca/profs/potvin/Jasper/jasper2.htm>

Tabela 8: Composição elementar teórica dos precursores DFO e T7A

	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
<i>Desferrioxamina</i> <i>(sal mesilato)</i>	47,50	7,92	12,79
<i>T7A</i>	45,34	4,20	23,51

Doravante, todos os testes foram feitos com a amostra de DFCAF correspondente a E02.

4.3.2 Temperaturas de fusão

Determinaram-se as temperaturas de fusão da T7A, mesilato de desferrioxamina e do produto DFCAF (Tabela 9).

Tabela 9: Temperaturas de fusão (°C)

	DFCAF	DFO	T7A
Temperatura	183,5-186,3	110,4-111,7	270-272

Como se observam os pontos de fusão do produto e seus precursores são muito distintos entre si, evidenciando a formação de um novo produto. Além disso, a faixa de temperatura de fusão é bem estreita, indicando que não há presença de contaminantes.

4.3.3 Termogravimetria

O DFCAF, os precursores T7A e desferrioxamina, e a mistura física entre ambos (nas proporções estequiométricas usadas na síntese) foram encaminhados para análise termogravimétrica. Os diagramas de análise térmica (TGA) e suas primeiras derivadas encontram-se nas Figuras 33 a 36.

Figura 33. Diagrama de análise térmica do produto DFCAF

Figura 34. Diagrama de análise térmica da T7A

Figura 35. Diagrama de análise térmica do DFO

Figura 36. Diagrama de análise térmica da mistura física entre DFO e T7A

A partir desses diagramas, listaram-se as temperaturas dos principais eventos de termodecomposição (Tabela 10).

Tabela 10: Eventos de termodecomposição ($^{\circ}\text{C}$). Entre parênteses: % de perda de massa

	1	2	3	4
DFO	191,47 (21,71)	266,34 (36,04)	301-343 (23,34)	423-484 (7,881)
DFCAF	183,02 (28,95)	238-335 (49,33)	394-433 (6,067)	710-760 (12,15)
T7A	101,99 (5,203)	283,86 (84,39)	492,90 (9,462)	770-860 (5,717)
Mistura física	97,13 (3,998)	187,11 (11,35)	294,91 (31,77)	367,80 (41,75)

Para uma melhor visualização da variação de massa em relação à temperatura, a seguir mostram-se os perfis de perda de massa em relação à temperatura de cada um dos compostos testados.

Figura 37. Perfis termogravimétricos comparativos do DFO, T7A, DFCAF e mistura física.

Da Figura 37 infere-se que o perfil do produto é diferente dos perfis dos reagentes de partida e de uma simples mistura de ambos, de modo que podemos dizer que temos realmente um produto

diferente. O perfil do produto tem várias semelhanças com o perfil de DFO e isso é razoável, pois a maior massa molecular do nosso produto deve ser fornecida pelo DFO.

4.3.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os produtos DFCAF, T7A, desferrioxamina e a mistura foram encaminhados também para espectroscopia na região do infravermelho em KBr a fim de determinar os grupos funcionais presentes (Figura 38).

Figura 38. Espectro de infravermelho em KBr de mesilato de desferrioxamina (DFO), T7A, DFCAF e a mistura de DFO e T7A (1:1).

As principais bandas são listadas na Tabela 11, seguidas das atribuições sugeridas.

Tabela 11: Atribuição das bandas de infravermelho (valores em cm^{-1}). Números em destaque com formatos iguais representam as mesmas bandas nos diferentes compostos. ν : estiramento; δ : deformação

Banda	DFO	DFCAF	T7A	Mistura	Referência
Deformação OCO	-	-	688	688	[67]
Vibrações do anel, $\nu\text{C-N}$ ou $\delta\text{N-H}$	1164 1197 1238 1396 1413 1461	1163 1196 1238 1396 1414 <u>1348</u> 1460	1331 1435 1459	1163 1194 1241 1397 1409 <u>1331</u> 1435 1459	[68]
$\nu\text{C=C}$, $\nu\text{C=N}$ ou δNH	1569	1566	1551	1551	[68]
$\nu\text{C=O}$ (hidroxamico)	1628	1627	-	1627	[69]
$\nu\text{C=O}$ do C(2)	-	1672	1656	1657	[70]
$\nu\text{C=O}$ do C(6)	-	1708	1707	1707	[70]
$\nu\text{C=O}$ ácido carboxílico	-	-	1732	1731	[70]
$\nu\text{O-H}$ ácido carboxílico	-	-	2572 2625 2747 2963 2998 3136 <u>2855</u>	2571 2637 2747 2962 2998 3136 <u>2857</u>	[70]
$\nu_s\text{CH}_2$	2929	2929	-	2930	[69]
$\nu\text{N-H}$ (amina secundária)	3313	3306	-	3313	[69]
$\nu\text{O-H}$ água	-	-	3481	3487	[70]

De acordo com os dados da Tabela 11, observa-se que não ocorrem as bandas de vibração C=O (1731 cm^{-1} ; [70]) nem de deformação O=C-O (688 cm^{-1} ; [67]) típicas do ácido carboxílico. Ambas estão presentes apenas na T7A e na mistura física, mas era esperado que esse grupo

carboxilato fosse removido durante a conjugação que dá origem ao DFCAF (Figura 22). Se mostram também bandas de vibração C=O (1728cm^{-1} ; [69]) típicas dos estiramentos hidroxâmicos, bem como da vibração CH₂ (2929cm^{-1} ; [69]) presente apenas no DFO, DFCAF e na mistura. Tais resultados corroboram o êxito da síntese. Uma série de bandas de meia intensidade na região de 2500 a 2800cm^{-1} , correspondentes na T7A a estiramentos do grupo OH carboxílico, também estão ausentes no produto, conforme esperado.

Um conjunto de bandas entre 1100cm^{-1} e 1400cm^{-1} refere-se às vibrações do anel xantínico, estiramentos N-H ou C-N. Encontram-se nos quatro compostos analisados, entretanto, seu número é menor no caso da T7A, talvez porque não apresenta ligação N-H.

Existem vibrações na região de 1650cm^{-1} e 1708cm^{-1} que são características do C(2) e C(6) da T7A respectivamente, e que obviamente também aparecem na mistura física.

4.3.5 Espectroscopia vibracional Raman

As espectroscopias Raman e Infravermelho (IV) são técnicas complementares e portanto se requerem para medir completamente os modos de vibração da molécula. Embora algumas vibrações possam ser ativas tanto em Raman e IV, estas duas formas de espectroscopia surgem dos diferentes processos e regras diferentes de seleção. Em geral, a espectroscopia Raman é melhor nas vibrações simétricas de grupos não polares, enquanto a espectroscopia IV é melhor nas vibrações assimétricas de grupos polares. A molécula do DFCAF tem vibrações de ambos os tipos, se espera então a presença de novas vibrações, devido à mudança de polarizabilidade e a corroboração de outras já apresentadas no IV.

DFCAF, T7A e a desferrioxamina foram analisados por espectroscopia vibracional Raman a fim de determinar os grupos funcionais presentes (Figura 39).

Figura 39. Espectro Raman da desferrioxamina (DFO), T7A e DFCAF.

Como se mostra na figura 39, o espectro Raman apresenta sinais na região 500-1800 cm^{-1} e 2600-3200 cm^{-1} . As principais bandas são listadas na Tabela 12, seguidas das atribuições sugeridas.

Tabela 12: Atribuição das bandas de Raman (valores em cm^{-1}). ν : estiramento, δ : deformação e ρ : balanço.

Banda	DFO	DFCAF	T7A	Referência
<i>Vibrações do anel xantínico</i> $\delta(\text{anel}) + \delta(\text{CNO}) + \delta(\text{CH})$	-	447, 668	447, 668	[71]
$\delta(\text{C-N-CH}_3)$,	-	515	515	[72]
$\delta(\text{O=C-C})$ anel	-	760	760	[72]
$\nu(\text{C-N})$ anel	-	1244,1331,	1244, 1331	[72]
$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C-N}) + \delta(\text{CH}_3)$	-	1611	1611	[71]
$\nu(\text{C=O})$: C2(T7A)+ $\nu(\text{C=C})$, $\nu(\text{C=C})$	-	1664, 1707	1664, 1707	[71]
$\delta(\text{N-C-C})$	547	547	547	[72]
<i>Amida ternária</i> $\nu_s(\text{C-N-C})$, $\nu(\text{C-N})$	779, 1302	779, 1302	779, 1302	[73]
<i>Amida secundária</i> $\nu_s(\text{C-N-C})$	997	997	997	[73]
$\rho(\text{CH}_3)$	847	847	847	[71]
$\delta(\text{C-N-H})$	860	860	860	[72]
$\delta(\text{N-C-H})$	920	920	920	[72]
<i>Acido carboxílico</i> $\nu_s(\text{COO}^-)$, $\nu(\text{C=O})$	-	-	1430, 1741	[74-78, 79]
Hidroxamato: $\nu(\text{C=O})$	1626	1626	-	[73]
<i>Outras vibrações xantínicas</i> $\nu_a(\text{C-N})$	-	-	1220	[72]
$\delta(\text{CH}_3)$, $\nu_a(\text{N-H})$	-	-	1425, 3010	[71, 72]
$\delta(\text{CH}_3)$	-	-	1484	[71]
$\nu(\text{anel pirimidínico}) + \delta(\text{CH}_3)$	-	-	1570	[71]
$\delta(\text{C-H})$	-	-	3007, 2963	[72]
<i>Vibrações de alcanos de cadeia</i> $\nu(\text{C-N})$	1200	1200	-	[80]
$\delta(\text{C-H})$	1446, 1462	1446, 1462	-	[73]
<i>Vibrações características do DFO</i> $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{N-O})$	1049, 1088	1049, 1088	-	[73]
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2862, 2900	2862, 2900	-	[73]
$\nu_a(\text{CH}_2)$	2937, 2966	2937, 2966	-	[73]
$\delta(\text{CH-N})$, $\delta(\text{CH-N}) + \delta(\text{CH}_3)$	1085, 1189	1085, 1189	-	[71]

De acordo com os dados da Tabela 12 se observa que não ocorrem as bandas de vibração C=O (1741 cm^{-1} ; [79]) nem de deformação O=C-O⁻ (1430 cm^{-1} ; [74-78]) típicas do ácido carboxílico. Ambos estão presentes apenas na T7A, mas era esperado que esse grupo carboxilato fosse removido durante a conjugação que dá origem ao DFCAF (Figura 22). Se mostram também bandas de vibração C=O (1626 cm^{-1} ; [73]) típicas dos estiramentos hidroxâmicos, bem como da vibração CH₂ (2862 , 2900 , 2937 e 2966 cm^{-1} ; [73]) presente apenas no DFO e no DFCAF, da mesma forma que no espectro IV.

Aparecem várias vibrações de estiramento simétricas que não foram percebidas no IV, e um conjunto de bandas $\delta(\text{N-C-C})$, $\nu_s(\text{C-N-C})$ e $\nu(\text{C-N})$ de amida terciária, $\nu_s(\text{C-N-C})$ amida secundária, $\rho(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{C-N-H})$ e $\delta(\text{N-C-H})$ encontram-se nos três compostos analisados.

Aparecem vibrações das ligações simples e múltiplas de carbono, que não aparecem no IV devido provavelmente à manutenção no momento dipolar, $\nu(\text{C-C})$ (1049 cm^{-1}) e $\nu(\text{C=C})$ (1611 cm^{-1} , 1707 cm^{-1}). Também aparecem vibrações de alcanos de cadeia que não apareciam no espectro IV como $\nu(\text{C-N})$ a 1200 cm^{-1} e $\delta(\text{C-H})$ no 1446 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} . Estes sinais só estão presentes para o DFO e DFCAF.

No espectro aparecem maior quantidade de sinais características do anel xantínico em comparação com o espectro IV, correspondentes a vibrações de estiramento e deformação, e se mostram vibrações características N-H, C-N e CH₃ do anel xantínico só na T7A.

Não se perceberam os sinais de vibração dos grupos carbonilos correspondentes ao grupo xantínico e o sinal de vibração C=N que apareceram no espectro IV só para a T7A, provavelmente devido a que não se teve mudança na polarizabilidade na ligação das moléculas.

Existem vibrações na região 1664 cm^{-1} que são características do C(2) da T7A e que também aparecem no DFCAF. Os resultados corroboram o êxito da síntese.

4.3.6 Espectroscopia UV/Visível

O DFCAF é um conjugado de desferrioxamina-cafeína. A fim de averiguar a integridade estrutural da cafeína no conjugado, analisamos seu espectro eletrônico de absorção UV-Vis a fim de correlacionar a estrutura e posição dos máximos de absorção com o espectro eletrônico da cafeína.

A forma mais básica de análise quantitativa instrumental é a espectroscopia de absorção UV-Vis. A luz é absorvida por uma molécula e esta absorção pode ser monitorada facilmente. O espectro de radiação eletromagnética da cafeína se deve às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (ultravioleta distante e próximo) e devido a essa transição se dá a absorção com λ_{max} em 272,8 nm em água [81] e 274 nm em DMSO [82].

Os espectros eletrônicos da cafeína, DFO e DFCAF foram obtidos em solução de HCl 0,1 M, onde a cafeína apresenta um λ_{max} em 272,6 nm [83]. Devido à baixa solubilidade do DFCAF, foi necessário realizar as análises com 10% DMSO para cada composto.

A Figura 40 mostra os espectros eletrônicos das soluções de estudo. Todos os compostos dissolvidos em DMSO (10%) apresentaram uma banda de absorção em 229 nm característica do DMSO. O DFO 10% DMSO e o branco HCl 0,1M não apresentam bandas na região de 272 nm característica da cafeína. Tal banda foi observada apenas na cafeína (tanto em HCl 0,1 M quanto em HCl 0,1 M + 10% DMSO) e no DFCAF (HCl 0,1 M + 10% DMSO), indicando assim a permanência da cafeína no conjugado.

Figura 40. Espectros eletrônicos UV/Vis. Cafeína, DFO e DFCAF 100 μ M

4.3.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN)

Continuando com a caracterização, o DFCAF foi estudado por RMN. Na Figura 41 se mostra o espectro de ^1H RMN obtido e na Tabela 13 se mostram as designações dos deslocamentos químicos dos prótons [84-86].

Figura 41. Espectro 1H RMN do DFCAF

Tabela 13. Deslocamentos químicos do espectro 1H RMN do DFCAF

Próton	δ (ppm)	Referência
	1,21 (6H)	[84]
	1,37 (6H)	[84]
	1,50 (6H)	[84]
	1,98 (3H)	[84]
	2,29 (4H)	[84]
DMSO (CH ₃)	2,54 (3H)	[85]

2,59 (4H)	[84]
3,00 (4H)	[84]
3,23 (3H)	[86]
H ₂ O (Impureza do solvente)	3,33 (2H)	[85]
3,44 (3H)	[86]
3,46 (6H)	[84]
4,90 (2H)	[86]
7,85 (4H)	[85]
8,04 (1H)	[86]

8,20 (1H)	[84]
9,67 (3H)	[84]

4.4 PROPRIEDADES DO LIGANTE DFCAF

4.4.1 Determinação da constante de estabilidade efetiva do complexo Fe^(III)DFCAF

A calceína é um fluoróforo que tem um grupo EDTA capaz de se ligar a íons ferro. Apesar de apresentar alguma afinidade por Fe(II), em atmosfera aberta esse metal se oxida rapidamente a Fe(III) quando coordenado [87], aumentando assim a estabilidade do complexo[88].

Inicialmente é medido só o sinal da calceína (CA) a fim de se esperar a estabilidade (Figura 42). Após a adição de FAS, forma-se rapidamente o complexo CAFe, com supressão da fluorescência (Eq. 16).

Como se observa, a formação do complexo é favorável termodinamicamente.

Após a estabilização da sinal de fluorescência, se adiciona o ligante DFCAF em concentrações finais de 0 a 100 µM, o que provoca a recuperação da fluorescência em proporção direta à quantidade do complexo Fe(DFCAF) (Eq. 17), por competição com a calceína (que tem menor afinidade ao ferro do que o DFCAF).

Embora o ambiente xantínico (caféina) do DFCAF apresente muito baixa atividade quelante de Fe (6% da capacidade quelante do EDTA [90]). O DFO se coordena ao Fe(III) na proporção 1:1 através de 6 átomos doadores de O, formando três anéis quelatos com simetria octaédrica distorcida, $\beta = 10^{42,33}$ [85, 91-93].

Na Figura 42 se observa a recuperação da fluorescência diretamente proporcional à concentração do ligante, tendo a total recuperação de fluorescência da calceína a partir de uma concentração de ligante a partir de 2 μM .

Figura 42. Supressão e recuperação da fluorescência da calceína

A partir dessa figura, é possível calcular a constante de afinidade efetiva (K_{ef}) para o DFCAF, a fim de verificar se o ambiente de coordenação tris(hidroxamato) do DFO foi preservado. Somando-se o inverso da equação 16 com a equação 17, obtemos a Equação 18:

$$\text{Onde } K_{\text{global}} = K_{\text{diss}} \times K_{\text{ef}} = \frac{[\text{CA}][\text{Fe(DFCAF)}]}{[\text{CAFe}][\text{DFCAF}]}.$$

Na Figura 43 se apresenta a porcentagem da recuperação da fluorescência em função da concentração de DFCAF.

Figura 43. Recuperação de fluorescência (%) em função da concentração de DFCAF

Em 50% da recuperação da fluorescência têm-se 50% da calceína livre e 50% da calceína complexada, de modo que nessa situação $[CA] = [CAFe]$, e esses valores se cancelam na Eq. 18. Também nesse ponto, $[DFCAF] = 9,68 \mu M$.

Além de isso, aos 50% de recuperação de fluorescência, metade do ferro total está como CAFe e a outra metade está como Fe(DFCAF). Então, nesse ponto, $[CAFe] = [Fe(DFCAF)] = 1 \mu M$.

Portanto, substituindo-se esses valores na Eq. 18, junto com o valor de K_{diss} oriundo da Eq. 16, encontramos que:

$$K_{global} = \frac{[Fe(DFCAF)]}{[DFCAF]} = K_{diss} \times K_{ef}$$

$$K_{global} = \frac{1 \times 10^{-6}}{9,68 \times 10^{-6}} = 1 \times 10^{-24} \times K_{ef}$$

$$K_{global} = 0,103 = 1 \times 10^{-24} \times K_{ef}$$

$$K_{\text{ef}} = 1,03 \times 10^{23}$$

$$\log K_{\text{ef}} = 23,0$$

A constante efetiva determinada (K_{ef}) tem um valor muito baixo em comparação com a constante termodinâmica de Fe(DFO) ($\log\beta = 42,33$ [93]), devido a que simulamos as condições fisiológicas (salinidade e tampão) além de assumir da literatura uma constante de dissociação para o CAFe determinada em condições de acidez elevada e força iônica nula. Nesse sentido a constante efetiva indica que, nas condições em que provavelmente o DFCAF reagiria com o ferro (meio fisiológico), esse quelante é um bom sequestrador de ferro e, como veremos, forma compostos estáveis o suficiente para suprimir reações oxidativas catalisadas por esse metal.

4.4.2 Titulação espectrofotométrica

Uma complexação binária pode ser estudada mantendo constante a concentração de um dos reagentes, variando a concentração do outro e monitorando uma propriedade física (p. ex. absorvância UV-Vis) que seja alterada em função dessa variação de concentração. O manter um reagente constante, um de cada vez, nos dá uma visão da relação estequiométrica dos reagentes no produto [94]. O método das variações contínuas, ou método de Job, mantém a concentração total dos componentes constantes e varia suas proporções relativas [94].

Para o estudo da estequiometria do complexo Fe(DFCAF) se utilizou o método de Job, já que o produto parte de uma complexação binária (Fe e DFCAF). Se usaram concentrações iguais a 1 mM de DFCAF e Fe, variando-se os volumes de ambos na formação do complexo (portanto, variando-se os mols dos reagentes) mantendo-se um volume final igual a 90 μL (portanto, número de mols totais constante; Tabela 4). A absorvância foi medida depois de 30 min.

Na Figura 44 se apresentam os espectros eletrônicos do complexo Fe(DFCAF) a diferentes razões molares do metal (M) e do ligante (L).

Figura 44. Espectros eletrônicos do complexo $Fe(DFCAF)$ 1mM a várias razões molares

Como se observa na Figura 44, o complexo tem uma absorvância máxima em $\lambda = 430$ nm, sendo os valores apresentados na Tabela 14. Plotando-se as absorvâncias máximas com respeito à fração molar do metal, obtemos o diagrama de Job para o sistema $Fe(DFCAF)$ (Figura 45).

Tabela 14. Absorvância de $Fe(DFCAF)$ a $\lambda = 430$ nm

Ponto #	Razão molar (Fe)	Abs
1	0	0,0451
2	0,17	0,1032
3	0,34	0,1239
4	0,50	0,1260
5	0,67	0,1256
6	0,84	0,1065
7	1,00	0,0424

Figura 45. Diagrama de Job para o complexo Fe(DFCAF)

Na Figura 45 e na Tabela 14 se observa que a absorbância máxima do complexo se dá à fração molar do metal igual a 0,5.

$$0,5 = \frac{[Fe]}{[Fe] + [DFCAF]} \rightarrow [Fe] = [DFCAF]$$

Então, a absorbância máxima do complexo se dá nas mesmas proporções: **1:1**.

Realizou-se também o estudo pelo método de Job para o complexo Fe(DFO) com fins comparativos. Na Figura 46, se apresenta a absorbância do complexo Fe(DFO) em diferentes razões molares do metal (M) e o ligante (L).

Figura 46. Espectros eletrônicos do complexo Fe(DFO) 1mM a várias razões molares

Observa-se na Figura 46 que o complexo tem uma absorbância máxima em $\lambda = 430$ nm, e os valores são mostrados na Tabela 15. Novamente, essas absorbâncias máximas com respeito à fração molar do metal foram plotadas (Figura 47).

Tabela 15. Absorbância de Fe(DFO) a $\lambda = 430$ nm

Ponto #	Razão molar (Fe)	Abs
1	0	0,0454
2	0,17	0,1141
3	0,34	0,13455
4	0,5	0,1421
5	0,67	0,13385
6	0,84	0,1112
7	1	0,0430

Figura 47. Diagrama de Job para o complexo Fe(DFO)

Na Figura 47 e na Tabela 15 se observa que a absorbância máxima do complexo se dá na fração molar do metal igual a 0,5 (**1:1**) como é descrito na literatura [85, 92-93].

Devido à mesma relação estequiométrica do DFCAF e DFO, acreditamos que a capacidade quelante do DFO no conjugado desferrioxamina-cafeína não foi afetada.

4.4.3 Avaliação da capacidade quelante do DFCAF com Fe(III), Cu(II) e Mn(II).

Os complexos de metais de transição apresentam bandas características de absorção na região visível. Comparamos a atividade dos complexos de Fe(III), Cu(II) e Mn(II) com DFCAF e DFO analisando seu espectro eletrônico de absorção.

Complexos de Fe

A eficiência da complexação de Fe(III) com o sideróforo DFO é alta ($\beta = 10^{42,33}$) [96]. A solução do complexo Fe(DFO) é colorida, vermelha em altas concentrações e laranja quando diluída. A coloração deve-se à banda simples de absorção visível, $\lambda_{\text{max}} = 425$ nm, devido a uma transferência eletrônica de carga metal-ligante [95].

Foi preparada a solução de complexos 1:1 de Fe(DFO) e Fe(DFCAF) 1 mM (em água a 10% de DMSO), ambos de cor laranja, a leitura foi realizado depois de 25 minutos. A Figura 48 mostra o espectro eletrônico de ambos complexos e observa-se uma completa sobreposição das bandas.

Figura 48. Espectro eletrônico de Fe(DFCAF) e Fe(DFO) 1 mM em H₂O c/10%DMSO

Complexos de Cu

Devido à preferência pelas coordenações distorcidas hexa- e tetracoordenadas, o Cu(II) liga-se fortemente a dois grupos hidroxamato enquanto o terceiro pode ser bem adequado para a formação de espécies dinucleares [96]. A eficiência da complexação de Cu(II) com o sideróforo DFO é também elevada ($\beta = 10^{23,98}$) [93]. A solução do complexo Cu(DFO) apresenta uma coloração verde devido à banda de absorção visível $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$ [97].

As soluções dos complexos 1:1 Cu(DFCAF) e Cu(DFO) 7 mM (32,5% DMSO), ambos da cor verde, se deixaram por duas horas em agitação ao ar livre. A Figura 49 mostra o espectro eletrônico de ambos complexos, observando-se o mesmo perfil de bandas.

Figura 49. Espectro eletrônico de Cu(DFCAF) e Cu(DFO) 7 mM em H₂O c/32,5%DMSO

Complexos de Mn

O ion Mn^{2+} (d^5) de spin alto não apresenta estabilização de campo cristalino, sendo as transições d-d fortemente proibidas por spin, daí que os sais desse metal apresentem coloração rosa-pálido. A eficiência da complexação de Mn(II) com o sideróforo DFO é média, $\beta = 10^{6,8} \pm 1$ [98]. A coloração da solução do complexo Mn(DFO) deve-se à banda de absorção visível (d,d; $\lambda_{max} = 636$ nm) [99].

As soluções dos complexos preparados em DMSO 1:1 Mn(DFCAF) e Mn(DFO) 42 mM, ambos transparentes, se deixaram por 24 horas em agitação ao ar livre para garantir a complexação.

A Figura 50 mostra o espectro eletrônico de ambos complexos. Observou-se para ambos o mesmo perfil, com uma banda de absorção $\lambda_{max} = 665$ nm. O deslocamento do máximo de absorção a um comprimento de onda mais longo é devido à presença do solvente, DMSO puro, menos polar do que a água. Devido a essa menor polaridade, o DMSO estabiliza os estados excitados das estruturas polares, o que pode diminuir a energia de transição na absorção e por conseguinte aumentar o comprimento de onda de absorção [100].

Figura 50. Espectro eletrônico de Mn(DFCAF) e Mn(DFO) 42 mM em DMSO

Os espectros observados nas Figuras 48, 49 e 50 mostram o comportamento semelhante de absorção na região do visível ao DFCAF e DFO, também evidenciando a não-alteração do DFO no conjugado cafeína-desferrioxamina.

4.4.4 Atividade antioxidante frente ao sistema ferro/ascorbato

As sondas fluorescentes baseadas em rodamina parecem ser particularmente atrativas devido às suas excelentes propriedades espectroscópicas, fluorescência alta, rendimento quântico e alta estabilidade [101]. Para a determinação de espécies radicalarias se utilizou uma sonda fluorimétrica sensível à oxidação, dihidrorodamina 123 (DHR). A sonda DHR se converte de sua forma não-fluorescente (reduzida) à fluorescente quando é oxidada (a rodamina), de tal maneira que a geração de espécies reativas de oxigênio pode ser seguida como um aumento na fluorescência do

sistema. O ácido ascórbico é usado como agente produtor de radicais reativos quando em presença de ferro livre [55].

Para avaliar a capacidade anti-oxidante dos compostos neste sistema, utilizamos como controle positivo (geração de espécies reativas quando em presença de ascorbato) o complexo Fe(NTA). O efeito que a cafeína, a deferiprona, o DFO e o DFCAF apresentaram na velocidade de oxidação promovida pelo Fe(NTA) é apresentado na Figura 51.

Figura 51. Capacidade antioxidante de diversas substâncias (18 μM) no sistema Fe(NTA)/ascorbato

Observou-se que a cafeína, na concentração utilizada, apresenta moderado efeito antioxidante no 18 μM (concentração muito pequena, facilmente superável com uma xícara de café) sobre a oxidação da DHR promovida pelo sistema Fe/asc. Já as moléculas com grande capacidade quelante de ferro (DFO, DFCAF e deferiprona) apresentam supressão praticamente total dessa oxidação.

Num outro experimento, mantendo-se fixa a concentração de Fe(NTA) a 2 μM , é possível apreciar melhor o efeito dos ligantes sobre a oxidação da DHR (Figura 52).

Figura 52. Capacidade antioxidante da cafeína, deferiprona, DFO e DFCAF no sistema DHR.
 $\text{Fe(NTA)} = 2 \mu\text{M}$

Como se observa na Figura 52, os ligantes mostram atividade antioxidante diretamente proporcional ao aumento de suas concentrações. O DFO e o DFCAF foram os melhores antioxidantes neste ensaio, mostrando novamente comportamentos similares através de seus perfis superpostos.

A deferiprona é um ligante bidentado, normalmente formando complexos com Fe(III) em proporção 3:1 ($\log\beta = 15,086$) [102], ao contrário do DFO que apresenta coordenação 1:1 ($\log\beta = 42,33$). Portanto, a menores concentrações, o DFO (e o DFCAF) apresenta maior atividade antioxidante.

4.4.5 Atividade antioxidante pelo método ORAC modificado

Azo compostos como o AAPH são iniciadores de reações oxidativas, através da formação de radicais livres (Figura 53). Os radicais peroxila agem sobre uma sonda, alterando suas propriedades, que são então monitoradas. Antioxidantes em princípio devem ser capazes de desativar os radicais peroxila e, portanto, retardar a alteração da propriedade de interesse da sonda. No método ORAC original, a sonda é a molécula fluoresceína (que perde fluorescência à medida em que é degradada pela peroxila) [103-104]. Neste ensaio modificou-se a sonda e o radical reage com a molécula não-fluorescente DHR para formar o produto fluorescente (rodamina), o qual pode ser quantificado facilmente através da medição da fluorescência. Propusemos essa alteração porque, nas condições preconizadas pelo método original, não conseguimos detectar a fluorescência no equipamento leitor de microplacas.

Figura 53. Princípio do método ORAC modificado

Mediu-se a intensidade de fluorescência ao longo do tempo em função de diferentes concentrações das substâncias de estudo (antioxidantes), relacionando assim a melhor capacidade antioxidante com a menor fluorescência mostrada. Os resultados são apresentados nas Figuras 54 a 59.

Figura 54. Atividade antioxidante do ácido ascórbico em DMSO

Figura 55. Atividade antioxidante para o BHT em DMSO

Figura 56. Atividade antioxidante para o trolox em DMSO

Figura 57. Atividade antioxidante para a cafeína em DMSO

Figura 58. Atividade antioxidante para o DFO em DMSO

Figura 59. Atividade antioxidante para o DFCAF em DMSO

Das Figuras 55, 57, 58 e 59 podemos afirmar que a concentrações iguais a 100 μ M ou menores, o BHT, cafeína, DFO e DFCAF não apresentam atividade antioxidante neste ensaio, já que mostram intensidades de fluorescência altas, independentemente da concentração em estudo.

A cafeína mostrou ter atividade antioxidante ótima no ensaio ORAC (usando β -ficoeritrina como sonda fluorescente) à concentração de 0,16 M, mas atividade nenhuma a concentrações menores de 0,02 M [105] (200 vezes maior que concentração usada neste ensaio), o que explica seu comportamento passivo em nosso ensaio.

O trolox é um antioxidante que teoricamente atenua o estresse oxidativo por eliminação de ROS [106] e é comumente usado para este tipo de ensaio devido à sua atividade como antioxidante. Seu comportamento é demonstrado na Figura 56, apresentando uma atividade antioxidante mais prolongada proporcionalmente ao aumento de sua concentração.

O ascorbato por sua parte apresenta poder antioxidante a concentrações superiores a 20 μ M [55]. A Figura 54 manifesta este comportamento (concentração de ascorbato 25-100 μ M), mantendo sua atividade antioxidante por mais tempo a concentrações maiores.

4.4.6 Atividade antioxidante por absorbância por DPPH

Um método para a estimativa da eficiência de antioxidantes é baseado na utilização dos radicais livres estáveis difenilpicrilhidrazila (DPPH). O DPPH é estável livre devido à deslocalização de carga ao longo da molécula, de modo que a mesma não dimeriza como ocorre em outros radicais livres. A deslocalização também dá origem a uma cor violeta intensa caracterizada por uma banda de absorção em metanol centrada em 520 nm (Figura 60, 61 [107]).

Figura 60. Estrutura do DPPH

Figura 61. Espectro eletrônico do DPPH (0,07 mM em metanol)

Quando a solução de DPPH se mistura com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio, o DPPH ($Z^\cdot$) é reduzido com a perda de coloração (Reação 19; [107]).

Posteriormente o radical pode reagir com outro radical (dimerização) produzindo reações paralelas (Reação 20 [107]).

Assim, é permitida a redução de duas moléculas de DPPH por duas moléculas de AH, sendo a relação estequiométrica 1:1 [107].

Devido à banda característica de absorção no visível, o DPPH é utilizado como o indicador, de modo que o número de moléculas de DPPH reduzida (sem cor) corresponde estequiometricamente ao número de moléculas do redutor [107]. A capacidade antioxidante está inversamente relacionada com a intensidade da absorbância, devido à formação de espécies reduzidas do DPPH incolor (não radical).

Os valores de absorbância ($\lambda = 520$ nm) de soluções de diferentes concentrações de estudo foram amostrados e correlacionados com as concentrações correspondentes (Figura 62).

Figura 62. Capacidade antioxidante usando DPPH. Soluções em DMSO.

A partir da Figura 62, podemos dizer que, em concentrações iguais a $100 \mu\text{M}$ ou inferiores, a cafeína não apresenta atividade antioxidante neste teste, já que mostra intensidade de absorção alta. Provavelmente o comportamento da cafeína é devido à estrutura xantínica totalmente metilada (só tem caráter básico, $pK_b = 0,6$ [108]) com impossibilidade para doar prótons e, assim, reduzir DPPH.

Ascorbato, BHT, DFO e DFCAF mostram comportamento antioxidante e diminuem a intensidade de absorção do radical DPPH proporcionalmente ao aumento da concentração destas substâncias.

Ascorbato e BHT têm características ácidas, capazes de doar prótons e reduzir DPPH [107].

O DFO é um sideróforo com três hidroxamatos e com uma amina primária terminal apresentando quatro constantes de acidez (pK_a : 8,30, 9,00, 9,86 e 10,84) [109] e por estudos anteriores DFCAF atuaria analogamente ao DFO, por conseguinte, seriam capazes de doar prótons e reduzir o radical DPPH. No caso do DFCAF, a quarta constante de acidez, correspondente à amina terminal, não existe, posto que é a partir dessa amina que é feita a conjugação à cafeína.

4.5 ESTUDO DA PERMEABILIDADE DE DFCAF EM CÉLULAS HeLa

4.5.1 Microscopia de fluorescência

Através do monitoramento de moléculas fluorescentes sensíveis aos níveis de ferro intracelular, a microscopia de fluorescência nos permite acompanhar o ingresso nas células de possíveis quelantes (DFO, DFCAF). No caso, utiliza-se a versão esterificada da calceína denominada acetoxicalceína (calceína-AM), que é permeável às células e, uma vez internalizada, apresenta o mesmo fenômeno de supressão de fluorescência já descritos, quando em presença de ferro.

A calceína-AM é introduzida nas células por meio da incubação. Uma vez no interior, a calceína-AM (molécula não fluorescente) é hidrolisada por esterases endógenas e torna-se fluorescente na região do verde, sendo ainda retida no citoplasma de células vivas por algum tempo [53].

As células plaqueadas de acordo com o procedimento experimental já descrito foram levadas ao microscópio de fluorescência, e suas imagens foram registradas (Figura 63).

Figura 63. Microscopia de fluorescência das células HeLa. a) células tratadas apenas com cal-AM, b) células tratadas com cal-AM e sobrecarregadas com Fe, c) células tratadas com cal-AM, sobrecarga de Fe e com DFO, d) células tratadas com cal-AM, sobrecarga de Fe e com DFCAF

Dada a dificuldade de visualizar as diferenças de fluorescência na Figura 63, foram estudadas as densidades de pixels de cada célula fluorescente em cada imagem (a - d), calculando-se a frequência das células com a mesma densidade luminosa. Tais distribuições têm formato gaussiano (Figuras 64-67), sendo que a partir das mesmas obtemos o parâmetro x_c , que corresponde à densidade luminosa da maior população das células.

Figura 64. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas apenas com calceína-AM (Branco 1)

Figura 65. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM e sobrecarregadas com Fe (Branco 2)

Figura 66. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM, sobrecarregadas com Fe e tratadas com DFO

Figura 67. Distribuição de densidade luminosa para células tratadas com calceína-AM, sobrecarregadas com Fe e com tratadas DFCAF

Os valores x_c de cada figura são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. x_c para cada tratamento (pixel/área)

<i>Branco 1</i>	<i>Branco 2</i>	<i>DFO</i>	<i>DFCAF</i>
24,2 ± 0,25	21,0 ± 0,18	21,5 ± 0,25	22,3 ± 0,19

Da Tabela 16 observamos que após a adição de Fe nas células (branco 2), o x_c diminui devido ao ingresso do metal ao citoplasma ligando-se com a calceína e portanto suprimindo a fluorescência. A adição do DFO mantém praticamente inalterado o valor de x_c em relação ao branco 2, o que é esperado, já que o DFO não é permeável às células. A penetração direta da DFO é quantitativamente insignificante comparado com o ingresso através de pinocitose [110], mas mesmo este processo é muito vagaroso (mais de 24 horas) [111], provavelmente devido à baixa solubilidade lipídica do DFO com um coeficiente de partição com respeito à da água igual a 0,01 [110]. Isto poderia explicar a pouca recuperação da fluorescência obtida.

A adição do DFCAF mostra um aumento de x_c com respeito ao DFO, o que indicaria um possível ingresso do DFCAF ao citoplasma, seguido de competição com a calceína pelo ferro disponível, e de-supressão da sonda fluorescente.

Pensamos que o ingresso do DFCAF à célula poderia ser favorecido pela presença da cafeína no acoplado. Estudos não mostraram o ingresso da cafeína no cérebro por difusão simples (a cafeína tem uma boa solubilidade lipídica com um coeficiente de partição lipídica igual a 0,85) e através de um transportador saturado de baixa afinidade ($K_M = 9,8$ mM), provavelmente devido à semelhança estrutural da cafeína com adenina. A molécula da cafeína pode atravessar as células endoteliais dos capilares cerebrais que constituem a barreira hematoencefálica e acreditamos que essa propriedade, principalmente da difusão simples, é mantida no DFCAF, ao menos nos tratamentos com HeLa [47-48].

4.5.2 Espectroscopia de Absorção Atômica

Como complementação ao estudo anterior, buscamos desta vez incubar as células com os quelantes já ligados ao ferro. Para efeitos de redistribuição de ferro [112], é importante que tanto o quelante seja permeável às células, como os complexos de ferro também o sejam. Neste caso, estudamos o ingresso dos complexos Fe(DFO), Fe(DFCAF) e Fe(fitado), através da quantificação do ferro nas amostras celulares por absorção atômica, avaliando assim a permeabilidade do complexo. O complexo Fe(fitado) foi usado aqui como um controle positivo de complexo permeável à HeLa [62]. Na Figura 68 se apresentam as concentrações do metal para cada complexo, determinadas na amostra celular.

Figura 68. Concentração de Fe nas células HeLa tratadas com diferentes complexos de ferro

No caso do branco e do complexo Fe(DFO), os níveis de ferro são os normais para a célula. Assim como o DFO isoladamente, vê-se que o complexo Fe(DFO) não penetra em células animais. A causa da não permeabilidade do DFO em células animais é esperada devido à natureza do DFO.

O DFO é um sideróforo produzido por bactérias e fungos que transporta e internaliza o Fe nesses organismos. Tal internalização depende de receptores específicos, para moléculas individuais ou parecidas quimicamente, na superfície das células. Tais receptores não se encontram em células animais [113].

Já o ligante fitato é permeável à célula [62], e observamos que como complexo de ferro essa permeabilidade é mantida.

Observamos o ingresso do complexo Fe(DFCAF) às células, uma vez que a amostra apresenta quantidade do Fe significativamente superiores às do branco, e comparáveis às do complexo Fe(fitato). Acreditamos que isso seja devido à natureza outorgada pela cafeína ao ligante o DFCAF, o que aumentaria sua permeabilidade à célula HeLa, principalmente devido a sua solubilidade lipídica e consequente aumento de permeabilidade e difusão passiva, como acontece com as células endoteliais na BBB [47].

5. CONCLUSÕES

A síntese do ligante foi bem sucedida, sendo que as técnicas usadas na caracterização demonstram a presença das características do conjugado desferrioxamina-caféina (DFCAF). O DFCAF foi purificado com êxito através de técnicas cromatográficas.

O DFCAF apresentou comportamento químico idêntico ao do DFO na formação de complexos metálicos. Este comportamento se manifestou na avaliação da capacidade quelante com Fe(III), Cu(II) e Mn(II), apresentando as mesmas bandas de absorbância que o DFO. Também a estequiometria de formação de complexos com ferro (1:1) foi idêntica. Estes resultados ratificam que a atividade desferrioxamina é mantida na molécula do conjugado e que não foi alterada no acoplamento.

O DFCAF apresentou também um comportamento antioxidante parecido ao do DFO nos testes de avaliação da atividade antioxidante. Este comportamento se manifestou na avaliação antioxidante no sistema ferro/ascorbato na qual se comprovou que a capacidade antioxidante (característica do DFO) é mantida; na avaliação antioxidante pelo método ORAC modificado, onde o DFCAF não apresentou atividade; e na avaliação antioxidante por absorbância por DPPH, onde o DFCAF foi capaz de doar prótons e reduzir o radical DPPH. A determinação da constante de ligação efetiva do DFCAF indica que é um bom sequestrador de ferro em condições fisiologicamente relevantes. Tudo isso corrobora a presença de atividade desferrioxamina estável no conjugado.

Os estudos de permeação mostram o ingresso do ligante na forma isolada ou complexada com ferro. A microscopia de fluorescência permitiu a identificação do aumento da população de células com boa recuperação de fluorescência, após a adição de DFCAF em células sobrecarregadas de ferro. Já em células ferro-normais, a espectroscopia de absorção atômica mostra que Fe(DFCAF), e não o Fe(DFO), é capaz de realizar a carga do metal. Portanto, DFCAF é um bom

quelante para a redistribuição de ferro no organismo. Acreditamos que a entrada do DFCAF nas células seja devido à presença da cafeína, molécula com solubilidade lipídica capaz de atravessar as células por difusão passiva, e sendo a diferença crucial com o ligante DFO.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Lindsay W. L. Chemical Equilibria in Soils. John Wiley & Sons (1979), 449.
- [2] Marco T. Núñez, Pamela Urrutia, Natalia Mena, Pabla Aguirre, Victoria Tapia, Julio Salazar. Iron Toxicity in Neurodegeneration. *Biometals* 25 (2012), 761-776.
- [3] G. Papanikolaou, K. Pantopoulos. Iron Metabolism and Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202 (2005), 199-211.
- [4] Andrews, N. C. Disorders of Iron Metabolism. *Disorders of Iron Metabolism* 341 (1999), 1986-1996.
- [5] Ponka, P. Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolismo and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood* 89 (1997), 1-25.
- [6] Espósito, B.P. Toxicidade de Metais Essenciais: Os casos do Ferro e do Manganês. Tese de Livre-Docência, Instituto De Química, Universidade de São Paulo (2011).
- [7] Paolo Zatta, Denise Drago, Silvia Bolognin and Stefano L. Sensi. Alzheimer's Disease, Metal Ions and Metal Homeostatic Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 7 (2009), 346–355.
- [8] Alexis Tapia-Saavedra. Proposing Biomarkers to evaluate the Alterations in the Brain Iron Homeostasis and their relation whit the Physiopathology of Alzheimer's Disease. *Rev Chilena Neuro-Psiquiatria* 45 (2007), 29-41.
- [9] Graf E, Mahoney Jr, Bryant Rg, Eaton Jw. Iron-Catalyzed Hydroxyl Radical Formation. Stringent Requirement for Free Iron Coordination Site. *J. Biol Chem* 259 (1984), 3620-3624.
- [10] Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W, Cabantchik I. Fluorescence Analysis of the Labile Iron Pool of Mammalian Cells. *Anal Biochem* (1997), 31-40.
- [11] Kruszewski M. Labile Iron Pool: The Main Determinant of Cellular Response to Oxidative Stress. *Mutat Res* 531 (2003), 81-92.

- [12] Ryter, S. W., Tyrrel, R.M. The Heme Synthesis and Degradation Pathways: Role in Oxidant Sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro-And Antioxidant Properties. *Free Radical Biol. Med.* 28 (2000), 289-309.
- [13] Huang, X. Iron Overload and its Association with Cancer Risk in Humans: Evidence for Iron as a Carcinogenic Metal. *Mutat. Res.* 533 (2003), 153-171.
- [14] Zecca L, Youdim Mb, Riederer P, Connor Jr, Crichton Rr. Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders. *Nat Rev Neurosci* 5 (2004), 863-873.
- [15] Glickstein H, El Rb, Link G, Breuer W, Konijn Am, Herskho C, Nick H, Cabantchik Zi. Action of Chelators in Iron-Loaded Cardiac Cells: Accessibility to Intracellular Labile Iron and Functional Consequences. *Blood* 108 (2006), 3195-3203.
- [16] Ponka, P. Hereditary Causes of Disturbed Iron Homeostasis in the Central Nervous System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012 (2004), 267-281.
- [17] Silvia Bolognin, Denise Drago Luigi Messori And Paolo Zatta. Chelation Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Medical Research Reviews* 29 (2009), 547-570.
- [18] R. J. Ward, D. T. Dexter and R. R. Crichton. Chelating Agents for Neurodegenerative Diseases. *Current Medicinal Chemistry* 19 (2012), 2760-2772.
- [19] Liliana Batista-Nascimento, Catarina Pimentel, Regina Andrade Menezes and Claudina Rodrigues-Pousada. Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 212 (2012), 1-8.
- [20] D. B. Kell, “Iron Behaving Badly: Inappropriate Iron Chelation as a Major Contributor to the Aetiology of Vascular and other Progressive Inflammatory and Degenerative Diseases”. *Bmc Medical Genomics* 2 (2009), article 2.
- [21] G. A. Salvador. “Iron in Neuronal Function and Dysfunction”. *Biofactors* 36 (2010), 103-110.
- [22] Liu, G. Et Al. Metal Exposure and Alzheimer’s Pathogenesis. *J. Struct. Biol.* 155 (2006), 45–51.

- [23] Zatta, P. Et Al. The Role of Metals in Neurodegenerative Processes: Aluminum, Manganese, and Zinc. *Brain Res. Bull.* 62 (2003), 15–28.
- [24] Scott Ayton, Peng Lei, Ashley I. Bush. Metallostasis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine* 62 (2013), 76-89.
- [25] Amit S Pithadia and Mi Hee Lim. Metal-Associated Amyloid-B Species in Alzheimer's Disease. *Current Opinion in Chemical Biology* 16 (2012), 67-73.
- [26] Jacob-Roetne R, Jacobsen H. Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew Chem Int Ed* 48 (2009), 3030-3059.
- [27] Smith M, Harris P, Sayre L, Perry G. Iron Accumulation in Alzheimer Disease is a Source of Redox-Generated Free Radicals. *Proc Natl Acad Sci Usa* 94 (1997), 9866–9868.
- [28] Smith Ma, Taneda S, Richey Pl, Miyata S, Yan Sd, Stern D. Advanced Maillard Reaction end Products are associated with Alzheimer Disease Pathology. *Proc Natl Acad Sci Usa* 91 (1994), 5710-5714.
- [29] Thompson K J. Shoham S. Connor Jr. Iron and Neurodegenerative Disorders. *Brain Res Bull* 55 (2001), 155-64.
- [30] Gu, Lie; Gonzalez, Frank J.; Kalow, Werner; Tang, Bing K Biotransformation of Caffeine, Paraxanthine, Theobromine and Theophylline By Cdna-Expressed Human Cyp1a2 And Cyp2e1. *Pharmacogenetics And Genomics.* 2 (1992), 73-77.
- [31] Abbasoğlu, R., Küçük, M., Kolaylı, S., & Ocak M. Theoretical Investigation of Mg^{2+} Binding to Caffeine And Theophylline. In *Proceedings of the 1st Int. Congress on The Chemistry of Natural Products, Trabzon, Türkiye* (2002).
- [32] Sevgi Kolaylı, Miraç Ocak, Murat Küçük, Rıza Abbasoğlu. Does Caffeine Bind To Metal Ions? *Food Chemistry* 84 (2004), 383-388.
- [33] Chuanhai Cao, John R. Cirrito, Xiaoyang Lin, Lilly Wang, Deborah K Verges, Alexander Dickson, Malgorzata Mamcarz, Chi Zhang, Takashi Mori, Gary W. Arendash, David M. Holtzman

- And Huntington Potter. Caffeine Suppresses Amyloid-B Levels in Plasma and Brain Of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *J. Alzheimer's Disease* 17 (2009), 681-697.
- [34] Bateman R, Munsell L, Morris J, Swarm R, Yarasheski K, Holtzman D. Human Amyloid-Beta Synthesis and Clearance Rates as Measured in Cerebrospinal Fluid in Vivo. *Nat Med* 12 (2006), 856-861.
- [35] Eckelinen M, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife Coffee And Tea Drinking And The Risk Of Late-Life Dementia: A Population-Based Cohort Study. *J. Alzheimer's Disease* 16 (2008), 85-91.
- [36] Maia L, De Mendonça A A. Does Caffeine Intake Protect From Alzheimer's Disease? *Eur J Neurol* 9 (2002), 377-382.
- [37] Rosso A, Lippa C, Mossey J. Caffeine: Neuroprotective Functions in Cognition and Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 23 (2008), 417-422.
- [38] Arendash G, Garcia M, Costa D, Cracchiolo J, Wefes I, Potter H. Environmental Enrichment Improves Cognition In Aged Alzheimer's Transgenic Mice Despite Stable Beta-Amyloid Deposition. *Neuroreport* 15 (2004), 1751-1754.
- [39] Arendash G, Lewis J, Leighty R, McGowan E, Cracchiolo J, Hutton M, Garcia M. Multi-Metric Behavioral Comparison of APPsw and P301L Models For Alzheimer's Disease: Linkage Of Poorer Cognitive Performance To Tau Pathology In Forebrain. *Brain Res* 1012 (2004), 29-41.
- [40] Arendash G, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson E, Zacharia L, Cracchiolo J, Shippy D, Tan J. Caffeine Protects Alzheimer's Mice Against Cognitive Impairment And Reduces Brain Beta-Amyloid Production. *Neuroscience* 142 (2006), 941-952.
- [41] Gary W. Arendash, Takashi Mori, Chuanhai Cao, Malgorzata Mamcarz, Melissa Runfeldt, Alexander Dickson, Kavon Rezai-Zadeh, Jun Tan, Bruce A. Citron, Xiaoyang Lin, Valentina Echeverria and Huntington Potter. Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid-B Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice. *J. Alzheimer's Disease* 17 (2009), 661-680.

- [42] Ribero Ja, Sebastiao Am. Modulation and Metamodulation of Synapses by Adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 199 (2010), 161-169.
- [43] Sueli Marques, Vânia L. Batalha, Luísa Vaqueiro Lopes And Tiago Fleming Outeiro. Modulating Alzheimer's Disease Through Caffeine: A Putative Link To Epigenetics. *J. Alzheimer's Disease* 24 (2011), 161-171.
- [44] Kenghoe Lok, Hong Zhao, Hanlin Shen, Zejian Wang, Xiang Gao, Wenjuan Zhao And Min Yin. Characterization of The App/Ps1 Mouse Model of Alzheimer's Disease In Senescence Accelerated Background. *Neuroscience Letters* 557 (2013), 84-89.
- [45] Kun Han, Ning Jia, Ji Li, Li Yang And Lian-Qiu Min. Chronic Caffeine Treatment Reverses Memory Impairment And The Expression Of Brain Bdnf And Trkb In The Ps1/App Double Transgenic Mouse Model Of Alzheimer's Disease. *Molecular Medicine Reports* 8 (2013), 737-740.
- [46] Kemppainen S, Rantamäki T, Jerónimo-Santos A, Et Al. Impaired Trkb Receptor Signaling Contributes To Memory Impairment In App/Ps1 Mice. *Neurobiol Aging* 33 (2011), E23-E39.
- [47] Jain Kk. Nanobiotechnology-Based Strategies For Crossing The Blood–Brain Barrier. *Nanomedicine* 7 (2012), 1225-1233.
- [48] Jana Sawynok And Tony L. Yaksh. Caffeine As An Analgesic Adjuvant: A Review Of Pharmacology And Mechanisms Of Action. *Pharmacological Reviews* 45 (1993), 44-85.
- [49] David M. Hillis, David E. Sadava, H. Craig Heller, Mary V. Price. *Principles of life* (2012), 61-82.
- [50] Joe Liu, Daniel Obando, Liam G. Shipanski, Ludwig K. Groebler, Paul K. Witting, Danuta S. Kalinowski, Des R. Richardson and Rachel Codd. Conjugates of Desferrioxamine B (Dfbo) With Derivatives of Adamantine or with Orally Available Chelators as Potential Agents for Treating Iron Overload. *Journal Med. Chem* 53 (2010), 1370-1382.
- [51] Andrew Williams, Ibrahim T. Ibrahim. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem. Rev.* 81 (1981), 589–636.

- [52] Larissa, C.M.R. Estudo da Síntese De Peptídeos Em Fase Sólida: Abordagem Clássica E Uso De Microondas, 2012, Dissertação De Mestrado, Instituto De Química Da Universidade De São Paulo.
- [53] Mayara Marinovic Baccan, Orlando Chiarelli-Neto, Regina Mara Silva Pereira, Breno Pannia Espósito. Quercetin as a Shuttle for Labile Iron. J. Inorganic Biochemistry 107 (2012), 34-39.
- [54] Hongyan Su, Jianwei Li, Hai Linb And Huakuan Lin. An Efficient Novel Acetate Anion Receptor Based On Isatin. J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010), 541-545.
- [55] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Herskho, C. E Cabantchik, Z. I. Labile Plasma Iron In Iron Overload: Redox Activity And Susceptibility To Chelation. Blood 102 (2003), 2670-2677.
- [56] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Slotki, I. E Cabantchik, Z. I. Labile Iron In Parenteral Iron Formulations And Its Potential For Generating Plasma Nontransferrin-Bound Iron In Dialysis Patients. Eur. J. Clin. Invest. 32 (2002), 42-49.
- [57] Byungrok Min, Anna M. Mcclung, and Ming-Hsuan Chen. Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans Of Different Color. J. Food Science 76 (2011), 117-126.
- [58] Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan Ja, Prior Rl. High-Throughput Assay Of Oxygen Radical Absorbance Capacity (Orac) Using A Multichannel Liquid Handling System Coupled With A Microplate Fluorescence Reader In 96-Well Format. J Agric Food Chem 50 (2002), 4437–4444.
- [59] Gyamfi, M. A., Yonamine, M., & Aniya, Y. Free Radical Scavenging Action Of Medicinal Herbs From Ghana *Thonningia Sanguinea* On Experimentally Induced Liver Injuries. General Pharmacology, 32 (1999), 661-667.
- [60] Iris Hinneburg , H.J. Damien Dorman, Raimo Hiltunen. Antioxidant Activities Of Extracts From Selected Culinary Herbs And Spices. Food Chemistry 97 (2006) 122–129.

- [61] Yang-Sung Sohn, William Breuer, Arnold Munnich, And Z. Ioav Cabantchik. Redistribution Of Accumulated Cell Iron: A Modality Of Chelation With Therapeutic Implications. *J. Blood* 111 (2008), 1690-1699.
- [62] Schleh, F. A. ; Chiarelli Neto, O. ; Fontes, M. N. ; Najjar, R ; Espósito, Breno Pannia . Phytate Decreases Oxidative Damage Caused By Labile Forms Of Iron In Solution, Blood Plasma And In Hela Cells. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 2014 (No Prelo).
- [63] Isaacson Ei: Cfentral Nervous System Stimulants In Book: *Textbook Of Organic Medicinal And Pharmaceutical Chemistry*, 10th Edition. (1998), 464-65.
- [64] Ledwidge Mt, Corrigan Oi: Effects Of Surface Active Characteristics And Solid State Forms On The Ph Solubility Profiles Of Drug–Salt Systems. *Int. J Pharm* 174 (1998) 187-200.
- [65] [Handbook] Crc Handbook of Chemistry And Physics 85th Edition. (2005)
- [66] Delmar, M. C. Sequenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. *Quim. Nova* 3 (2008), 669-675.
- [67] Medhat Ibrahim, Eckhard Koglin. Vibrational Spectroscopic Study Of Acetate Group. *Acta Chim. Slov.* 51 (2004), 453-460.
- [68] Chester M. Mikulski, Matthew K. Kurlan, Monica Bayne, Michele Gaul and Nicholas M. Karayannis. Xanthine Complexes with 3d Metal Perchlorates. *Inorganic Chim. Acta*, 123 (1986) 27-33.
- [69] Ana L. Costa Mattos, Vera R. Leopoldo Constantino, Ricardo A., Alves De Couto, Delia M. Luna Pinto, Telma M. Kaneko, Breno Pannia Espósito. Desferrioxamine-Cadmium As A “Trojan Horse” For The Delivery Of Cd To Bacteria And Fungi. *J. Trace Elements in Medicine and Biology* 27 (2013) 103-108.
- [70] Juan M. Salas, Miguel Quirós, M. Angustias Romero, M. Purificación Sánchez, Miguel A. Salas And Rosario Vilaplana. Metal Complexes Of Theophylline-7-Acetic Acid. Crystal Structure Of A Nickel (Ii) Compound Containing Non-Coordinated Theophylline-7-Acetate Ion. *Polyhedron* 14 (1995), 611-616.

- [71] Edwards Hg, Munshi T, Anstis M. Raman Spectroscopic Characterisations And Analytical Discrimination Between Caffeine And Demethylated Analogues Of Pharmaceutical Relevance. *Spectrochimica Acta A* 61 (2005), 1453-1459.
- [72] S. Gunasekarana, G. Sankarib, S. Ponnusamy. Vibrational Spectral Investigation on Xanthine and its Derivatives—Theophylline, Caffeine and Theobromine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61 (2005), 117–127.
- [73] O. Cozar, N. Leopold, C. Jelic, V. Chiş, L. David, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotişel. Ir, Raman And Surface-Enhanced Raman Study Of Desferrioxamine B And Its Fe(III) Complex, Ferrioxamine B. *Journal Of Molecular Structure* 788 (2006) 1-6.
- [74] Surface-enhanced Raman scattering of o-mercaptobenzoic acid in silver sol. S.B. Lee, K. Kim, and M.S. Kim, *J. Raman Spectrosc.* 22 (1991), 811-817.
- [75] Borkovec, M. Origin of 1-pK and 2pK models of ionizable water-solid interfaces. *Langmuir* 13 (1997), 2608-2613.
- [76] Gershevitz, O.; Sukenik. In situ FTIR-ATR analysis and titration of carboxylic acid-terminated SAMs. *J. American Chemical Society* 126 (2003), 482-483.
- [77] Michota, A.; Bukowska. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J. Journal Of Raman Spectroscopy* 34 (2003), 21-25.
- [78] Lecomte, S.; Ricoux, R.; Mahy, J. P. Korri-Youssoufi, H. Microperoxidase 8 adsorbed on a roughened silver electrode as a monomeric high-spin penta-coordinated species: characterization by SERR spectroscopy and electrochemistry. *J Biol Inorg Chem* 9 (2004), 850-858.
- [79] Asha Raj, K. Raju, Hema Tresa Varghese, Carlos M. Granadeiro, Helena I. S. Nogueira And C. Yohannan Panicker. Ir, Raman And Sers Spectra Of 2-(Methoxycarbonylmethylsulfanyl)-3,5-Dinitrobenzene Carboxylic Acid. *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2003), 549-559.
- [80] Fei Yan, Yam K. Shrestha And Charina L. Spurgeon. Determination Of Ferric Ions Using Surface-Enhanced Raman Scattering Based On Desferrioxamine-Functionalized Silver Nanoparticules. *Chem. Commun* 49 (2013), 7962-7964.

- [81] Tadelech Atomssa, A.V. Gholap. Characterization Of Caffeine And Determination Of Caffeine In Tea Leaves Using Uv-Visible Spectrometer. *African Journal Of Pure And Applied Chemistry* 5 (2011), 1-8.
- [82] Amane Mohamed, Hamdani Hicham. Synthesis And Characterization Of Caffeine Complexes $[M(Caf)_4 \cdot 2X]$ $M = Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ $X = SCN^-, CN^-$; Caf : Caffeine. *Research Journal Of Chemical Sciences* 4(2014), 42-48.
- [83] Erdal Dinc, Feyyaz Onur. Application Of A New Spectrophotometric Method For The Analysis Of A Ternary Mixture Containing Metamizol, Paracetamol And Caffeine In Tablets. *Analytica Chimica Acta* 359 (1998) 93-106.
- [84] Borgias B, Hugi AD, Raymond KN: Isomerization and solution structures of desferrioxamine-B complexes of Al^{3+} and Ga^{3+} . *Inorg Chem* 28 (1989), 3538-3545.
- [85] Hugo E., Gottlieb, Vadim Kotlyar, Abraham Nudelman. Nmr Chemical Shifts Of Common Laboratory Solvents As Trace Impurities. *J. Org. Chem* 62 (1997), 7512-7515.
- [86] Edit Forizs, Agota Debreczeni, Adrian Patrut, Attila-Zsolt Kun, Ionut Bogdan Cozar, Leontin Davidb And Ioan Silaghi-Dumitrescu. Synthesis, Structure And Dft Calculations On Complexes Of Palladium(II) With Theophylline. *Rev. Roum. Chim.* 55 (2012), 697-704.
- [87] W. Breuer, S. Epsztejn, Z.I. Cabantchik. Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 209–215.
- [88] G. Zanninelli, H. Glickstein, W. Breuer, P. Milgram, P. Brissot, R. C. Hider, A. M. Konijn, J. Libman, A. Shanzer, And Z. Ioav Cabantchik. Chelation And Mobilization Of Cellular Iron By Different Classes Of Chelators. *Molecular Pharmacology*, 51 (1997), 842–852.
- [89] W. Breuer, S. Epsztejn, P. Millgram, Z.I. Cabantchik. Transport of iron and other related metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am. J. Physiol.* 268 (1995), 1354-1361.
- [90] Sevgi Kolayli, Miraç Ocak, Murat Küçük, Rıza Abbasoğlu. Does Caffeine Bind To Metal Ions? *Food Chemistry*, 84 (2004), 383-388.

- [91] S.D. Domagal-Goldmana, K.W. Paul, D.L. Sparks, J.D. Kubicki. Quantum Chemical Study Of The Fe(III)-Desferrioxamine B Siderophore Complex—Electronic Structure, Vibrational Frequencies, And Equilibrium Fe-Isotope Fractionation. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 73 (2009), 1–12.
- [92] Leong J. And Raymond N. Coordination Isomers Of Biological Iron Transport Compounds. 4. Geometrical Isomers Of Chromic Desferriferrioxamine-B. *J. Am. Chem. Soc.* 97(1975), 293–296.
- [93] Dhungana S., White P. S. And Crumbliss A. L. Crystal Structure Of Ferrioxamine B: A Comparative Analysis And Implications For Molecular Recognition. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001), 810–818.
- [94] Joseph S. Renny, Laura L. Tomasevich, Evan H. Tallmadge and David B. Collum. Method Of Continuous Variations: Applications Of Job Plots To The Study Of Molecular Associations In Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013), 2-18.
- [95] Bruce Monzyk And Alvin L. Crumbliss. Kinetics And Mechanism Of The Stepwise Dissociation Of Iron(III) From Ferrioxamine B In Aqueous Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), 4921-4929.
- [96] Etelka Farkas, Hajnalka Csókaa, Giovanni Micera, Alessandro Dessi. Copper(II), Nickel(II), Zinc(II), And Molybdenum(VI) Complexes Of Desferrioxamine B In Aqueous Solution. *J. Inorganic Biochemistry* 65 (1997), 281–286.
- [97] N. Hafez, F. I. Said, M. B. Hafez. Determination Of Cobalt, Nickel And Copper In Steel And In Radioactive Wastes Using Desferrioxamine “B”. *Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry* 198 (1995), 317-322.
- [98] O. Duckworth and G. Sposito. Formation Of Manganese-Desferrioxamine B Complexes By Dissolution Of Manganese Oxides. *American Geophysical Union*, 7 (2005), B53C.
- [99] Faulkner Km, Stevens Rd, Fridovich I. Characterization Of Mn(III) Complexes Of Linear And Cyclic Desferrioxamines As Mimics Of Superoxide Dismutase Activity. *Arch Biochem Biophys.* 310 (1994), 341–346.

- [100] Doub, L., Vanderbilt, J.M. The ultraviolet absorption spectra of simple unsaturated compounds. I. Mono- and p-disubstituted benzene derivatives. J. Am. Chem. Soc. 69 (1947),2714-2723.
- [101] Chunhua Ma, Liping Lin, Yanyan Du, Liang-Bi Chen, Feng Luoc And Xi Chen. Fluorescence Quenching Determination Of Iron(III) Using Rhodamine 6g Hydrazide Derivative. Anal. Methods 5 (2013), 1843-1847.
- [102] Antonino Puglisi, John Spencer, Valentina Oliveri, Graziella Vecchio, Xiaole Kong, James Clarked And John Miltond. Synthesis, Physicochemical Properties And Antioxidant Activity Of Deferiprone-Cyclodextrin Conjugates And Their Iron(III) Complexes. Dalton Trans 41 (2012), 2877–2883.
- [103] Ronald L. Prior, Xianli Wu and Karen Schaich. Standardized Methods For The Determination Of Antioxidant Capacity And Phenolics In Foods And Dietary Supplements. J. Agric. Food Chem. 53 (2005), 4290–4302.
- [104] Seema Betigeri, Ajit Thakur and Krishnaswamy Raghavan. Use Of 2,2-Azobis(2-Amidinopropane) Dihydrochloride As A Reagent Tool For Evaluation Of Oxidative Stability Of Drugs. Pharmaceutical Research 22 (2005), 310-317.
- [105] Chul Lee. Antioxidant Ability Of Caffeine And Its Metabolites Based On The Study Of Oxygen Radical Absorbing Capacity And Inhibition Of Ldl Peroxidation. Clinica Chimica Acta 295 (2000) 141–154.
- [106] Paritosh P. Wattamwar, Yiqun Mo, Rong Wan, Roshan Palli, Qunwei Zhang, And Thomas D. Dziubla. Antioxidant Activity Of Degradable Polymer Poly(Trolox Ester) To Suppress Oxidative Stress Injury In The Cells. Adv. Funct. Mater 20 (2010),147–154.
- [107] Molyneux, P.The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazayl (Dpph) For Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin J. Sci. Technol 26 (2004), 211-219.
- [108] H. J. Roth, K. Eger, R. Troschutz. Pharmaceutical Chemistry, Volume 2: Drug Analysis (1991).

- [109] Ana Valéria Colnaghi Simionato, Marcelo Delmar Cantú, Emanuel Carrilho. Characterization Of Metal-Deferoxamine Complexes By Continuous Variation Method: A New Approach Using Capillary Zone Electrophoresis. *Microchemical Journal* 82 (2006), 214–219.
- [110] John B. Lloyd, Hazel Cable And Catherine Rice-Evans. Evidence That Desferrioxamine Cannot Enter Cells by Passive Diffusion. *Biochemical Pharmacology* . 41 (1991), 1361-1363.
- [111] Thierry Simonart, Johan R. Boelaert, Roger Mosselmans, Graciela Andrei, Jean-Christophe Noel, Erik De Clercq And Robert Snoeck. Antiproliferative And Apoptotic Effects Of Iron Chelators On Human Cervical Carcinoma Cells. *Gynecologic Oncology* 85 (2002), 95–102.
- [112] Yang-Sung Sohn, William Breuer, Arnold Munnich, And Z. Ioav Cabantchik. Redistribution Of Accumulated Cell Iron: A Modality Of Chelation With Therapeutic Implications. *Blood*, 111 (2008), 1690-1699.
- [113] Ana Luiza Costa Mattos, Vera Regina Leopoldo Constantino, Ricardo Alexandre Alves De Couto, Delia Manuela Luna Pinto, Telma Mary Kaneko, Breno Pannia Espósito. Desferrioxamine–Cadmium As A ‘Trojan Horse’ For The Delivery Of Cd To Bacteria And Fungi. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology* 27 (2013) 103–108.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Elizabeth Carmen Pastrana Alta

Local e data de nascimento: Lima (Peru), 20/09/1986

2. EDUCAÇÃO

Colegio Mixto Peruano-Suizo, Lima (2002)

Bachiller en Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima (2011)

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Universidade de São Paulo, Instituto de Química (2014)

4. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Seminário ACS on Campus (IQUSP, 2012)

II Workshop Internacional de Eletroforese Capilar e Tecnologia de Microchip (FCFUSP, 2012)

5. PUBLICAÇÕES

II Congresso do Instituto de Química (Guarujá, SP). 2012. Pôster: “Estudo de derivados da cafeína sobre o estresse oxidativo provocado por sobrecarga de ferro: implicações para a doença de Alzheimer”

1st International Conference on Environmental Bioinorganic and Toxicology Research (UNIFESP, 2012)