

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

GABRIEL SOUTO DA SILVA

**Prospecção de sideróforos do tipo hidroxamato e quinona
para terapia de sobrecarga de ferro**

Versão corrigida

São Paulo
Data de depósito na SPG
26/02/2019

GABRIEL SOUTO DA SILVA

**Prospecção de sideróforos do tipo hidroxamato e quinona
para terapia de sobrecarga de ferro**

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

Orientador: Breno Pannia Espósito

SÃO PAULO

2019

“Nos campos da observação, a probabilidade favorece apenas a mente preparada”

Louis Pasteur

Agradecimentos

À minha mãe, Osmarina, por ser um exemplo de perseverança frente a todas as dificuldades.

À minha irmã, Carla, pelo apoio incondicional.

Ao meu amigo de infância, Rafael, *In Memoriam*, que sempre estava no meu lado como parceiro de aventuras.

Ao Prof. Dr. Breno Pannia Espósito pela orientação, paciência e dedicação que sempre me motiva.

Aos colegas Jéssica, Hector, Rodrigo, Jesus, Luca, Lucas, Aline e Alejandro do Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos – LAQBAM, pelas conversas, ajudas e sugestões.

À Universidade de São Paulo, por oferecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Silva, G. S. **Prospecção de sideróforos do tipo hidroxamato e quinona para terapia de sobrecarga de ferro.** 2019 (60 p.). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A sobrecarga de ferro é uma condição prejudicial para os pacientes, que apresentam uma diminuição significativa na qualidade de vida. Os fármacos quelantes são moléculas que têm capacidade de uso clínico para atuar como atenuadores da sobrecarga de metais. Neste trabalho apresentamos uma análise de sideróforos do tipo hidroxamato e quinona, com o objetivo de ampliar a gama de terapia de sobrecarga de ferro. Para cada composto foi realizado um ensaio competitivo com a sonda calceína para verificar a capacidade de ligação do ferro, e um ensaio antioxidante baseado na supressão da oxidação dependente de ferro da dihidrorrodamina (DHR) sob ascorbato. Foi observado que o hidroxamato cíclico piridoxatina apresentou capacidade de sequestrar ferro de substratos de alta afinidade, tanto em meio tamponado quanto em meio intracelular. Em ambas as situações também se mostrou um antioxidante eficiente. Entretanto, parece ser o mais tóxico do grupo dos hidroxamatos (que ainda continha o hidroxamato linear desferricoprogênio e o aromático desferristercromo). Outros compostos naturais também foram estudados como possíveis candidatos a fármacos para sobrecarga de ferro. Complexos de ferro foram caracterizados por espectrofotometria para avaliar a estequiometria possível, considerando os sítios de ligação para cada composto. Ensaios de fluorescência revelaram que entre os quatro compostos em estudo (ácido clorogênico, lapachol, hemateína e hematoxilina), o complexo entre ferro e hemateína apresenta maior estabilidade relativa do que outros.

Palavras-chave: ferro, desferrioxamina, fluorescência, terapia de quelação, sideróforo

ABSTRACT

Silva, G. S. **Prospection of Hydroxamate and Quinone-Type Siderophores for Iron Overload Chelation Therapy.** 2019. (60 p.). Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Iron overload is a harmful condition for patients, who have a significant decrease in life quality. Chelating drugs are molecules that have the capacity for clinical use to act as attenuators of metal overload. In this work we present an analysis of hydroxamate and quinone-type siderophores, intending to broaden the range of iron overload therapy. For each compound it was conducted a competitive assay with the fluorescent probe calcein to verify the iron binding ability, and an antioxidant assay based on suppression of the iron-dependent oxidation of dihydrorhodamine (DHR) under ascorbate. It was observed that cyclic hydroxamate pyridoxatin displayed good ability to scavenge iron from high affinity substrates both in buffer and in intracellular medium. It was also an efficient antioxidant in both setups. However, pyridoxatin seems to be the most toxic from the hydroxamate group (composed also by the linear desferricoprogen and the aromatic desferriasterchrome). Other natural compounds have also been studied as possible candidates for iron-overload drug therapy. Iron complexes were characterized by spectrophotometry to assess the possible stoichiometry considering the binding sites for each compound. Fluorescence assays revealed that among the four compounds in study (chlorogenic acid, lapachol, hematein and hematoxylin), the complex between iron and hematein has higher relative stability than others.

Keywords: iron, desferrioxamine, fluorescence, chelation therapy, siderophore

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Homeostase do ferro em mamíferos	10
Figura 2. Estrutura da complexação entre ferro e transferrina	11
Figura 3. Redução do O ₂ via 4 elétrons e 1 elétron	12
Figura 4. Quelantes de uso clínico para a remoção de ferro em sobrecarga	14
Figura 5. Quelantes (a) desferriastecromo, (b) desferricoprogênio e (c) piridoxatina (centro), análogos ao hidroxamato, e (d) oosporeína, análoga à quinona	17
Figura 6. Ciclo redox de metabólitos da quinona e EROs	18
Figura 7. Estrutura geral dos neoflavonoides	19
Figura 8. Estruturas dos neoflavonoides (a) hematoxilina e (b) hemateína	20
Figura 9. Estruturas dos polifenóis (a) lapachol e (b) ácido clorogênico	21
Figura 10. Estruturas dos grupos funcionais (a) hidroxamato (b) ácido ácido α -hidroxicarboxílico e (c) catecol	21
Figura 11. Estrutura da calceína	24
Figura 12. Recuperação de fluorescência da calceína	25
Figura 13. Ácido nitriloacético (nta)	27
Figura 14. Processo de formação de fluorescência através da produção de rodamina	27
Figura 15. Processo de entrada da sonda fluorescente calceína na célula	29
Figura 16. Processo de entrada da sonda DCF na célula	31
Figura 17. Reação de redução do MTT a formazan	31
Figura 18. Comparativo entre os quelantes isolados (625 μ M em DMSO) ou ligados a Fe na proporção molar 1:1. LAPA, lapachol; CLOR; ácido clorogênico; HEMX, hematoxilina; HEMT, hemateína	34
Figura 19. Titulação do lapachol com ferro. Os valores à esquerda se referem à proporção molar Fe:quelante	35
Figura 20. Titulação do ácido clorogênico com ferro. Os valores à esquerda se referem à proporção molar Fe:quelante	35
Figura 21. Titulação da hemateína com ferro. Os valores à esquerda se referem à proporção molar Fe:quelante	36
Figura 22. Titulação da hematoxilina com ferro. Os valores à esquerda se referem à proporção molar Fe:quelante	36

Figura 23. Curvas de titulação dos quelantes com ferro. Para HEMT e HEMX, foram monitorados mais de um comprimento de onda	37
Figura 24. Estrutura do complexo entre ferro e lapachol	38
Figura 25. Fluorimetria utilizando solução de calceína e FAS a 2 μ M	39
Figura 26. Fluorimetria utilizando solução de calceína e FAS 0,1 μ M	39
Figura 27. Capacidade quelante através de recuperação de fluorescência	41
Figura 28. Quelantes e seus análogos	41
Figura 29. Três distintas classes de hidroxipiridinonas	43
Figura 30. Estruturas de ressonância da deferiprona (representante da classe das 3,4-hidroxipiridinonas) a diferentes estados de protonação	43
Figura 31. Ensaio antioxidante com a sonda DHR	44
Figura 32. Permeabilidade e recuperação de fluorescência em células HeLa	46
Figura 33. Permeabilidade e recuperação de fluorescência em células HepG2	46
Figura 34. Ensaio antioxidantes intracelulares nas linhagens HeLa e HepG2	48
Figura 35. Novos quelantes: SIH (esquerda, indicando os sítios de coordenação com ferro) e PIH (direita).	50
Figura 36. Viabilidade celular de células HeLa avaliadas pela formação de formazan (a λ =570 nm) em função dos tratamentos com quelantes e com cisplatina (10 μ M)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes e solventes

23

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo-Tf: Apo-transferrina

CAFe: Complexo calceína-ferro

CAL-AM: Acetometoxi-calceína

DCFDA: Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DHR: Di-hidrorodamina

DFO: Desferrioxamina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT1: Transportador de metal divalente 1

DTPA: Ácido Dietilenotriaminopentacético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FAS: Sulfato ferroso amoniacal

FDA: Food and Drug Administration

HBS: HEPES buffered saline

HeLa: Linhagem de células de câncer de cérvix humano

HepG2: Linhagem de células de hepatoma humano

Holo-Tf: Holo-transferrina

HOX: Heme oxigenase

HPO: Hidroxipiridinona

HQ: Hidroxiquinolina

LBI: Labile plasma iron; Ferro lábil plasmático

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]

NTA: Ácido nitriloacético

NTBI: Non-transferrin-bound iron; Ferro não ligado à transferrina

Tf: Transferrina

Sumário

1. Introdução	9
1.1 O Ferro e sua importância biológica	9
1.2 Homeostase do ferro	9
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	11
1.4 Desordens relacionadas ao metabolismo do ferro	13
1.5 Tratamentos para a sobrecarga de ferro.....	14
1.6 Produtos naturais como quelantes.....	15
1.6.1 Hidroxamatos	17
1.6.2 Oosporeína.....	18
1.6.3 Neoflavonoides.....	19
1.6.4 Outros compostos naturais	20
2. Objetivos	22
2.1 Hipótese	22
2.2 Objetivo geral.....	22
2.3 Objetivos específicos	22
3. Parte Experimental.....	23
3.1 Reagentes, Solventes e Tampões	23
3.2 Ensaios com hemateína, hematoxilina, lapachol e ácido clorogênico	24
3.2.1 Titulação espectrofotométrica	24
3.2.2 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína.....	24
3.3 Ensaios com desferriastecromo, desferricoprogênio, piridoxatina e oosporeína	26
3.3.1 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína.....	26
3.3.2 Quantificação da atividade antioxidante mediada por ferro	26
3.3.3 Remoção de metal em células sobrecarregadas com ferro	28
3.3.4 Atividade antioxidante intracelular	30
3.3.5 Viabilidade celular	31
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Ensaios com hemateína, hematoxilina, lapachol e ácido clorogênico	33

4.1.1 Titulação espectrofotométrica	33
4.1.2 Estudo da estabilidade dos complexos formados.....	38
4.2 Ensaio com desferriastecromo, desferricoprogênio, piridoxatina e oosporeína	40
4.2.1 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína.....	40
4.2.2 Quantificação da atividade antioxidante mediada por ferro	43
4.2.3 Remoção de metal em células sobrecarregadas com ferro	45
4.2.4 Atividade antioxidante intracelular	47
4.2.5 Viabilidade celular	50
5. Conclusões	52
6. Bibliografia	53
7. Súmula Curricular.....	60

1. Introdução

1.1 O Ferro e sua importância biológica

O ferro (Fe) é o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre após Si, O e Al, e é o metal de transição mais abundante e importante para os organismos, pois desempenha papel vital no transporte e armazenamento de oxigênio e geração de energia. Está presente em diversos compartimentos biológicos, tais como cofator de enzimas do ciclo do ácido cítrico, respiração mitocondrial e síntese de DNA, além de integrar o grupo prostético heme das proteínas hemoglobina (transportadora de O₂ na corrente sanguínea) e mioglobina (armazenadora de O₂ no tecido muscular) [1, 2].

O corpo humano contém entre 3 a 5 gramas de ferro, sendo localizado principalmente como cofator do grupo heme na hemoglobina dos eritrócitos sanguíneos (>2 g) ou armazenado na mioglobina de músculos (cerca de 300 mg). Pode também ser encontrado em macrófagos no baço e fígado em quantidades de cerca de 600 mg. O excesso de ferro costuma ser armazenado na ferritina (cerca de 1 g). Apesar de possuir um ciclo bem equilibrado, é necessária a ingestão de ferro diariamente, pois uma fração é eliminada pelo organismo. As perdas diárias, decorrentes de descamação, sangramentos, menstruação somam de 1 a 2 mg por dia [1].

1.2 Homeostase do ferro

A absorção do ferro ocorre em sua grande parte no duodeno, por células denominadas enterócitos [1] (Figura 1). A maior parte do ferro não-heme consumido diariamente pelo ser humano está no estado de oxidação Fe(III). Entretanto, devido à sua baixa labilidade, esta espécie é reduzida pelas ferreredutases presentes na membrana exterior do enterócito à forma Fe(II). A seguir, atravessa a membrana apical do epitélio intestinal em direção ao meio intracelular, sendo mediado pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1). O ferro heme, por sua vez, utiliza uma outra rota: o grupo heme penetra a célula intacto, embora não se saiba exatamente os mecanismos desta absorção [3]. Dentro da mesma, sofre a ação de uma heme oxigenase (HOX1), sendo liberado como Fe(II). Uma parte dessa espécie é armazenada no interior da célula pela ferritina, enquanto o restante é transportado para fora da célula devido à ação da

ferroportina, localizada na membrana plasmática da célula. O fluxo de ferro transportado pela ferroportina é controlado pela hepcidina, produzida no fígado. A ferroportina atua em conjunto com a hefestina e a ceruloplasmina, proteínas dependentes de cobre que funcionam como ferroxidases, convertendo Fe(II) a Fe(III). A hefestina costuma se localizar junto à ferroportina na membrana plasmática, enquanto a ceruloplasmina é produzida pelo fígado.

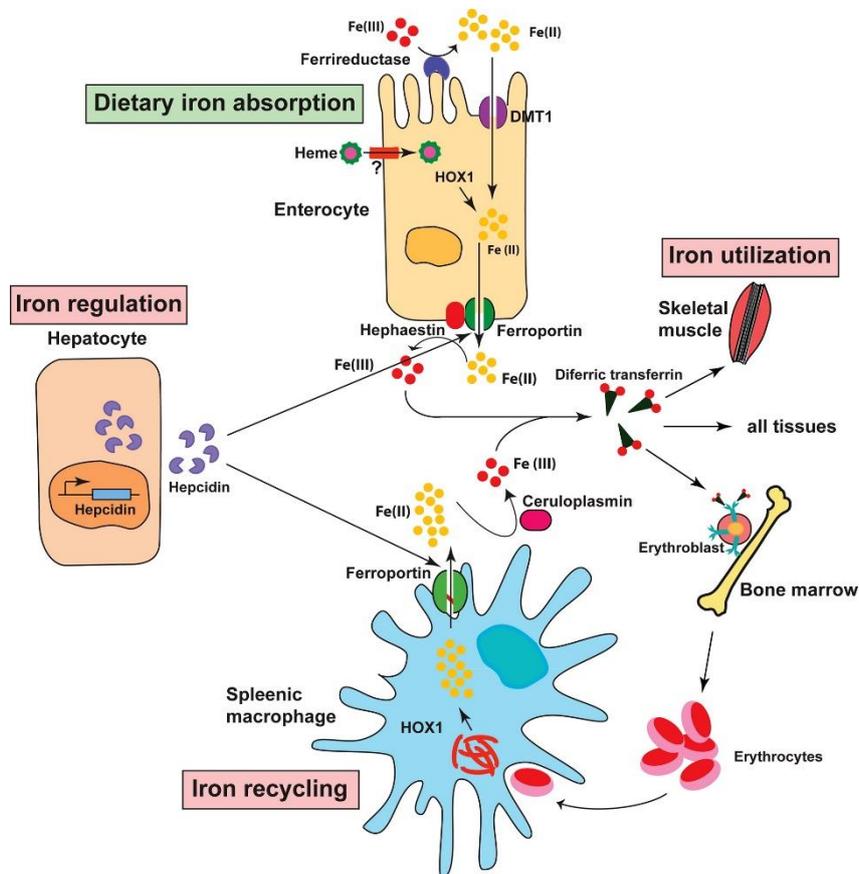


Figura 1. Homeostase do ferro em mamíferos. [4]

Em seguida, a glicoproteína transportadora de ferro, transferrina, capta o ferro livre no plasma e distribui para as regiões do corpo de acordo com a necessidade (Figura 2). A ligação entre ferro e transferrina é dependente do pH: sua associação possui maior eficiência a pH 7, enquanto a dissociação aumenta com a diminuição do pH. Cada molécula de transferrina pode se ligar a dois átomos de ferro. Assim, a transferrina pode ser encontrada em três formas: ligada a nenhum ferro (apo-Tf), a um ou a dois ferros (holo-Tf). Em geral, cerca de 30% da capacidade de armazenamento de ferro na transferrina é utilizada, sendo a forma mono a mais comum em pessoas saudáveis. Os principais destinos do ferro levado pela transferrina são a medula, onde

ocorre a formação de eritrócitos (eritropoiese), além do baço, fígado e músculos (neste último armazenado sob a forma de mioglobina). Grande parte do ferro utilizado no organismo é reciclado via a ação de macrófagos. Contudo, uma parte é perdida em processos de sangramentos, descamação epitelial e secreções intestinais, justificando a reposição diária via alimentação.

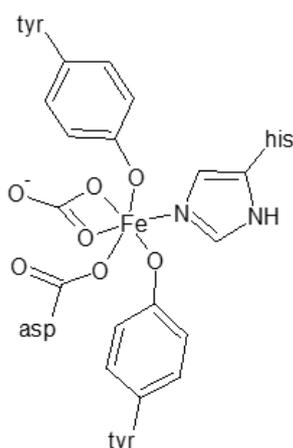


Figura 2. Coordenação do ferro no sítio ativo da transferrina. Os resíduos de aminoácido da proteína são Asp (aspartato), Tyr (tirosina) e His (histidina). Um ânion bicarbonato completa a esfera de coordenação do Fe(III) na Tf.

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Apesar de todos os seus benefícios, o ferro leva à produção de espécies reativas de oxigênio, através da reação de Fenton (Equação 1.1), descoberta por Henry John Horstman Fenton no fim do século 19.



Equação 1.1 Reação de Fenton

As espécies reativas de oxigênio são compostos altamente instáveis e capazes de reagir rapidamente com outras moléculas com as quais colidem. Elas podem ser espécies radiculares (radicais livres), os quais possuem um número ímpar de elétrons

em sua camada de valência, ou espécies moleculares com elétrons desemparelhados, o que favorece sua reatividade.

Em organismos sob condições aeróbias, mais de 90% do oxigênio consumido é transformado em água pela ação da citocromo oxidase na cadeia transportadora de elétrons, baseado em um mecanismo de 4 elétrons e que não produz nenhuma ERO durante o processo (Figura 3). Menos de 10% do oxigênio é reduzido através de várias reações seguidas com transferência de apenas um elétron em cada. Nessas reações são formadas espécies reativas como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), além de H_2O_2 .

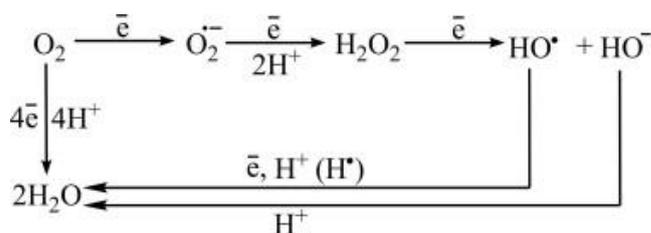
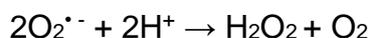


Figura 3. Redução do O_2 via 4 elétrons e 1 elétron [5]

Espécies de ferro não coordenado podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio em organismos aeróbios. Entre essas espécies destaca-se o radical hidroxila (OH^{\cdot}), altamente reativo, capaz de reagir com vários tipos de moléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, gerando dano oxidativo. Desse modo, o ferro pode causar danos ao equilíbrio redox da célula quando fora dos compartimentos bioquímicos adequados. Assim, os níveis de ferro nesses reservatórios devem ser estritamente controlados, através da regulação de sua homeostase, para garantir níveis não-tóxicos desse importante nutriente [6]. Com a descoberta da superóxido dismutase, enzima responsável pela dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equação 1.2), os estudos acerca das espécies reativas de oxigênio ganharam maior visibilidade.



Equação 1.2 Reação de dismutação do superóxido catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD)

No soro, o ferro livre é denominado NTBI (non-transferrin-bound iron, ferro não ligado à transferrina), mas a sua natureza química ainda não é totalmente definida. Este é um termo que engloba várias espécies que podem ou não possuir habilidade redox. Algumas destas espécies redox-ativas são lábeis, termo que neste caso se refere a complexos que mudam de ligante rapidamente. Essa condição é essencial para que o ciclo redox aconteça [7], e será causadora dos principais danos associados ao excesso de ferro, como veremos a seguir.

1.4 Desordens relacionadas ao metabolismo do ferro

Nos seres humanos a principal desordem relacionada ao metabolismo do ferro é a sua falta, a anemia ferropriva, tratada na maioria dos casos com melhora na dieta ou suplementação deste mineral. Entretanto, em certas condições o corpo pode encontrar-se sobrecarregado de ferro, problema mais complexo de resolver. Doenças como a hemocromatose hereditária ocasionam acúmulo de excesso de ferro em vários tecidos, especialmente no fígado. Já a aceruloplasminemia hereditária ocorre quando há mutação no gene da ceruloplasmina, alterando sua função de ferroxidase do ferro, provocando sobrecarga [3].

A sobrecarga de ferro ocorre sempre que, por algum motivo, o organismo adquire mais ferro do que o necessário para o seu funcionamento adequado. Instauram-se então os chamados reservatórios de ferro lábil, que podem ser plasmáticos ou citossólicos. Os reservatórios plasmáticos como vimos são conhecidos pelo nome de NTBI, e são resultados de doenças como a hemocromatose hereditária, ou após longos períodos de transfusões (como no caso das talassemias). A composição química desses reservatórios é indefinida [8], envolvendo espécies monoméricas ou oligoméricas de Fe com albumina, citrato, aminoácidos ou outros ligantes séricos [9, 10]. Dentre todas as espécies de Fe que compõem o NTBI, existe uma parcela com elevada reatividade, denominada LPI (*Labile plasma iron*; Ferro lábil plasmático), e é essa parcela que deve ser o alvo de qualquer tipo de terapia de remoção do excesso do metal [11].

Estima-se que 4,5% da população mundial seja afetada pela talassemia e doenças associadas. Os países com mais casos se encontram no chamado cinturão da talassemia, que compreende a região do mediterrâneo, passando pela Arábia Saudita,

Afeganistão, Paquistão e alcançando países do Sudeste Asiático como Tailândia e Indonésia. Nessa doença, a hemoglobina é defeituosa e o paciente deve se submeter a contínuas transfusões de sangue, o que causa ferro em excesso em um curto espaço de tempo [12].

1.5 Tratamentos para a sobrecarga de ferro

O tratamento mais usual para a sobrecarga de ferro consiste na flebotomia. Ele é indicado por ser seguro, efetivo na maioria dos casos e de baixo custo [13]. Sua recomendação é para pessoas com sobrecarga de ferro sem anemia severa na qual a eritropoiese é relativamente normal [14]. Entretanto, podem ocorrer efeitos colaterais como náuseas, sudorese, palidez e até mesmo desmaios. Em casos mais graves ocorrem espasmos musculares e convulsões [15].

Outro tratamento muito utilizado é a terapia de quelação, indicado para pacientes que não podem passar por flebotomia, seja pela ineficácia da eritropoiese ou pela severa anemia. Esta é a principal alternativa para pacientes com beta-talassemia severa ou outros tipos de anemia crônica associados à eritropoiese ineficaz. Envolve a administração de um quelante (Figura 4) por via intravenosa (desferrioxamina, sideróforo de origem natural) ou oral (deferiprona e deferasirox, ambos sintéticos) isoladamente ou em combinação, dentro de um regime de tratamento voltado a mobilizar o ferro dos seus reservatórios para posterior excreção. As células são permeáveis aos quelantes deferiprona e deferasirox (mas não à desferrioxamina) [16].

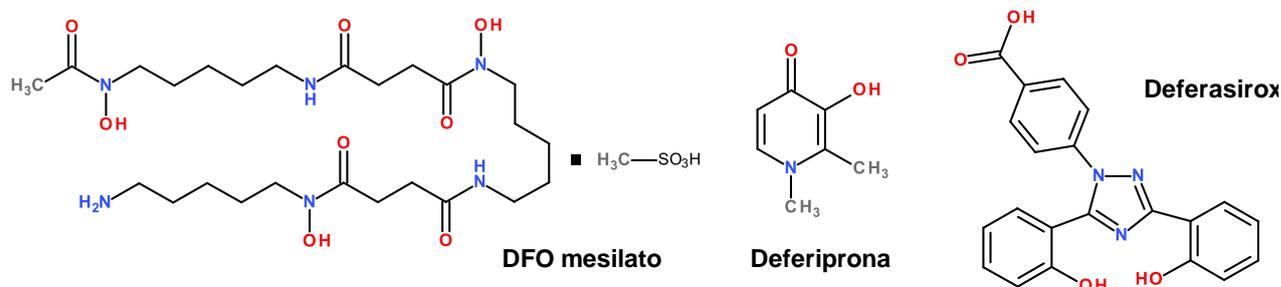


Figura 4. Quelantes de uso clínico para a remoção de ferro em sobrecarga

A desferrioxamina foi o primeiro quelante aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), em 1968 [17]. Contudo, algumas dificuldades são observadas em relação ao uso destes quelantes. A desferrioxamina, por sua elevada solubilidade, não é absorvida via oral, sendo então administrada por via intravenosa entre 8 a 12 horas, ao menos cinco dias por semana. Essa baixa praticidade diminui a aderência ao tratamento e a qualidade de vida do paciente, e aumenta a possibilidade de infecção local. Por esses motivos, em 1987 foi aprovado o uso da deferiprona, tratamento mais econômico. Apesar de ser utilizado em grande quantidade na Europa e Ásia, não possui licença para uso na América do Norte desde que foram descobertos pacientes os quais desenvolveram agranulocitose (condição que resulta na diminuição dos glóbulos brancos). O deferasirox, por outro lado, é extremamente insolúvel em água, e deve ser administrado em forma de suspensão preparada pelo próprio paciente, diminuindo sua praticidade.

Além disso, vários efeitos colaterais da terapia de quelação foram registrados. A desferrioxamina pode causar danos na visão e audição, reações alérgicas, defeitos ósseos e, em doses elevadas, danos neurológicos e pulmonares. No caso da deferiprona, se observaram distúrbios gastrintestinais, neutropenia/agranulocitose e artralgia. O deferasirox pode causar distúrbios gastrintestinais, erupção cutânea, falência hepática e renal [18]. Além disso, foi relatada uma preocupação de que os testes clínicos do deferasirox não foram executados cuidadosamente, o que poderia estar na raiz de alguns óbitos associados a pacientes que também fizeram uso desse medicamento [19, 20].

Algumas drogas vêm sendo recentemente avaliadas em animais e testes clínicos limitados. Entre elas se destacam polímeros de desferrioxamina-amido administrados via parenteral, e os compostos deferitrina e L1NAII (1-alil-2-metil-3-hidroxi-pirid-4-ona), ambos administrados via oral [14].

1.6 Produtos naturais como quelantes

Os dados apresentados justificam o interesse crescente na busca de novos quelantes para a terapia de remoção/redistribuição de ferro em sobrecarga, os quais possam cumprir a função de sobrecarga de ferro intracelular e transferir o metal para a apo-transferrina circulatória [21]. Neste projeto, foram avaliadas as potencialidades

de produtos naturais nesse tipo de tratamento, provenientes de colaborações com outros laboratórios.

Para que um quelante seja eficiente na remoção do ferro ele deve interferir o mínimo possível com outros cátions existentes no organismo. Fe(III) de alto spin é classificado como ácido duro devido à sua alta densidade eletrônica. Ligantes que preferem a espécie Fe(II), a qual possui menor densidade de carga, possuem átomos doadores mais moles, como por exemplos grupos piridina, que contém nitrogênio aromático. Contudo, em geral esses ligantes não são específicos apenas para o ferro: no organismo há outros metais moles divalentes, como os íons Zn(II) e Cu(II). Já quelantes que preferem o Fe(III) possuem átomos duros, como os átomos de oxigênio carregados nos grupos hidroxamatos e catecolatos. Esses ligantes são mais específicos para a complexação com ferro, pois outros metais trivalentes com características semelhantes ao Fe(III), como Al(III) e Ga(III), não são essenciais e estão em menor quantidade no organismo, o que torna a forma férrica um alvo melhor de atuação. Além disso, quelantes com alta afinidade com Fe(III), quando em situações aeróbicas, também conseguem complexar a forma ferrosa e, através de auto-oxidação, transformá-la na forma férrica [22].

Os complexos de Fe(II) e Fe(III) possuem coordenação preferencialmente hexacoordenada, com geometria octaédrica. Estas espécies possuem orbitais d não preenchidos, característica comum dos metais de transição.

O ferro está presente em condições aeróbicas na forma de minerais extremamente insolúveis, como hematita, goetita e pirita ou na forma de carbonatos e silicatos. Para conseguir captar estas espécies de ferro, bactérias desenvolveram compostos chamados sideróforos, os quais possuem elevadas constantes de complexação com este metal.

Ao analisar os sideróforos existentes naturalmente produzidos por bactérias, nota-se que eles em geral utilizam a mesma estratégia: utilizando seus átomos oxigênio, eles fazem seis ligações com o átomo de ferro, completando sua esfera de coordenação. Do ponto de vista termodinâmico a eficiência de um ligante hexadentado é a maior, por possuir grande variação entrópica entre o metal solvatado e quelante livre e o complexo formado.

1.6.1 Hidroxamatos

O desferriastecromo (Figura 5a) é um metabólito produzido pelo *Aspergillus terreus*, e *Aspergillus fumigatus* e possui uma estrutura com ácido hidroxâmico.

O desferricoprogênio (Figura 5b) é um tris-hidroxamato produzido pela cepa de fungos CMB-W045, obtida da vespa *Sceliphron laetum* (vespa-do-barro australiana) [23]. Sua atividade como sideróforo já é conhecida, sendo capaz de formar um complexo hexacoordenado com o ferro. Seu desempenho como ajuvante para uma terapia de quelação de ferro, contudo, ainda não foi investigado.

A partir do fungo *Chaunopycnis* sp, associado a caracóis-do-mar do gênero *Siphonaria* encontrados em Manora Park, Shorncliffe, Queensland, foi isolado o possível sideróforo piridoxatina (Figura 5c). Há estudos preliminares sobre a habilidade quelante de ferro da piridoxatina [24].

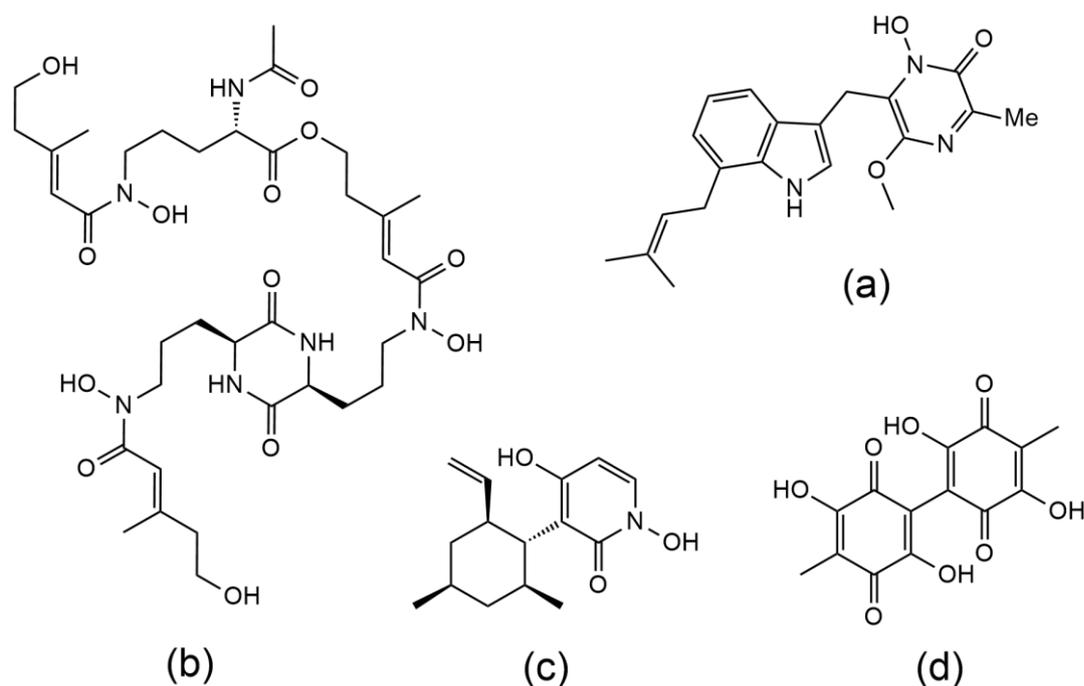


Figura 5. Quelantes (a) desferriastecromo, (b) desferricoprogênio e (c) piridoxatina (centro), análogos ao hidroxamato, e (d) oosporeína, análoga à quinona

1.6.2 Oosporeína

A oosporeína (Figura 5d), um derivado da quinona, foi obtida através de fungos não identificados, cultivados a partir de esfregaços de rochas litorâneas obtidos entre marés no litoral de Queensland, Austrália. É solúvel em pH fisiológico mas instável em meio alcalino, por ser um ácido de força considerável ($pK_a = 2,42$) [25]. Possui moderada atividade antifúngica [26] e antibacteriana Gram-negativa [27], mas ainda não há resultados em relação à terapia de quelação de ferro.

As quinonas são conhecidas por participarem de reações de formação de EROs (Figura 6), devido a seu caráter eletrofílico, Essa característica, apesar de ser utilizada para tratamento de tumores, confere a esses compostos certa toxicidade, pois as reações subsequentes à formação de EROs não são totalmente seletivas [28].

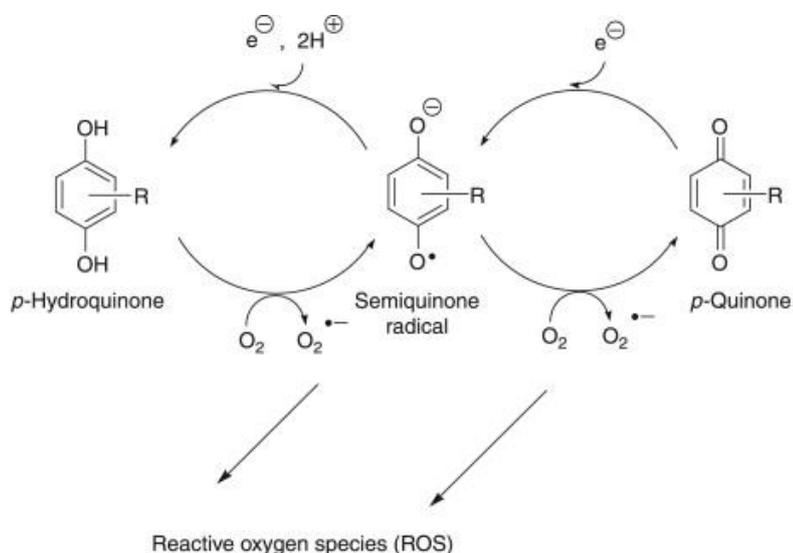


Figura 6. Ciclo redox de metabólitos da quinona e EROs [28]

Os compostos apresentados nas seções 1.6.1 e 1.6.2 são oriundos de colaboração com o laboratório do Dr. Robert Capon, pesquisador do Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland (Austrália), onde o orientador deste projeto, Dr. Breno Pannia Espósito, foi professor visitante no segundo semestre de 2014. Devido a ensaios preliminares na University of Queensland constatarem sua capacidade quelante, estes compostos foram considerados o escopo principal da pesquisa. Deste modo, foram submetidos a uma gama maior de experimentos.

1.6.3 Neoflavonoides

Outra classe de compostos cuja complexação com ferro é bem conhecida são os flavonoides, classe de compostos fenólicos encontrados em plantas, comumente conhecidos por suas cores intensas e gama de atividade biológica [29]. Um subgrupo denominado neoflavonoides, possui como característica o grupo arila ligado ao carbono 4 [30], como mostrado na Figura 7.

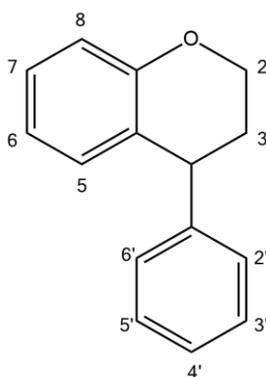


Figura 7. Estrutura geral dos neoflavonoides

O neoflavonóide hematoxilina (Figura 8a) é um pigmento tradicional na indústria têxtil, sendo encontrada no campeche (*Hematoxylum campechianum*), árvore nativa da América Central e Caribe [31]. É conhecida como um derivado hidroxilado da brasileína, pigmento presente no pau-brasil. Após oxidação ao ar, a hematoxilina é convertida a hemateína (Figura 8b), molécula normalmente empregada na indústria têxtil. Essa forma oxidada também apresenta excelentes propriedades quelantes de cátions duros como o Fe(III) [32-35].

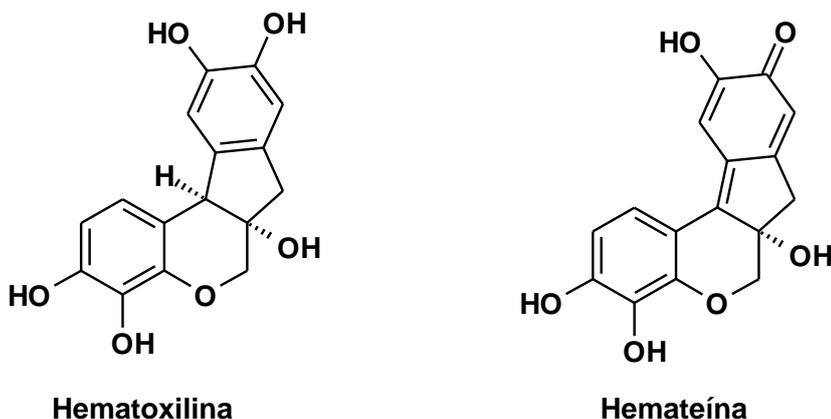


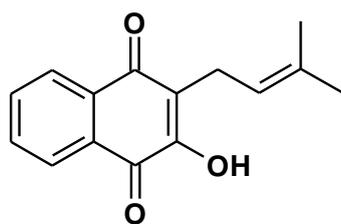
Figura 8. Estruturas dos neoflavonoides (a) hematoxilina e (b) hemateína

1.6.4 Outros compostos naturais

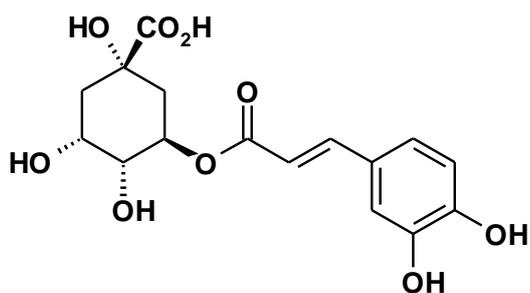
Neste projeto, introduzimos também outros dois produtos naturais nas nossas investigações, fruto de colaborações com outros grupos de pesquisa (Dr. Olimpo García, Universidad de Chile; Dra Evelina Ferrer, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

O lapachol (Figura 9a) é um composto do grupo das naftoquinonas, o qual foi inicialmente isolado de árvores do gênero *Tabebuia*, entre elas o ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e o ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*, *Tabebuia rosea*), encontradas principalmente nas regiões de floresta amazônica, cerrado e mata atlântica. Também foi isolado a partir de árvores de diversas Famílias, entre elas Verbenaceae, Proteaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae. Há séculos o extrato do lenho de ipês tem sido utilizado pelos nativos da região no tratamento de diversas doenças, incluindo malária, sífilis, úlceras, eczema, herpes, febre, infecções bacterianas e fúngicas. Tem sido amplamente estudado em função de sua possível atividade antitumoral, antimetastática, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras [36, 37].

O ácido clorogênico (ácido cafeoilquínico, figura 9b) é um derivado do ácido cinâmico produzido por esterificação do ácido cafêico e ácido quínico. É encontrado no café e em frutas como maçã, pera e cereja, possuindo efeito antioxidante comprovado *in vitro* [38, 39].



Lapachol



Ácido clorogênico

Figura 9. Estruturas dos polifenóis (a) lapachol e (b) ácido clorogênico

Os compostos das seções 1.6.3 e 1.6.4, por não serem o alvo inicial da pesquisa, foram submetidos a apenas alguns dos experimentos, como será descrito na seção 3.

Todos estes compostos apresentam grupos funcionais largamente utilizados como quelantes de ferro: hidroxamatos, ácido α -hidroxicarboxílico e catecol (Figura 10).

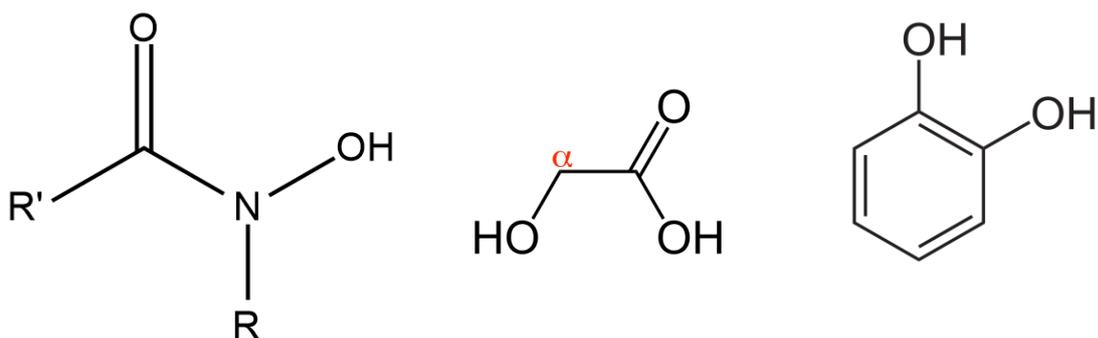


Figura 10. Estruturas dos grupos funcionais (a) hidroxamato (b) ácido α -hidroxicarboxílico e (c) catecol

2. Objetivos

2.1 Hipótese

Baseado no comportamento de sideróforos naturais em bactérias e fungos, os quais complexam com os íons ferro em solução aquosa, parte-se da hipótese que alguns dos compostos naturais em análise podem possuir capacidades análogas, além da permeabilidade celular, necessária para a captação e retirada dos reservatórios de ferro lábil.

2.2 Objetivo geral

Verificar a capacidade de produtos naturais como quelantes na terapia de remoção/redistribuição de ferro lábil.

2.3 Objetivos específicos

- a) Avaliar a capacidade quelante de produtos naturais com ferro, determinar a estequiometria da formação do complexo e investigar sua atividade antioxidante.
- b) Verificar a permeabilidade celular e atividade antioxidante intracelular destes compostos.
- c) Avaliar a toxicidade dos quelantes contra células tumorais.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes, Solventes e Tampões

Tabela 1. Reagentes e solventes

Reagente	Marca	Grau de pureza
Acetometoxicalceína (cal-am)	Sigma Aldrich	99,0%
Ácido clorogênico	-	-
Ácido nitriloacético (nta)	Vetec	Analítico
Água deionizada	Equipamento Millipore (Bedford, EUA)	Ultra-pura
Ascorbato		
Bicarbonato de sódio		
Calceína (cal)	Synth	Analítico
Chelex®	Sigma Aldrich	-
Cloreto de diidrorodamina (dhr)	Biotium	Analítico
Cloreto de sódio	Synth	Analítico
Desferriastecromo	-	-
Desferricoprogênio	-	-
2,2-difenil-1-picril-hidrazila (dpph)	Sigma Aldrich	99,9 %
Dimetilsulfóxido (dmso)	Sigma Aldrich	99,0 %
Hemateína	Sigma Aldrich	99,0 %
Hematoxilina	Sigma Aldrich	99,0 %
Lapachol	-	-
Mesilato de desferrioxamina (dfo)	Novartis	99,0%
Metanol	Sigma Aldrich	Analítico
Oosporeína	-	-
Piridoxatina	-	-
Sulfato ferroso amoniacal	Sigma Aldrich	98,0%

Nos experimentos foi utilizada solução tampão HBS/Chelex isenta de ferro, uma precaução importante contra reações de Fenton colaterais indesejadas catalisadas por traços de Fe(III). Sua preparação ocorre a partir de Hepes 20 mM e NaCl 150

mM, seguido de lavagem da solução com resina Chelex® (1 g/100 mL) e ajuste de pH a 7,4. Os meios utilizados para cultivo celular foram DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e D10 (DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino).

3.2 Ensaios com hemateína, hematoxilina, lapachol e ácido clorogênico

3.2.1 Titulação espectrofotométrica

Foram realizadas titulações espectrofotométricas de hematoxilina, hemateína, lapachol e ácido clorogênico com sulfato ferroso amoniacal (FAS). As análises foram conduzidas em microplacas de 96 poços, utilizando leitor de microplacas (Spectramax M4, Molecular Devices). As soluções de quelantes foram preparadas por dissolução dos mesmos em DMSO. A solução de FAS foi produzida utilizando água mili-Q como solvente, e preparada imediatamente antes do uso. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda entre 350 e 750 nm.

3.2.2 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína

A calceína (Figura 11) é um composto orgânico que, ao ser excitado a 485 nm, emite fluorescência a 520 nm. Quando complexada a uma série de íons metálicos, entre eles o ferro(III), sua fluorescência é suprimida.

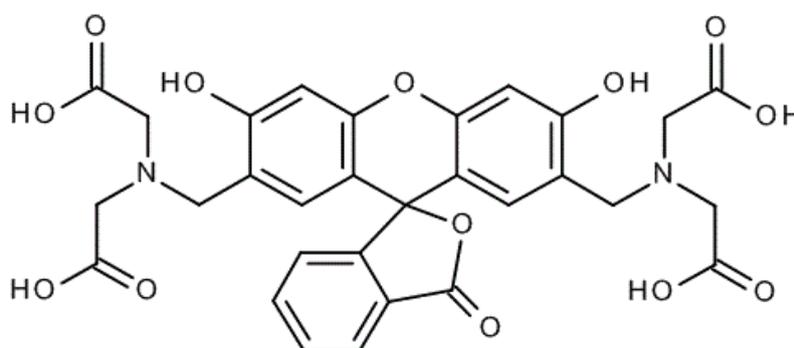


Figura 11. Estrutura da calceína

A adição de um quelante a uma solução de complexo calceína e ferro ("CAFe") causa o deslocamento do íon ferro para a formação do complexo ferro:quelante,

desde que o quelante tenha maior afinidade ao ferro e/ou esteja em excesso molar suficiente. Deste modo, a calceína recupera sua fluorescência (Figura 12). Por essa razão ela foi utilizada para avaliar a estabilidade relativa dos complexos entre ferro e os quelantes em estudo. Quanto maior a estabilidade do complexo formado entre ferro e quelante maior é a quantidade de calceína livre na solução, aumentando a fluorescência da mesma [40].

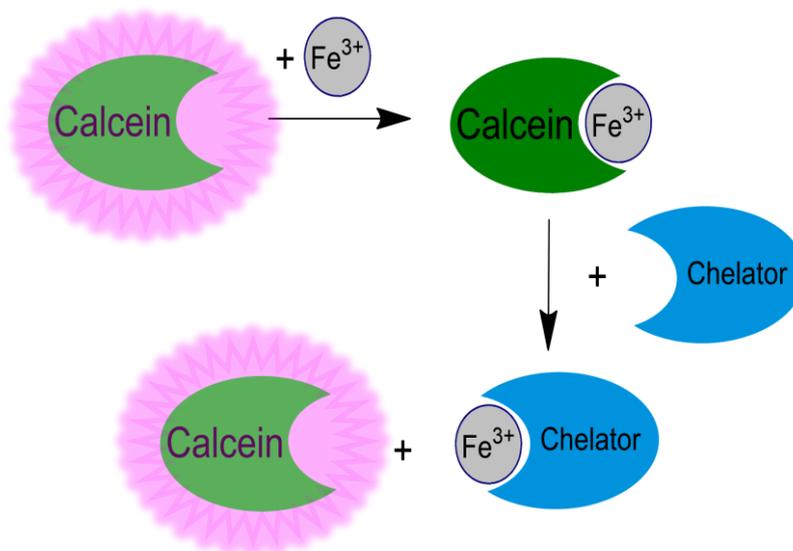


Figura 12. Recuperação de fluorescência da calceína

Em uma placa de 96 poços foram utilizadas oito colunas, duas para cada quelante, em duplicatas. Inicialmente foram adicionados 190 μ L de solução contendo calceína e sulfato ferroso amoniacal ambos a 2 μ M, tamponada por HBS (pH 7,4). Foi analisada a fluorescência emitida através de um fluorímetro leitor de placas (Fluostar Optima). Após a estabilização do sinal (cerca de 10 minutos), foi feita uma curva de titulação adicionando em cada poço 10 μ L de solução de quelantes, variando suas concentrações finais de 0 a 10 μ M. Foi utilizada concentração de quelante em excesso para facilitar o processo de substituição de calceína pelo quelante. Após a adição dos compostos foi realizada nova leitura fluorimétrica por mais 80 minutos. O experimento foi repetido variando a concentração da solução calceína-FAS para 0,1 μ M.

3.3 Ensaios com desferriastecromo, desferricoprogênio, piridoxatina e oosporeína

3.3.1 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína

Em microplacas transparentes de 96 poços foram adicionados 95 μL de solução de calceína 2 μM , tamponada por HBS/Chelex (pH 7,4). A fluorescência emitida foi detectada através de um fluorímetro leitor de placas (BMG Fluostar Optima). Após a estabilização do sinal (cerca de 15 minutos), foram adicionados 95 μL de uma solução aquosa de sulfato ferroso amoniacal (FAS) 2 μM , com o objetivo de formar *in situ* o complexo CAFE, de fluorescência suprimida. A leitura é feita até a estabilização do sinal (cerca de 25 minutos). A seguir, foi construída uma curva de titulação adicionando em cada poço 10 μL de solução de quelante em DMSO, com concentrações finais na microplaca variando entre 0 a 50 μM . Após a adição dos compostos a placa foi novamente levada ao fluorímetro para análise por mais 80 minutos.

3.3.2 Quantificação da atividade antioxidante mediada por ferro

Foi utilizado um método fluorimétrico de avaliação da atividade antioxidante mediado por ferro, que usa condições de pH, temperatura e salinidade semelhantes às do plasma humano. Em linhas gerais, lança-se mão do princípio que formas de ferro livre plasmáticas (aqui mimetizadas pelo complexo FeNTA, nitrilotriacetato férrico, Figura 13), em presença de níveis fisiológicos normais de ascorbato, pode causar um ciclo de reações redox esquematizado na Figura 14. Essas espécies oxidantes formadas são detectadas pela sonda DHR, que se converte na forma fluorescente rodamina, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à concentração de ferro presente na amostra. Quelantes antioxidantes bloqueiam essa oxidação, seja por tornarem o potencial de redução Fe(III)/Fe(II) muito negativo, seja por bloquearem completamente o ambiente de coordenação do metal [11].

O meio fluorogênico consiste em uma solução de DHR 50 μM e ácido ascórbico 40 μM (preparada a partir de estoques congelados 100 mM em DMSO e 8 mM em água, respectivamente), em tampão HBS isento de ferro (pH 7,4). Em um experimento típico, alíquotas de 10 μL de FeNTA e 10 μL dos quelantes são tratadas com 180 μL

do meio fluorogênico em uma placa transparente de 96 poços, de modo a perfazer concentrações finais de ferro de 10 μM e de quelantes de 0 a 50 μM . O leitor de microplacas é um BMG Fluostar Optima, operando com incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ e $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/515$ nm. A intensidade de fluorescência de cada poço é medida em intervalos de dois minutos durante 40 minutos. Ao final, a inclinação de cada uma das curvas cinéticas (correspondente à taxa de oxidação da DHR) é obtida no intervalo de 15 a 40 minutos. Todas as determinações são feitas em duplicatas [11].

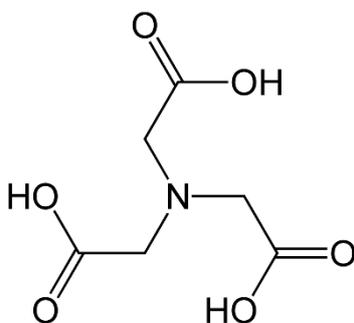


Figura 13. Ácido nitriloacético (nta)

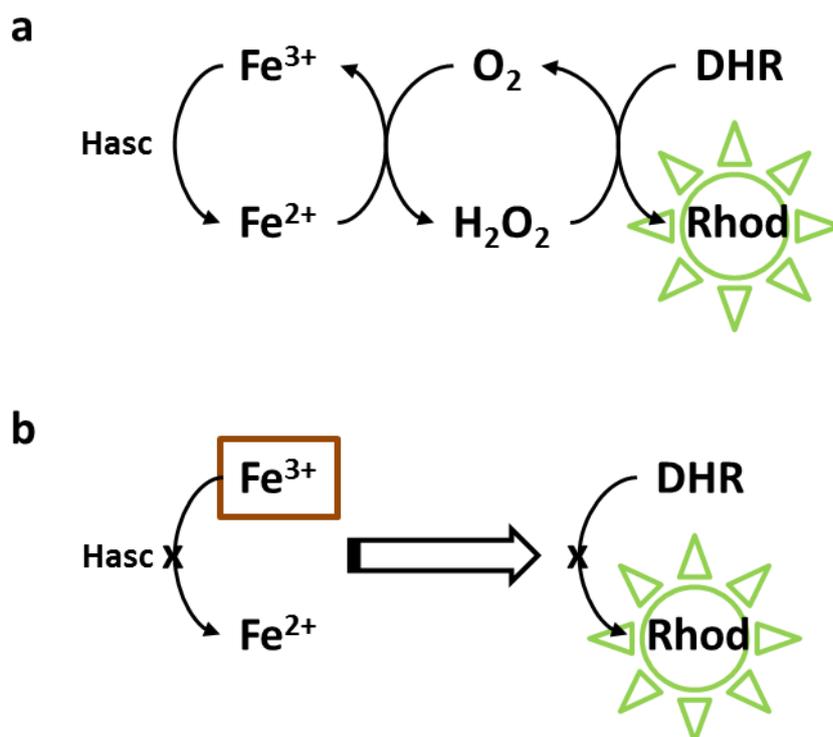


Figura 14. Processo de formação da espécie rodamina fluorescente. (a) Princípio químico da detecção fluorimétrica de formas lábeis de ferro redox-ativas através da auto-oxidação do ácido ascórbico (Hasc) catalisada por ferro. EROs são formadas,

que convertem a sonda DHR na sua forma oxidada fluorescente rodamina (Rhod). (b) Quelantes de ferro de alta afinidade e interesse clínico (retângulo marrom) bloqueiam a etapa de redução do ferro e, portanto, toda a cascata de processos oxidativos, impedindo que a DHR seja oxidada.

3.3.3 Remoção de metal em células sobrecarregadas com ferro

Com a finalidade de verificar a capacidade dos quelantes de penetrar as células e complexarem o ferro citossólico livre, células das linhagens HeLa (câncer de cérvix humano) e HepG2 (hepatoma humano) foram propagadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, glutamina e antibióticos, em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e 3% de umidade.

O protocolo utilizado foi adaptado da literatura [41, 42], e consiste nas seguintes etapas:

- 1) Ligar o equipamento Fluostar Optima (BMG, Alemanha) e inicializar o termostato (para 37°C).
- 2) Colocar no banho-maria (37°C): 7 mL de DMEM incolor (sem indicador “phenol red”), 7 mL de HBS contendo probenecid (0,5 mM) e 15 mL de HBS.
- 3) Preparar 7 mL de solução de acetometoxi calceína (CAL-AM) 3 µM em DMEM incolor pré-aquecido. Isto é feito *imediatamente antes* de usar, para evitar fotodegradação da sonda.
- 4) Remover o conteúdo da placa de células (20 mil células/poço) e secar a borda (por inversão sobre folha de papel toalha).
- 5) Adicionar 100 µL da solução de CAL-AM em cada poço.
- 6) Levar à incubadora (5% CO₂, 37 °C, 20 minutos).
- 7) Remover o conteúdo da placa de células e secar a borda (por inversão sobre folha de papel toalha).
- 8) Lavar 1× com HBS.
- 9) Adicionar 100 µL de HBS contendo probenecid (0,5 mM), pré-aquecido, e levar à leitora de microplacas BMG. Iniciar a leitura.
- 10) Após 5 – 10', adicionar 2 µL de hidroxiquinolina férrica (Fe(HQ)) 125 µM em cada poço. Prosseguir a leitura até estabilização de fluorescência.

- 11) Adicionar 1 μL de DTPA 10 mM em cada poço. Prosseguir a leitura até estabilização de fluorescência.
- 12) Adicionar os quelantes, sempre no volume de 2 μL na concentração inicial 1 mM, em quadruplicata. Como controle positivo, utilizar 2 μL de SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) 2,5 mM em DMSO. Como controle negativo, utilizar 2 μL de DMSO ou do solvente utilizado para dissolver os quelantes.
- 13) Prosseguir a leitura até estabilização de fluorescência.

Esse protocolo baseia-se em que o controle de carregamento de Fe nas células é feito através da incubação das mesmas com a forma esterificada, não-fluorescente da calceína, a acetometoxi-calceína (CAL-AM). No meio citossólico, a CAL-AM é clivada por esterases e convertida à forma fluorescente calceína (Figura 15). Entretanto, na presença de excesso de Fe(III), ocorre a formação de um complexo escuro com o metal, suprimindo a fluorescência. Se o quelante for permeável à membrana, então a fluorescência é regenerada.

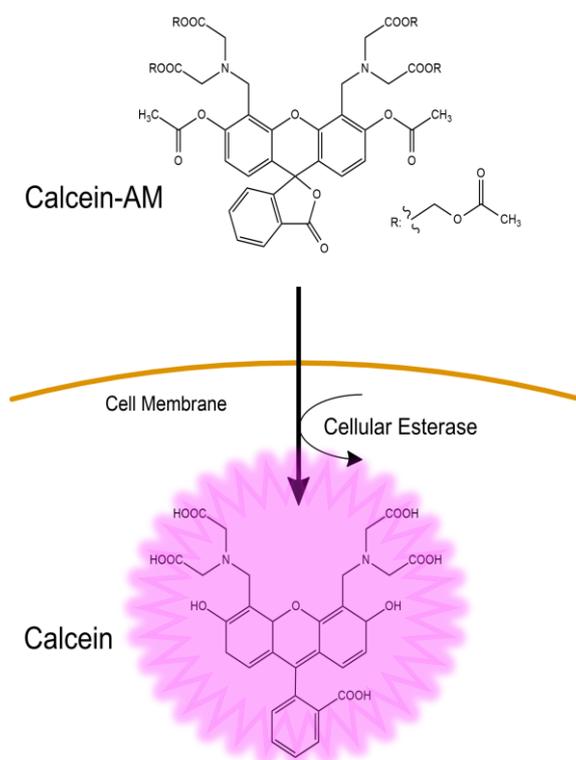


Figura 15. Processo de entrada da sonda fluorescente calceína na célula

3.3.4 Atividade antioxidante intracelular

Este experimento baseia-se na oxidação intracelular da sonda DCFDA mediada pelo sistema ferro/peróxido (Figura 16). O protocolo, adaptado da literatura [43] é descrito abaixo:

- 1) Ligar o equipamento Fluostar Optima (BMG, Alemanha) e inicializar o termostato (para 37 °C).
- 2) Colocar no banho-maria (37 °C): 7 mL de DTPA 100 µM em HBS, 7 mL de HBS/glicose e 15 mL de HBS normal.
- 3) Remover o conteúdo da placa de células e secar a borda (por inversão sobre folha de papel toalha).
- 4) Lavar 1x com HBS.
- 5) Adicionar 100 µL de HBS/Chelex em cada poço.
- 6) Adicionar 6.4 µL de Fe(HQ) 125 µM em cada poço. Incubar no próprio leitor de microplacas a 37 °C por 20'.
- 7) Nesse ínterim, preparar 7 mL de solução de H₂O₂ 50 µM em HBS/glicose.
 - Essa solução deve ser preparada pouco antes do uso, para evitar a degradação do peróxido. Não pode ser armazenada.
- 8) Lavar os poços 1x com DTPA 100 µM em HBS.
- 9) Adicionar 100 µL de solução de H₂O₂ 50 µM em HBS/glicose em cada poço. Incubar no próprio leitor de microplacas a 37 °C por 20'.
- 10) Adicionar a cada poço 2 µL de DCFDA 1 mM em DMSO (estoques no freezer). Iniciar a leitura de fluorescência no BMG.
- 11) Após ~ 15 – 20', adicionar quelantes ou controles (2 µL), ao menos em duplicata. Marcar o número do ciclo n_c imediatamente seguinte ao do reinício da leitura. Prosseguir a leitura até o final.
- 12) Determinar as inclinações das curvas (intensidade de fluorescência x tempo em minutos) desde o ciclo n_c até o final da leitura.

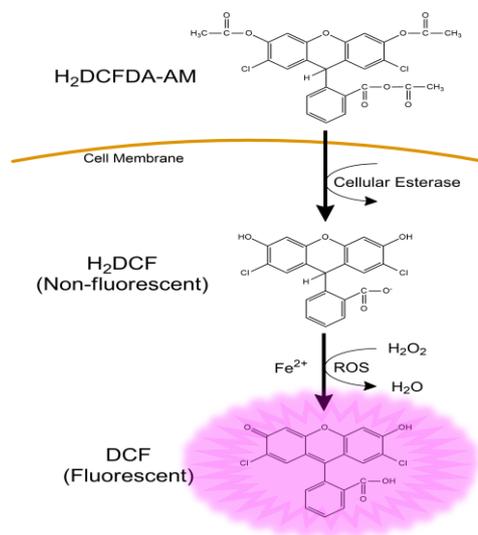


Figura 16. Processo de entrada da sonda DCFDA na célula, e de sua oxidação mediada por Fe/peróxido

3.3.5 Viabilidade celular

Para o desenvolvimento de novos fármacos, é necessário conhecer a toxicidade dos compostos em análise quando submetidos a diferentes linhagens celulares, quantificando o número de células viáveis ou mortas [44]. Ensaios de viabilidade celular ou citotoxicidade possuem a finalidade de mensurar a atividade citotóxica de diferentes compostos e soluções frente a determinados tipos celulares. Os ensaios mais comuns utilizam sais de tetrazolio, dentre os quais o MTT, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]. Uma vez dentro da célula, o MTT sofre uma redução catalítica por desidrogenases mitocondriais, as quais utilizam NADH/NADPH como substrato, conforme indicado na Figura 17.

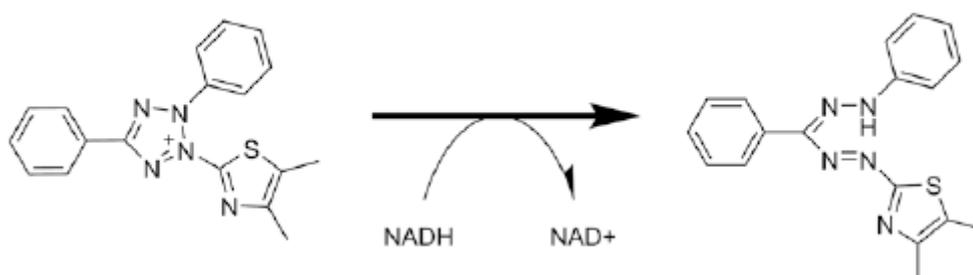


Figura 17. Reação de redução do MTT a formazan

Uma vez que NADH e NADPH são formados durante o ciclo metabólico da célula, a reação com o MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, pode ser utilizada para medir a citotoxicidade.

Em microplacas de 96 poços foram semeadas 100 μ L das linhagens de células em meio D10. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, com as células já aderidas ao fundo dos poços, retirou-se o meio D10. A seguir, foram adicionados em cada poço 100 μ L de solução do meio e, logo em seguida, as alíquotas das amostras estudadas. As microplacas voltaram à estufa por mais 24 horas. No terceiro dia, o meio foi novamente retirado, lavou-se em duplicata com 100 μ L de solução salina e, após sua remoção, foram adicionados 100 μ L de meio DMEM e 10 μ L de MTT (5 mg/mL). Após 3 horas de incubação, retirou-se o meio e foram adicionados 100 μ L de DMSO. As microplacas foram colocadas sob agitação por 10 minutos para a completa dissolução dos cristais precipitados. Fez-se a leitura da absorbância a $\lambda = 570$ nm com subtração do background a 650 nm.

4. Resultados e Discussão

4.1 Ensaio com hemateína, hematoxilina, lapachol e ácido clorogênico

4.1.1 Titulação espectrofotométrica

Para a realização do experimento foi utilizado sulfato ferroso amoniacal devido à sua maior estabilidade em meio aquoso, não interferindo no pH do meio, como ocorre com os sais férricos. Além disso, o íon Fe(II) é mais lábil do que o Fe(III), o que faz com que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente. Entretanto, todos os quelantes apresentam ambiente de coordenação típico de Fe(III). Portanto, é de se esperar que a espécie de ferro efetivamente coordenada aos quelantes seja o íon férrico, dado que os íons ferrosos podem rapidamente se oxidar em meio aquoso aerado para formar o complexo mais estável.

Os resultados do primeiro experimento estão apresentados na Figura 18. Na ausência de ferro, o lapachol possui uma banda de absorvância que se inicia no ultravioleta e se estende no visível até 480 nm. Em concentrações mais altas tende a saturar o detector. De acordo com dados da literatura [18], os picos mais evidentes do lapachol possuem λ_{\max} iguais a 251, 278 e 331 nm, região não incluída na faixa de comprimentos de onda estudados. No espectro do ácido clorogênico é possível inferir um pico na região do ultravioleta, mas não há uma banda definida no espectro visível. O espectro da hematoxilina revela que ela possui duas bandas no intervalo de comprimento de onda utilizado. Em um dos picos se verifica um “ombro”. Há indícios de um possível pico adicional no ultravioleta. A hemateína possui absorvância muito alta no visível, sendo que em determinadas concentrações houve saturação do pico observado.

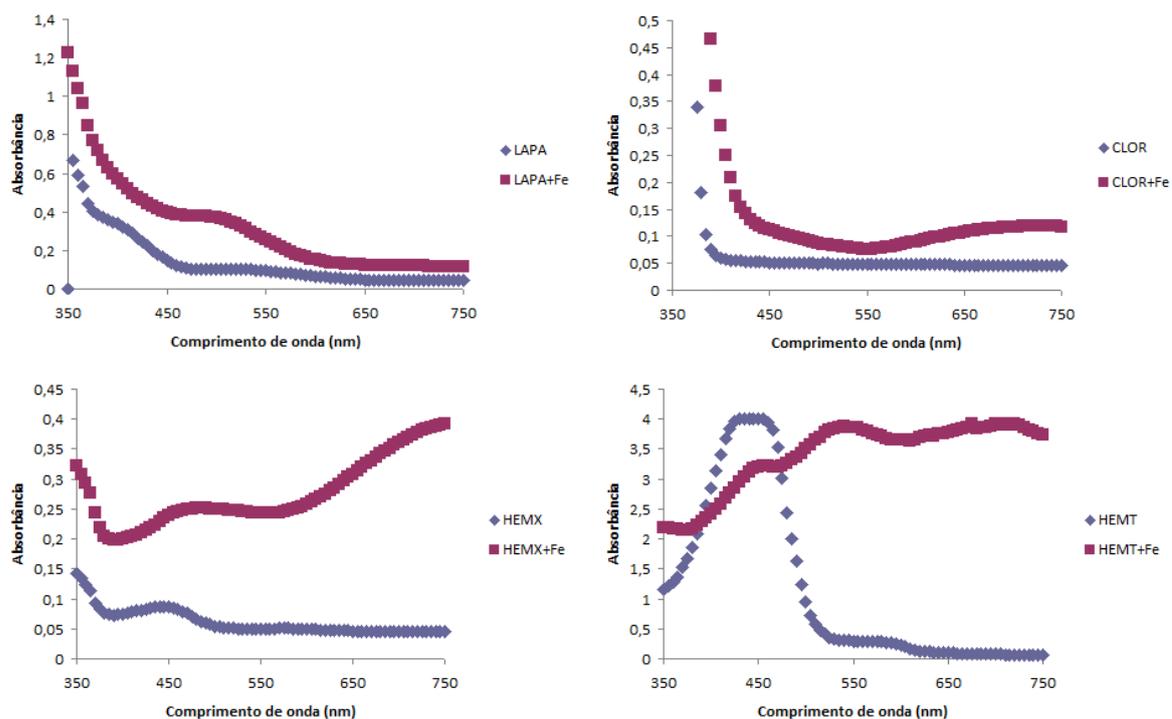


Figura 18. Comparativo entre os quelantes isolados (625 μM em DMSO) ou ligados a Fe na proporção molar 1:1. LAPA, lapachol; CLOR; ácido clorogênico; HEMX, hematoxilina; HEMT, hemateína

Comparando com dados da literatura, o lapachol possui uma banda na região de 270 nm (não captada na leitura), e uma na região de 515 nm, referente ao anel quinonoide [45]. Esta banda sofre variação com a formação do complexo, o que é condizente com o sítio de complexação que se localiza neste anel.

Conforme evidente na Figura 18, a presença de ferro perturba significativamente os espectros, provocando o deslocamento ou aparecimento de novas bandas, indicando a formação dos complexos. Para avaliar com mais detalhes essas interações, realizamos a titulação espectrofotométrica dos quelantes com uma solução de FAS. Os espectros obtidos para cada ligante são apresentados nas Figuras 19 a 22, e as curvas de titulação são apresentadas na Figura 23.

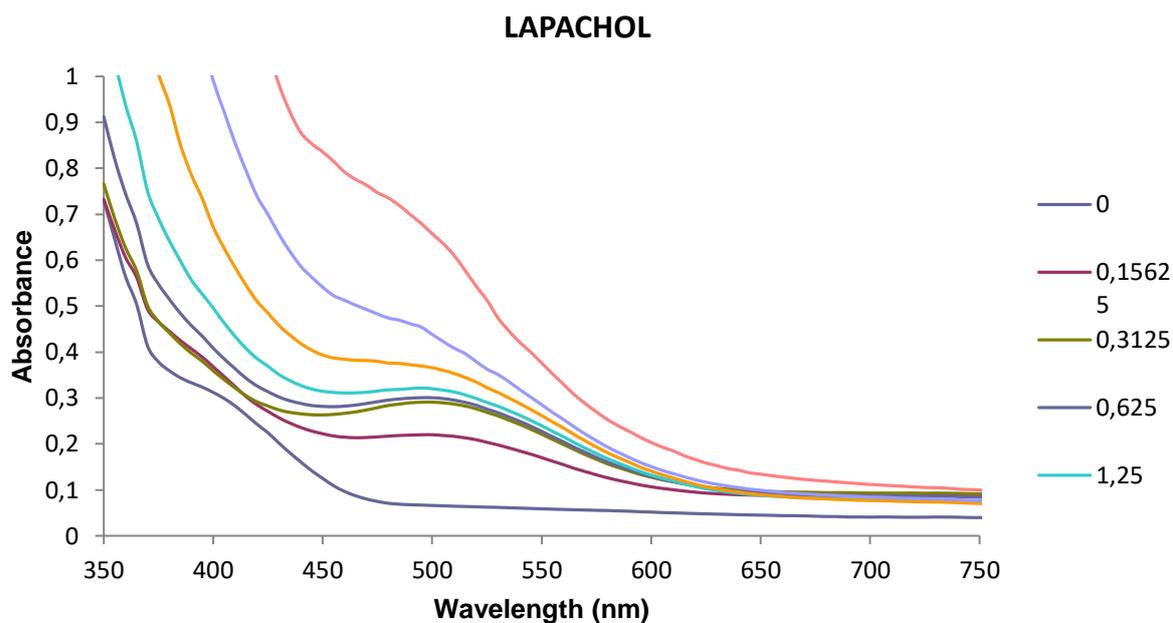


Figura 19. Espectros da titulação do lapachol com ferro. Os valores à direita se referem à proporção molar Fe:quelante.

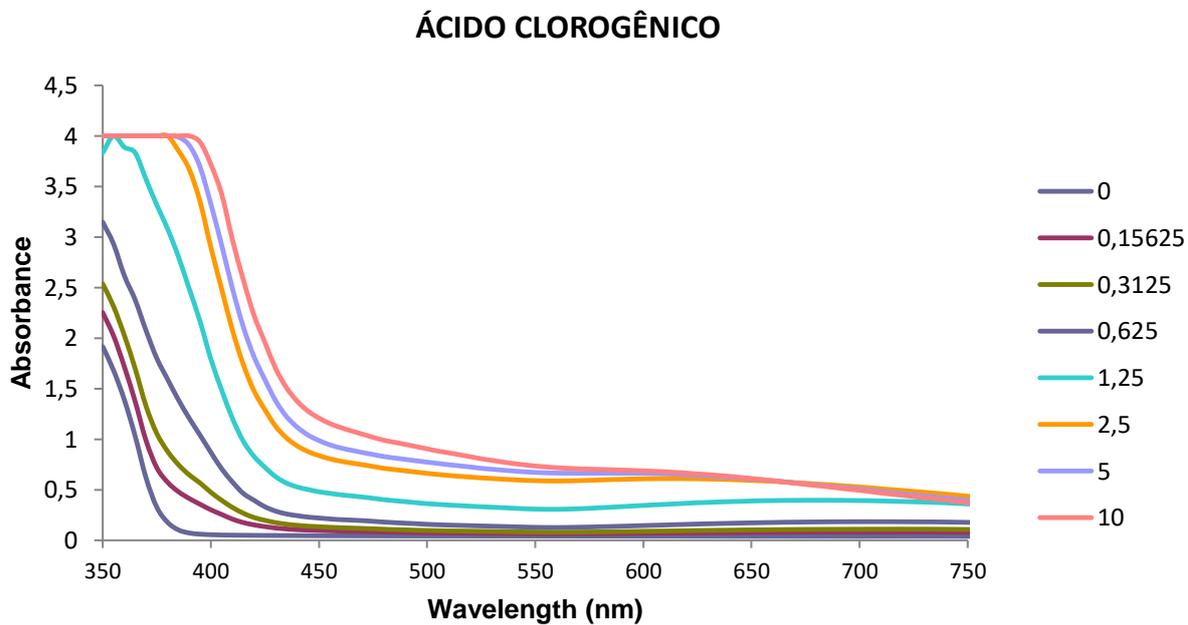


Figura 20. Espectros da titulação do ácido clorogênico com ferro. Os valores à direita se referem à proporção molar Fe:quelante.

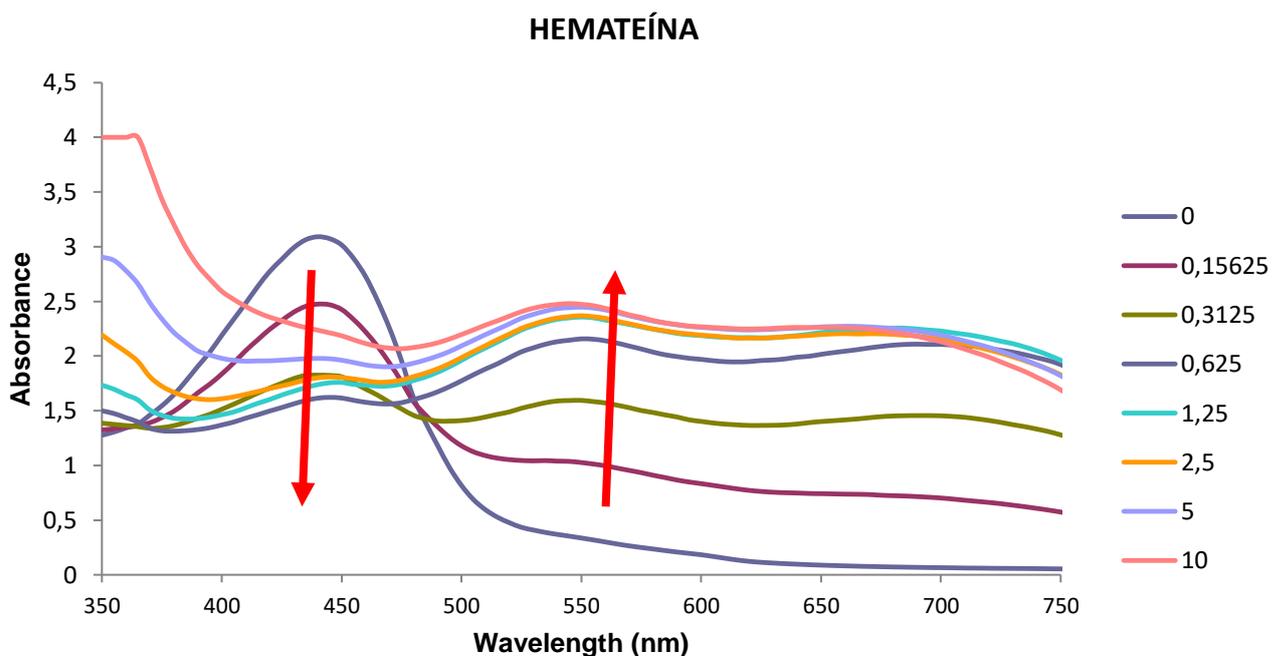


Figura 21. Espectros da titulação da hemateína com ferro. Os valores à direita se referem à proporção molar Fe:quelante.

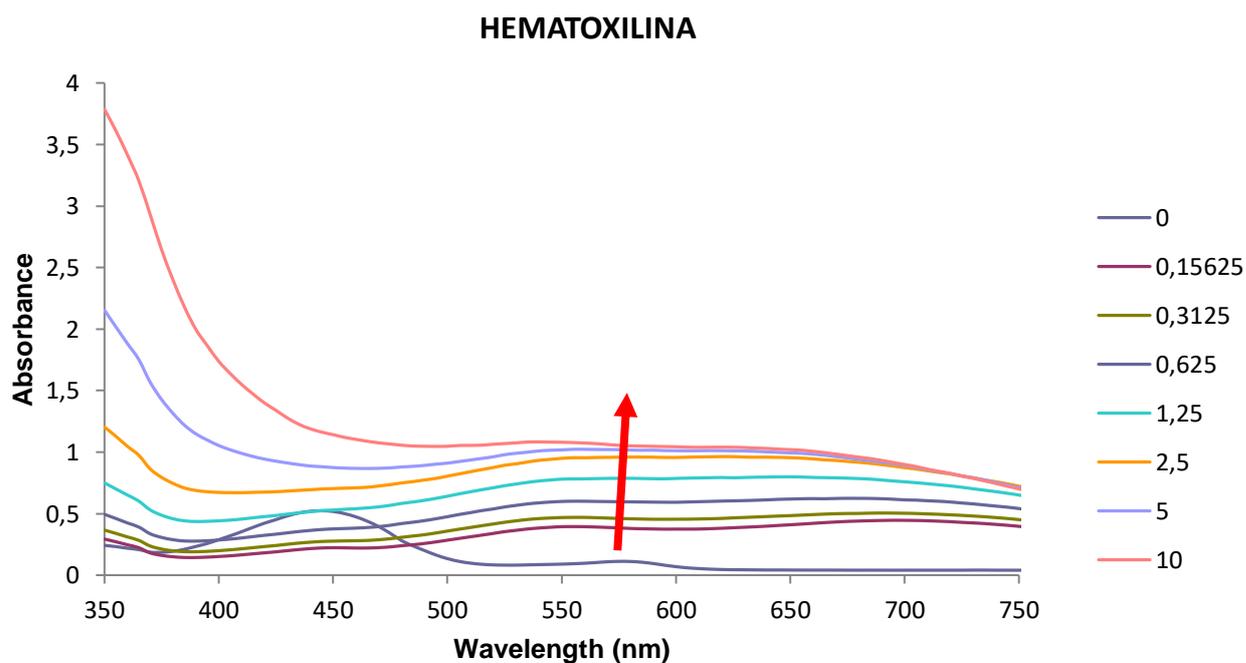


Figura 22. Espectros da titulação da hematoxilina com ferro. Os valores à direita se referem à proporção molar Fe:quelante.

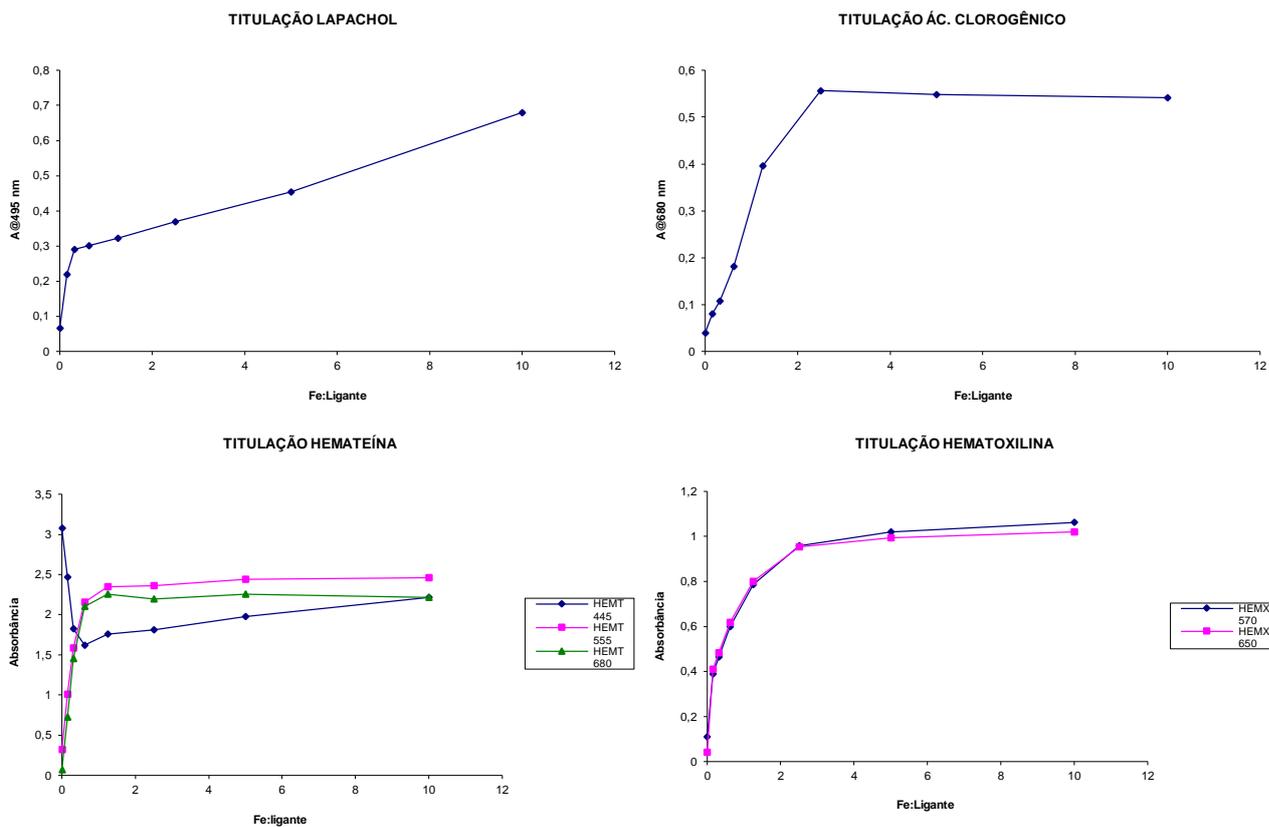


Figura 23. Curvas de titulação dos quelantes com ferro. Para hemateína e hematoxilina foram monitorados mais de um comprimento de onda.

As saturações são verificadas para uma proporção Fe:Q igual a 0,3 (lapachol), 2,0 (ácido clorogênico e hematoxilina) e 1,0 (hemateína). Esses resultados indicam que o complexo entre ferro e lapachol é do tipo FeQ_3 , os complexos entre ferro e ácido clorogênico ou hematoxilina são do tipo Fe_2Q , e o complexo entre ferro e hemateína é do tipo FeQ . Esses resultados são coerentes com as estruturas apresentadas nas Figuras 8 e 9. Entre hemateína e hematoxilina, a diferença é que, no caso da primeira molécula, um dos grupos hidroxila está ausente, então a molécula deixa de ser um biscatecol. O lapachol, sendo aparentemente menor do que os demais ligantes, consegue formar um complexo que preenche as seis posições de coordenação do metal, formando um tris-derivado e comportando-se como um quelante bidentado. Já o ácido clorogênico tem dois ambientes de coordenação, um carboxilato e um catecolato, que podem estar envolvidos na complexação a dois íons metálicos.

Alguns autores na literatura já inferiram sobre as estruturas dos complexos estudados. No caso do lapachol, a estrutura do tipo FeQ_3 é a mais aceita [46], como

mostra a figura 24. Para a hemateína, contudo, publicações afirmam que a proporção entre ferro e quelante é 1:2, formando um complexo do tipo FeQ_2 [47]. Deve-se ressaltar, todavia, que a comparação entre resultados experimentais deve ser feita levando em conta todas as condições. Grande parte dos experimentos realizados com estes compostos foram feitos em meio ácido, o que claramente não pode ocorrer neste trabalho, visto seu uso como medicamento em condições plausíveis, isto é, a pH sanguíneo, cerca de 7,4.

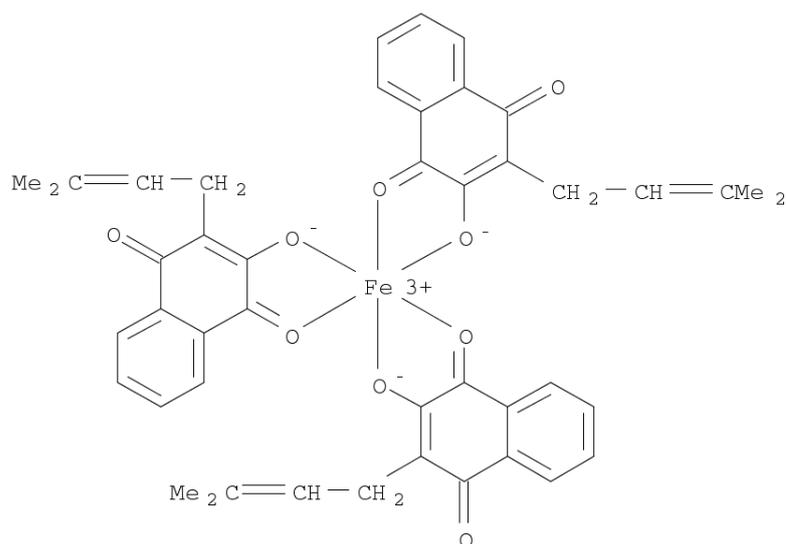


Figura 24. Estrutura do complexo entre ferro e lapachol

4.1.2 Estudo da estabilidade dos complexos formados

As figuras 25 e 26 mostram os valores absolutos de fluorescência para os quatro quelantes estudados quando estes são submetidos a duas concentrações distintas de ferro. Os valores em questão são as médias de cada duplicata. Nas duas figuras nota-se um comportamento semelhante para os quatro quelantes estudados. A solução contendo hemateína é a que produz maior fluorescência em relação aos outros quelantes, sugerindo alta afinidade do ferro com a hemateína. A calceína não-complexada, em maior quantidade, produz mais fluorescência.

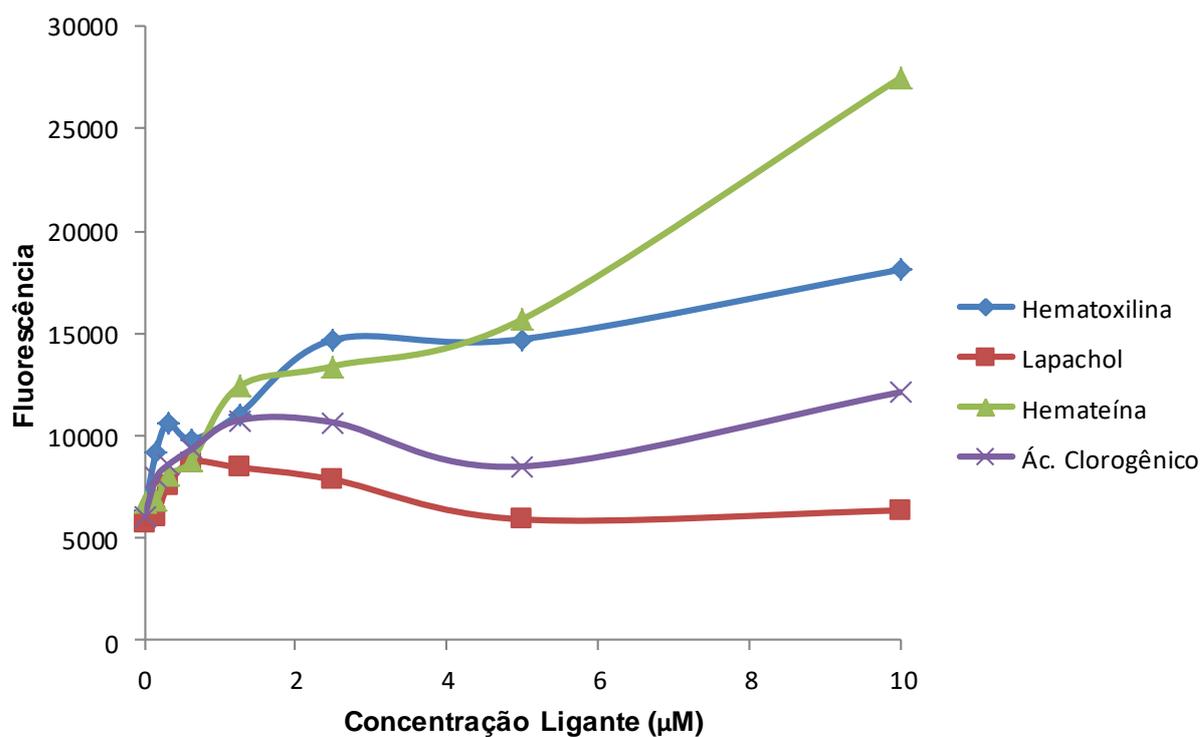


Figura 25. Fluorimetria utilizando solução de calceína e FAS a 2μM

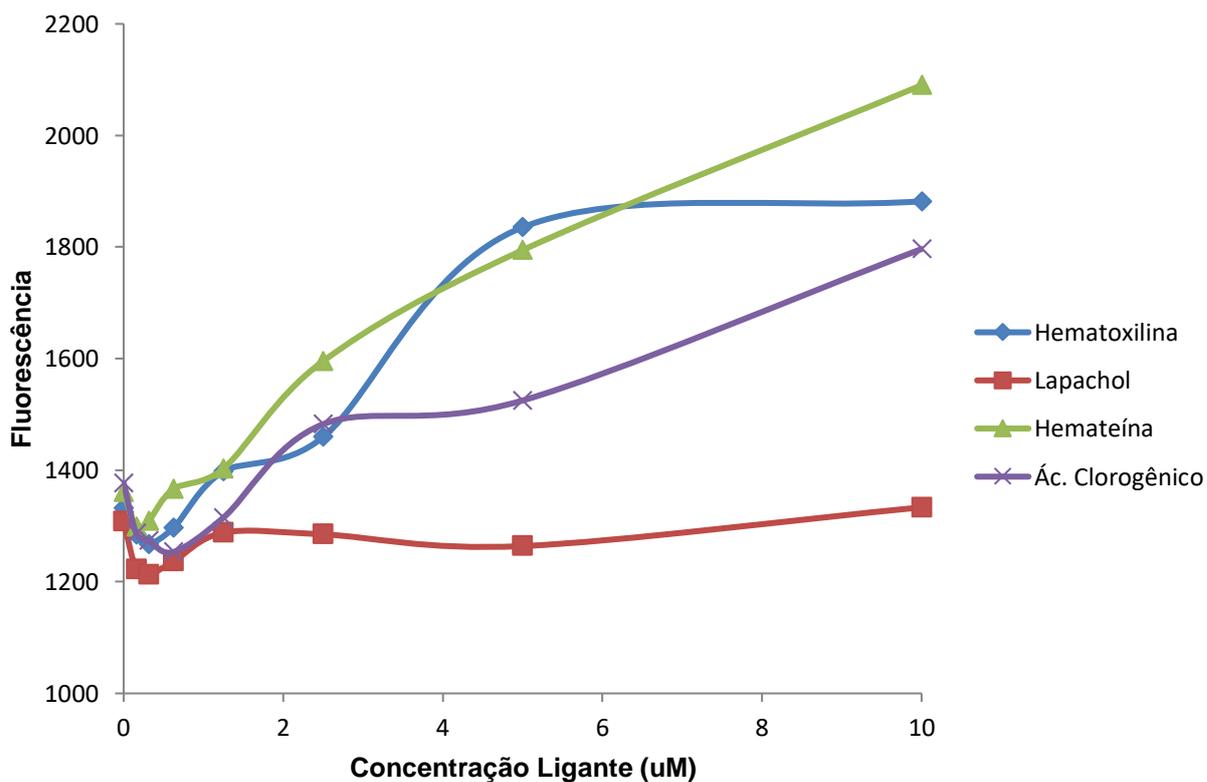


Figura 26. Fluorimetria utilizando solução de calceína e FAS 0,1μM

Exceto pelo lapachol, todos os quelantes obtiveram fluorescência crescente, indicando que em todos os casos houve formação de complexos entre ferro e quelante. O teste de supressão e recuperação de fluorescência mostrou que o complexo entre ferro e hemateína possui estabilidade relativa superior aos demais complexos em estudo. O lapachol, por sua vez, possui a menor afinidade entre os compostos analisados, dado que não houve variação significativa da fluorescência com o aumento da concentração de lapachol. A hematoxilina e o ácido clorogênico possuem estabilidades intermediárias.

4.2 Ensaio com desferriastecromo, desferricoprogênio, piridoxatina e oosporeína

4.2.1 Estudo da estabilidade dos complexos frente à calceína

A desferrioxamina (DFO), sendo um controle padrão ouro de quelação de ferro, apresenta constante de formação metal-ligante $\log K_{ML} = 30$ [48], e portanto observa-se que sua competição pelo ferro com o complexo CAFe é praticamente estequiométrica, atingindo os 100% quando $[DFO] = [CAFe] = 2 \mu M$ (Figura 27).

Todos os outros quelantes analisados também exibiram recuperação de fluorescência (Figura 27), isto é, liberação da calceína livre a partir da coordenação dos quelante com o ferro, entretanto tiveram que ser usadas concentrações maiores para se obter um efeito semelhante ao da DFO.

Os complexos com desferriastecromo e piridoxatina, cujas razões molares quelante:ferro é igual a 3:1, mostraram perfis semelhantes, atingindo máximo de saturação a concentrações maiores do que p. ex. a DFO ou o outro quelante tris-hidroxamato, o desferricoprogênio. Hidroxamatos lineares como desferricoprogênio e DFO possuem pK_{a1} em torno de 9, enquanto que nos aromáticos (piridoxatina) esse valor cai para a faixa de 6, e nos derivados de pirazinona (desferriastercomo) cai para entre 4 e 5 pela maior extensão do efeito deslocalizador de carga do anel aromático para o anel aromático hetero-substituído (Figura 28) [49]. Apesar de que a maior acidez destes compostos favoreça a quelação com Fe^{3+} em meio fisiológico devido à quase total desprotonação dos ambientes quelantes, parece que o efeito quelato promovido pelos

ligantes hexacoordenantes seja mais importante ao exigir menores concentrações de quelante para a competição com calceína, mesmo tendo valores de pKa maiores. Mas, de qualquer forma, todos são excelentes quelantes que poderiam, segundo este critério, ser usados clinicamente.

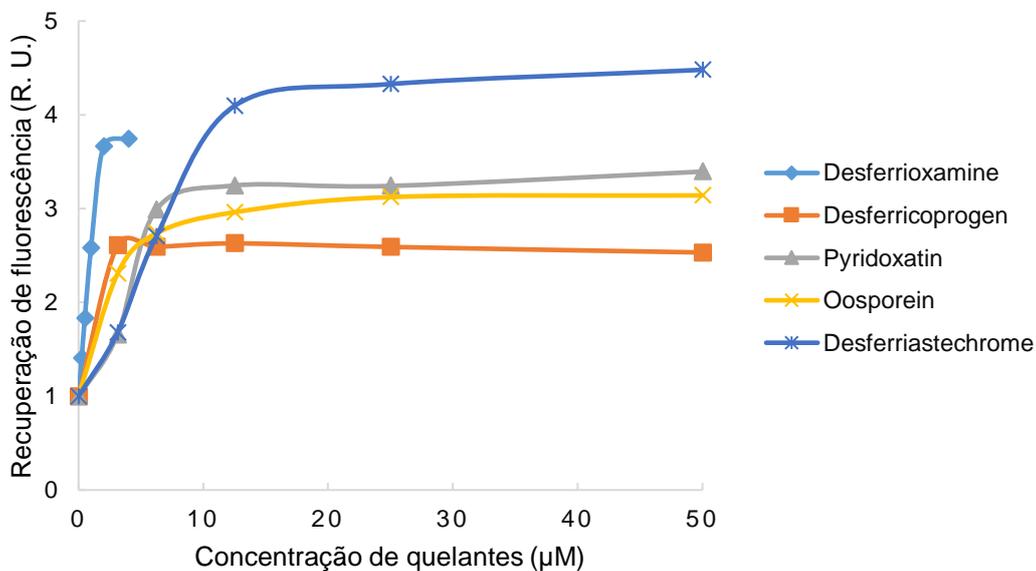


Figura 27. Capacidade quelante através de recuperação de fluorescência da calceína.

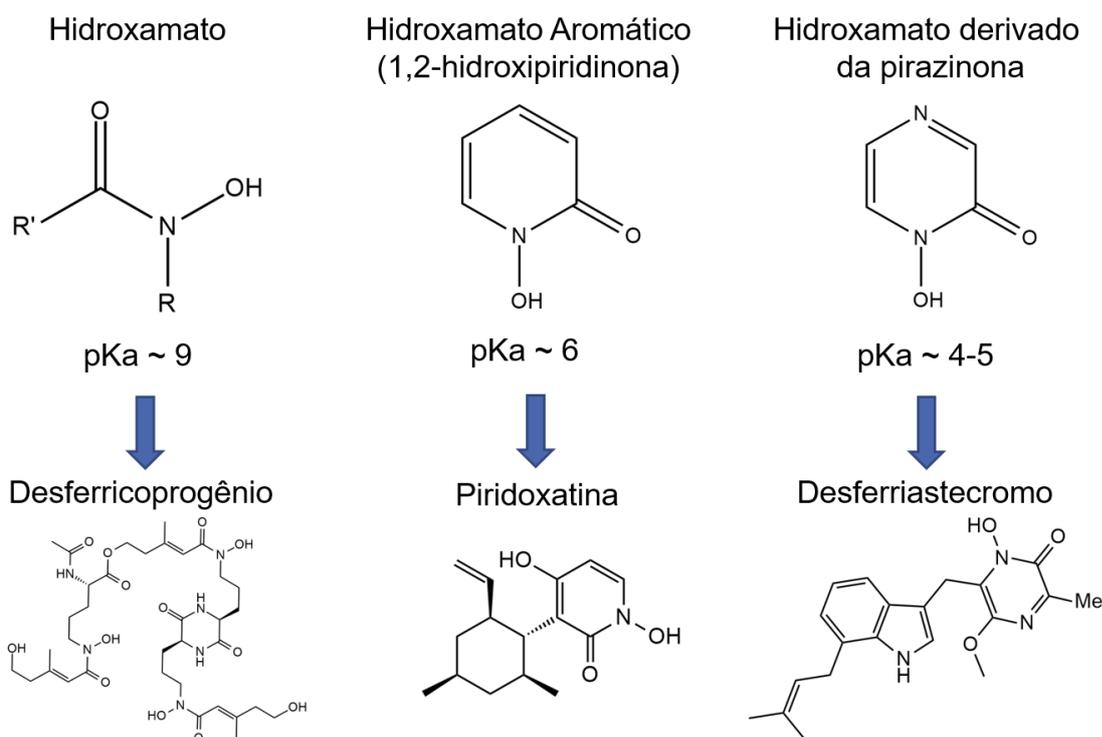


Figura 28. Quelantes e seus análogos

A piridoxatina é um membro da classe das hidroxipiridinonas (HPOs). Corresponde a uma 1,4-di-hidroxipiridin-2-ona contendo um substituinte adicional 6-etenil-2,4-dimetilciclo-hexil na posição 3.

As hidroxipiridinonas podem ser divididas em três classes: 1,2-hidroxipiridinonas (do qual a piridoxatina é representante), 3,2-hidroxipiridinonas e 3,4-hidroxipiridinonas (a qual pertence a deferiprona, composto já utilizado no tratamento da sobrecarga de ferro) [50] (Figura 29). HPOs combinam características dos grupos hidroxamato e catecolato, formando anéis de cinco membros nos quais o metal está ligado a dois oxigênios vizinhos. Para que isto aconteça, é necessário que o grupo hidroxila esteja desprotonado. As diferenças entre as posições relativas dos grupos hidroxila e cetona influenciam em diferentes valores de pKa. Dentre estes três tipos, as 3,4-hidroxipiridinonas são as mais estudadas por possuírem os maiores valores de pFe^{3+} ¹ devido a menor delocalização do par de elétrons não-ligantes do nitrogênio sobre o anel e, por conseguinte, maior densidade de carga sobre os oxigênios (Figura 30).

¹ $pFe^{3+} = -\log [Fe^{3+}]$ quando $[Fe^{3+}]_{total} = 10^{-6}$ M e $[ligante]_{total} = 10^{-5}$ M a pH 7,4.

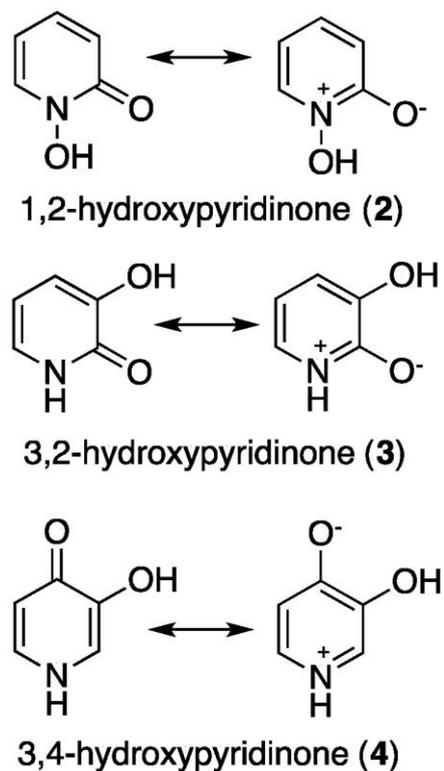


Figura 29. Três distintas classes de hidroxipiridinonas. [50]

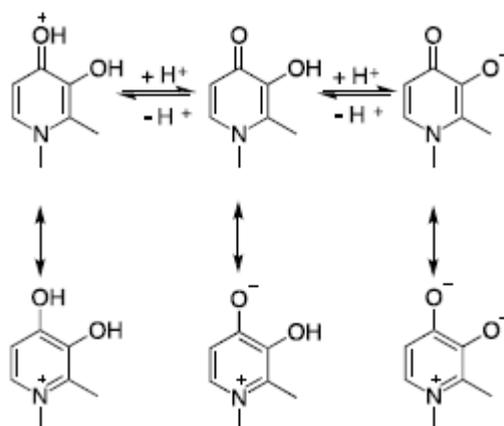


Figura 30. Estruturas de ressonância da deferiprona (representante da classe das 3,4-hidroxipiridinonas) a diferentes estados de protonação [50]

4.2.2 Quantificação da atividade antioxidante mediada por ferro

A capacidade dos quelantes inibirem a auto-oxidação do ascorbato mediada por íons Fe(III) é uma das melhores formas de avaliar o potencial de uma molécula

numa terapia de quelação de sobrecarga de ferro. Essa ação é convenientemente testada em microplacas de 96 poços através de cinética de fluorescência (velocidade de oxidação da sonda dihidrorodamina, DHR) num sistema de alto desempenho [6].

Por outro lado, o desferricoprogênio, além de exibir certa recuperação de fluorescência, revelou capacidade antioxidante similar ao DFO (Figura 31). Tais resultados sugerem a importância da estrutura destes quelantes. Ambos são tris-hidroxi-aminatos, sendo capazes de formar um complexo hexacoordenado com o ferro, estabilizado pelo efeito quelato. Ligantes bidentados como a oosporeína precisam de concentrações mais elevadas para obter o mesmo resultado.

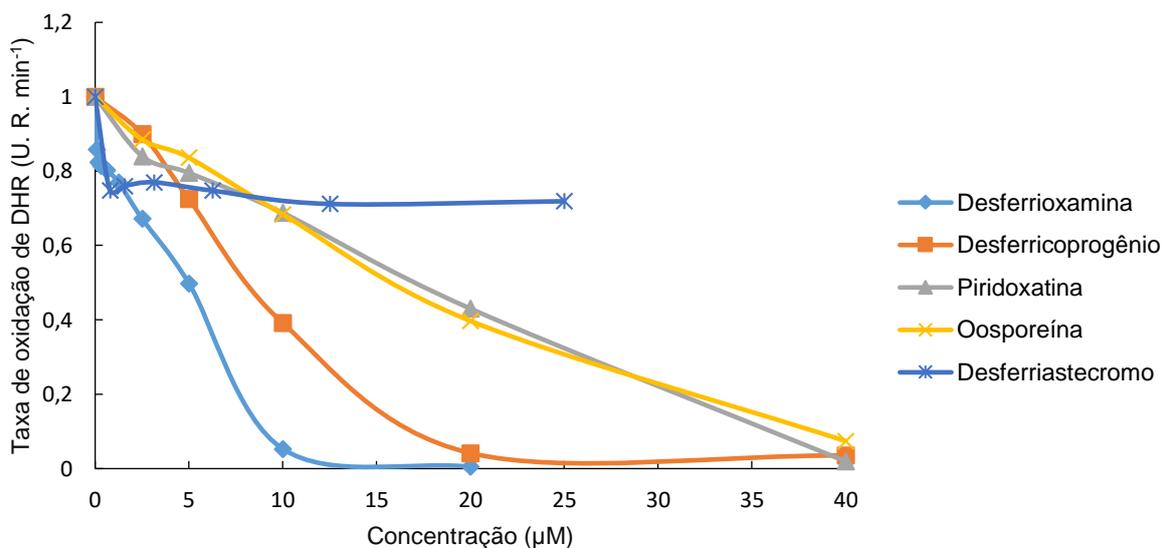


Figura 31. Ensaio antioxidante com a sonda DHR.

Entretanto, curiosamente, o desferriastecromo não apresenta capacidade significativa antioxidante, embora tenhamos visto anteriormente que esse ligante é capaz de ligar ferro nas condições de estudo. Esse efeito pode ser devido ao fato de que o desferriastecromo apresenta um ambiente indólico substituído muito volumoso, o que pode dificultar a formação em soluções diluídas do complexo 1:3. Caso números de coordenação menores ocorram, apesar da ligação estável, o complexo ainda será capaz de realizar reações pró-oxidantes devido aos sítios de coordenação disponíveis para a catálise. Esse efeito é marcadamente presente em outros complexos estáveis de Fe(III), como p. ex. o edetato férrico [11].

4.2.3 Remoção de metal em células sobrecarregadas com ferro

Nos ensaios de permeabilidade celular apenas o desferriastecromo e a piridoxatina apresentaram recuperação de fluorescência significativa tanto na linhagem HeLa quanto na HepG2 (Figuras 32 e 33), provavelmente devido à maior hidrofobicidade dos substituintes próximos do ambiente de coordenação hidroxamato. Já o desferriocprogênio, um tris-hidroxamato linear (como a DFO), e a oosporeína, densamente carregada a pH fisiológico, não demonstraram resultados que diferissem do controle.

Como neste caso o objetivo é a coordenação com o ferro adicionado ao meio intracelular é possível que exista alguma seletividade para a entrada destes compostos na membrana celular. Ambas as moléculas são hidroxipiridinonas, e quando desprotonadas apresentam uma estrutura de ressonância aromática zwitteriônica, na qual há um acúmulo de carga eletrônica no oxigênio da carbonila, contribuindo para maior estabilidade do complexo com ferro [51]. Logo, nesse modelo celular, assim como na linhagem HeLa, tanto desferriastecromo quanto piridoxatina mostraram capacidade de penetrar na célula e complexar com o ferro retido no citoplasma.

É importante lembrar que este ensaio não indica a quantidade total de ferro livre presente na célula. A calceína formada no citosol é hidrofílica, a qual não consegue facilmente escapar por permeação das membranas. Assim, apesar de se manter confinada no citosol, não alcança outros compartimentos em que se sabe que há um relativo acúmulo de ferro livre, como os lisossomos. Além disso, como a complexação entre calceína e ferro é dependente do pH, ela não ocorrerá em compartimentos com pH consideravelmente inferior ao citosólico (no caso, os lisossomos possuem pH entre 4-5) [52].

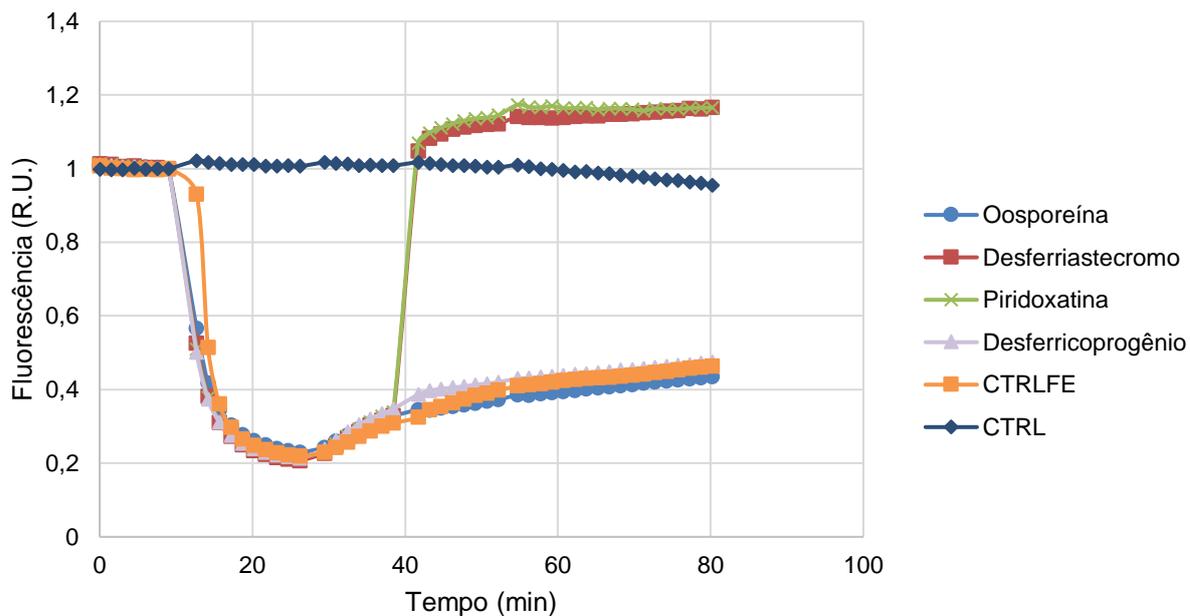


Figura 32. Permeabilidade e recuperação de fluorescência em células HeLa.

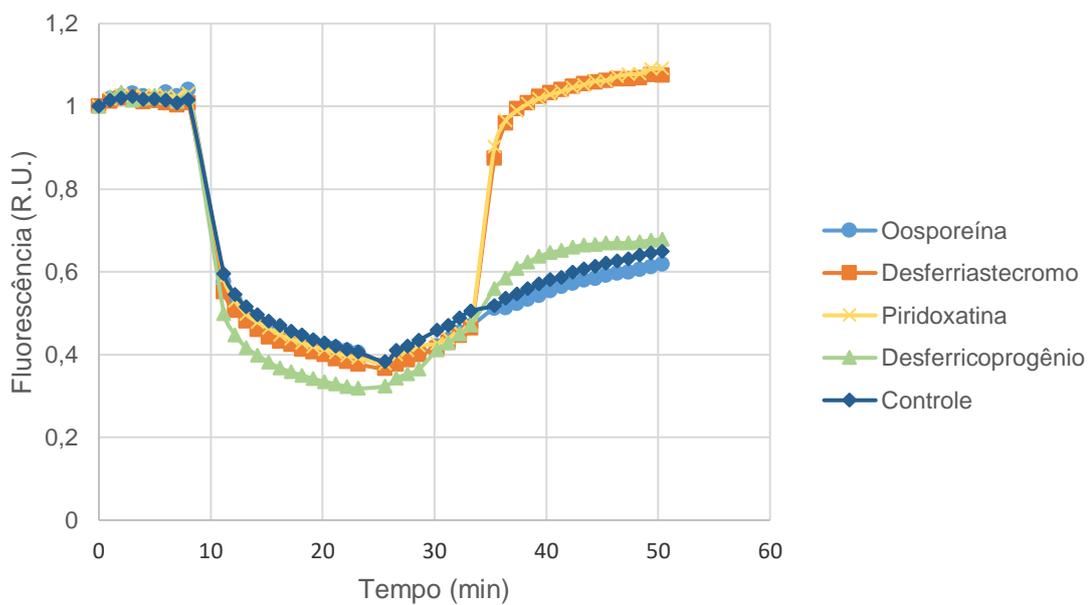


Figura 33. Permeabilidade e recuperação de fluorescência em células HepG2.

4.2.4 Atividade antioxidante intracelular

No teste antioxidante intracelular, desta vez com a sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), novamente a piridoxatina apresentou os melhores resultados, reduzindo em cerca de 50% a taxa de oxidação da sonda na linhagem HeLa e 30% na linhagem HepG2 (Figura 34). Nota-se que, para as duas linhagens testadas, a piridoxatina é o composto que possui melhor permeabilidade celular e ação antioxidante.

Novamente o desferriastercromo não apresentou atividade antioxidante. Desta vez, a atividade antioxidante esperada poderia ser através do sequestro de ferro do composto Fe(HQ), ou pelo sacrifício da porção orgânica oxidável de cada quelante. Desferriastercromo poderia em tese sequestrar ferro de HQ, mas possivelmente com os mesmos problemas discutidos acima de não-fechamento da esfera de coordenação, o que faria com que o complexo resultante seguisse redox-ativo. Alternativamente, note-se que a piridoxatina contém um ambiente semelhante a um fenol, que é oxidável, e esse ambiente não se encontra no desferriastercromo.

Portanto, quelação eficiente a ferro e/ou sacrifício da molécula poderiam ser explicações para o melhor desempenho da piridoxatina em relação ao desferriastercromo.

Desferricoprogênio, não sendo permeável, coerentemente não apresentou atividade antioxidante intracelular. Oosporeína, embora não tenha aparecido permeável no experimento anterior, curiosamente mostrou-se aqui antioxidante intracelular. Como os sistemas de entrega de ferro foram distintos em cada caso (CAFe e Fe(HQ)), é possível que nas condições do experimento de permeabilidade a oosporeína tenha tido acesso à célula, mas em concentração insuficiente para competir com a calceína. Teria sido o caso, então, de um falso negativo de permeabilidade. Sendo ela dotada de rico ambiente quinolínico, como de outros produtos naturais, não é improvável que

tenha sido antioxidante caso estivesse dentro da célula. Então, talvez, seja antioxidante mas não por sequestro de ferro (ou, ao menos, do sequestro de ferro de complexos de alta afinidade).

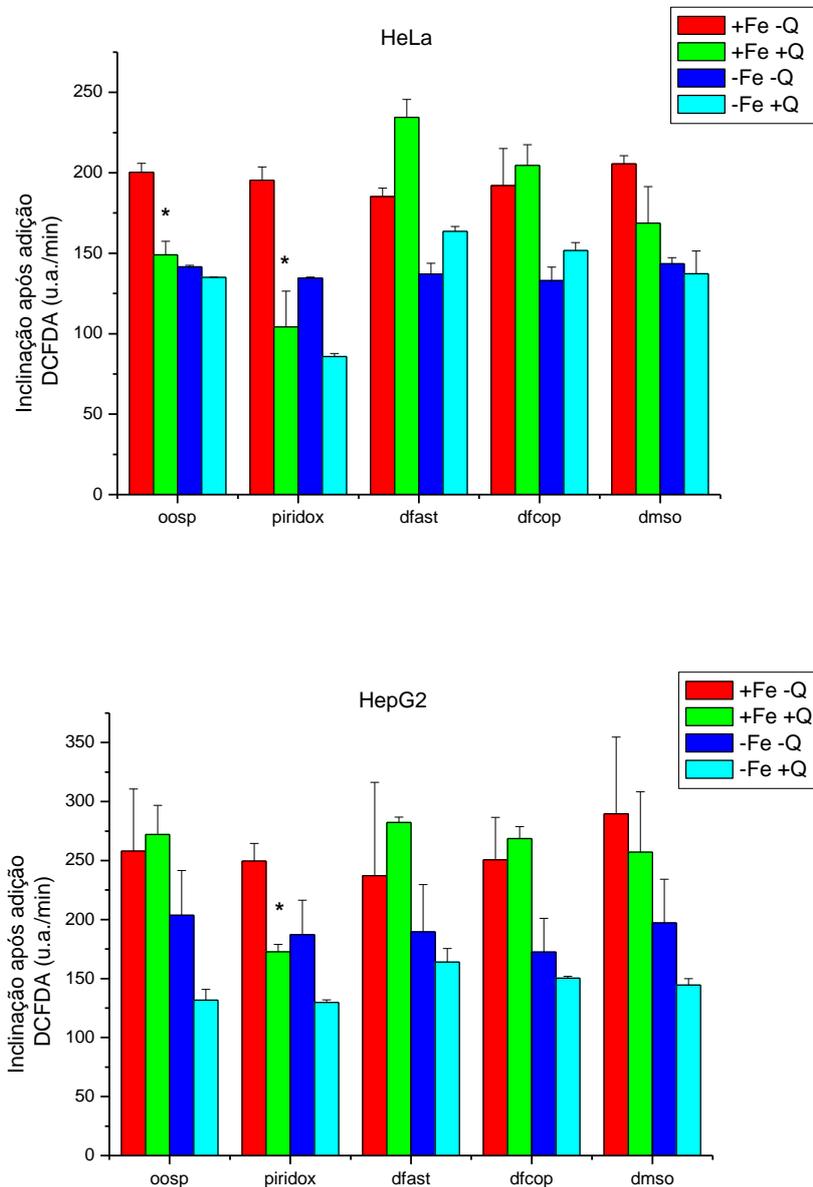


Figura 34. Ensaio antioxidante intracelular nas linhagens HeLa e HepG2. Os quelantes Q estavam sempre a 20 μ M. DMSO é o controle negativo. * $P < 0.05$ em relação ao controle com ferro mas sem quelante; foi feita a comparação apenas para os pares “+Fe-Q” e “+Fe+Q”.

A oosporeína foi identificada inicialmente no pigmento do fungo *Oospora colorans* [53], e apresenta grande atividade antimicrobiana [54, 55] porém importante toxicidade para organismos superiores [56, 57]. Embora seu complexo com ferro não tenha sido descrito, a oosporeína é uma detoxificadora de metais não-essenciais como alumínio e chumbo [58, 59], o que sugere uma possível atividade protetora aos organismos que vivem em territórios contaminados. Também poderia ser um quelante interessante para fins de biorremediação.

Em relação ao desferriastercromo, poucas referências existem sobre sua obtenção e capacidade de ligação ao ferro. Foi inicialmente identificado em 1980 como seu complexo férrico (1:3 metal:ligante) durante uma prospecção pelos metabólitos de *Aspergillus terreus*. A forma demetalada só pôde ser obtida após a redução a Fe(II), sem que quelantes como a 8-hidroxiquinolina tivessem efeito, indicando a grande estabilidade do complexo. A partir daí, sua estrutura pôde ser determinada [60]. Em *A. fumigatus*, uma variante desse complexo férrico foi identificada, o hexahidroastercromo [61].

O desferricoprogênio utilizado nesta dissertação foi um metabólito dos fungos *Talaromyces* sp, cuja associação a ferro(III) foi estudada através da reação com o complexo CAFE [62]. Assim como o desferriastercromo, foi isolado pela primeira vez nos anos 1970 na forma do complexo férrico (coprogênio), do fungo *Penicillium citrinum*. E, semelhantemente à desferrioxamina, o desferricoprogênio foi reconhecido como um tris-hidroxamato linear, capaz de formar complexos 1:1 com o metal [63]. Também ocorre em exudatos de outras espécies, como o fungo *Epicoccum purpurascens* [64].

A piridoxatina já é uma substância mais conhecida, tendo sido isolada a partir de culturas de fungos *Acremonium* sp, onde foi reconhecida como um sequestrador de radicais livres [65]. No nosso caso, foi isolada como o principal metabólito de fungos *Chaunopycnis* sp e reconhecida também como um sequestrador de ferro eficiente com uma constante de afinidade aparente comparável à da deferiprona [66]. Forma complexos com vários íons metálicos, sendo que um destes, Cu(piridoxatina)₂, foi essencial na resolução da estrutura do ligante [67].

Nossos resultados colocam o quelante piridoxatina (e, talvez, a oosporeína) no rol dos quelantes antioxidantes permeáveis às células. A esse grupo pertencem quelantes de alta afinidade como o SIH (salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone, Figura

35) [68, 69], que foi reportado inclusive como um carregador de ferro para reticulócitos [70], e seu análogo PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone, Figura 34) [71]. Os novos quelantes ativos via oral, deferiprona [72] e deferasirox [73], também apresentam a mesma capacidade. Finalmente, nosso grupo já relatou quelantes naturais como a quercetina [21] ou artificiais como a desferrioxamina-cafeína [16] com capacidade semelhante.

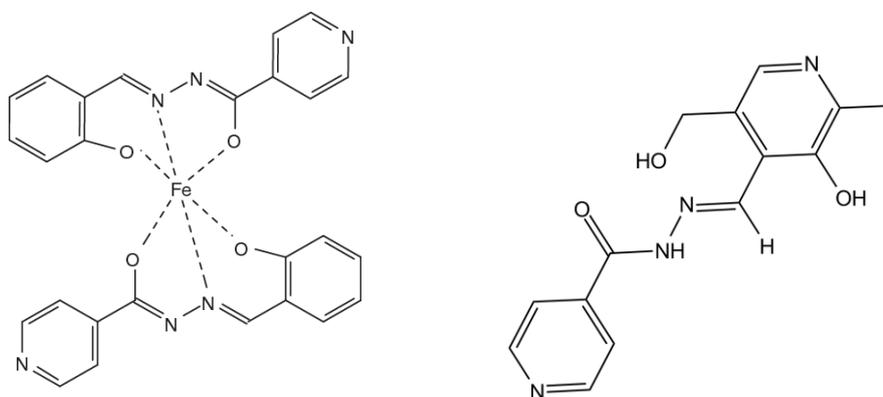


Figura 35. Novos quelantes: SIH (esquerda, indicando os sítios de coordenação com ferro) e PIH (direita).

4.2.5 Viabilidade celular

Uma limitação deste teste é que o MTT pode reagir a formazan diretamente em contato com a amostra, caso esta tenha atividade redutora, como antioxidantes e polifenóis. Outro fator que pode ocasionar erros são as sucessivas etapas de lavagem dos poços, nas quais as células podem se desprender da microplaca [74]. Além disso, aumentos de viabilidade após um tratamento também podem significar que a célula engaja sua maquinaria metabólica para eliminar um agressor externo, e um olhar descuidado sobre o experimento poderia concluir que o tratamento está sendo benéfico para a célula.

No nosso experimento, as células foram tratadas com 1 μL de quelantes ou controles a 1 mM, perfazendo uma concentração final de 10 μM . Portanto, a concentração de DMSO nunca passou de 1%.

A viabilidade de células HeLa perante tal dose única dos quelantes em estudo é apresentada na Figura 36. Percebe-se que os quelantes são todos significativamente menos tóxicos que a cisplatina, padrão de atividade antitumoral, embora os hidroxamatos cíclicos pareçam mais tóxicos do que os demais quelantes.

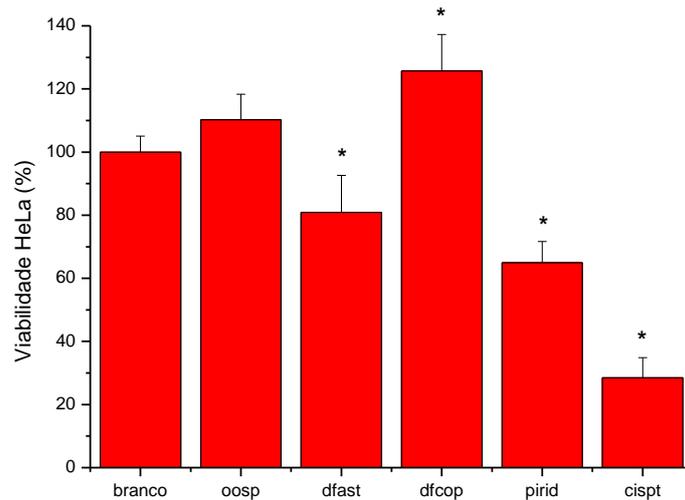


Figura 36. Viabilidade celular de células HeLa avaliadas pela formação de formazan (a $\lambda=570$ nm) em função dos tratamentos com quelantes e com cisplatina (10 μ M).

Essas observações são consistentes com dados da literatura. A piridoxatina foi inicialmente reconhecida como um potente inibidor de metaloproteínas de matriz (que, por sinal, são proteínas dependentes de Ca e que contêm Zn) e citotóxica contra diversas cepas tumorais [75]. Os mesmos valores de IC50 na faixa de 0,3 a 0,4 μ M para a piridoxatina foram em seguida observados frente às linhagens tumorais SW620 (adenocarcinoma colorretal humano), NCI-H460 (carcinomas de células pulmonares não pequenas) e KB3-1 (carcinoma cervical humano) [66]. Para HeLa, sua IC50 foi determinada como 1,0 μ g/mL (3,8 μ M [65]), o que é coerente com nossas observações (Figura 36).

5. Conclusões

Em relação aos compostos hematoxilina, hemateína, lapachol e ácido clorogênico, foi possível verificar fotometricamente a sua complexação com ferro, em solução de água:DMSO, bem como analisar a estabilidade dos quelantes frente à complexação com ferro através de estudos fluorimétricos.

Para os compostos desferriastecromo, desferricoprogênio, piridoxarina e oosporeína, a piridoxatina é o composto que possui melhor permeabilidade celular e ação antioxidante em meio intracelular, sendo este um forte candidato a possível fármaco para a terapia de remoção de ferro em sobrecarga.

A partir destes resultados, tem-se que uma boa perspectiva para os próximos passos. O grupo de pesquisa poderá avançar com a caracterização e propriedades dos complexos entre ferro e produtos naturais, através de, por exemplo, testes com linhagens de células saudáveis e a eficiência da transferência de ferro entre o complexo e a transferrina transportadora.

6. Bibliografia

1. Mair, S.M. and G. Weiss, *New pharmacological concepts for the treatment of iron overload disorders*. *Curr Med Chem*, 2009. **16**(5): p. 576-90.
2. Andrews, N.C., *Iron homeostasis: insights from genetics and animal models*. *Nat Rev Genet*, 2000. **1**(3): p. 208-217.
3. Hider, R.C. and Y.M. Ma, *The Properties of Therapeutically Useful Iron Chelators*, in *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*, G.J. Anderson and G.D. McLaren, Editors. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 567-590.
4. Pantopoulos, K., et al., *Mechanisms of mammalian iron homeostasis*. *Biochemistry*, 2012. **51**(29): p. 5705-5724.
5. Lushchak, V.I., *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. *Chemico-Biological Interactions*, 2014. **224**: p. 164-175.
6. Hider, R.C. and X. Kong, *Iron speciation in the cytosol: An overview*. *Dalton Transactions*, 2013. **42**(9): p. 3220-3229.
7. Koppenol, W.H. and R.H. Hider, *Iron and redox cycling. Do's and don'ts*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019. **133**: p. 3-10.
8. Shvartsman, M., et al., *Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(4): p. C1383-94.
9. Breuer, W., C. Hershko, and Z.I. Cabantchik, *The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism*. *Transfus Sci*, 2000. **23**(3): p. 185-92.
10. Evans, R.W., et al., *Nature of non-transferrin-bound iron: Studies on iron citrate complexes and thalassemic sera*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008. **13**(1): p. 57-74.
11. Esposito, B.P., et al., *Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2670-2677.
12. Choudhry, V.P., *Thalassemia Minor and Major: Current Management*. *The Indian Journal of Pediatrics*, 2017. **84**(8): p. 607-611.
13. Hicken, B.L., D.C. Tucker, and J.C. Barton, *Patient compliance with phlebotomy therapy for iron overload associated with hemochromatosis*. *American Journal Of Gastroenterology*, 2003. **98**: p. 2072.

14. Barton, J.C., et al., *Handbook of Iron Overload Disorders*. 2010, Cambridge: Cambridge University Press.
15. Ohnishi, H., *Side effects of phlebotomy: pathophysiology, diagnosis, treatment and prophylaxis*. Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology, 2005. **53**(10): p. 904-910.
16. Alta, E.C., et al., *Desferrioxamine-caffeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload*. Biometals, 2014. **27**(6): p. 1351-60.
17. Mobarra, N., et al., *A review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes*. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research, 2016. **10**(4): p. 239-247.
18. Kwiatkowski, J.L., *Real-world use of iron chelators*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 451-8.
19. Kontoghiorghes, G.J., *A record number of fatalities in many categories of patients treated with deferasirox: loopholes in regulatory and marketing procedures undermine patient safety and misguide public funds? Expert Opinion on Drug Safety*, 2013. **12**(5): p. 605-609.
20. Kontoghiorghes, G.J., *Turning a blind eye to deferasirox's toxicity? The Lancet*, 2013. **381**(9873): p. 1183-1184.
21. Baccan, M.M., et al., *Quercetin as a shuttle for labile iron*. J. Inorg. Biochem., 2012. **107**(1): p. 34-39.
22. Liu, Z.D. and R.C. Hider, *Design of iron chelators with therapeutic application*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**(1-2): p. 151-171.
23. Enyedy, É.A., I. Pócsi, and E. Farkas, *Complexation of desferricoprogen with trivalent Fe, Al, Ga, In and divalent Fe, Ni, Cu, Zn metal ions: Effects of the linking chain structure on the metal binding ability of hydroxamate based siderophores*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004. **98**(11): p. 1957-1966.
24. Shang, Z., et al., *New PKS-NRPS tetramic acids and pyridinone from an Australian marine-derived fungus, Chaunopycnis sp.* Org. Biomol. Chem., 2015. **13**(28): p. 7795-7802.
25. Seger, C., et al., *Physicochemical properties of Oosporein, the major secreted metabolite of the entomopathogenic fungus Beauveria brongniartii*. Helv. Chim. Acta, 2005. **88**(4): p. 802-810.

26. Nagaoka, T., et al., *Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against Phytophthora infestans*. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 2004. **59**(3-4): p. 302-304.
27. Taniguchi, M., et al., *Antimicrobial and respiration- inhibitory activities of oosporein*. Agricultural and Biological Chemistry, 1984. **48**(4): p. 1065-1067.
28. Scott Obach, R. and A.S. Kalgutkar, *1.15 - Reactive Electrophiles and Metabolic Activation*, in *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, C.A. McQueen, Editor. 2010, Elsevier: Oxford. p. 309-347.
29. Donnelly, D.M.X. and G. Boland, *Neoflavonoids*, in *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. 2017. p. 239-258.
30. Bohm, B.A., *Introduction to flavonoids*. 1998, Amsterdam: Harwood Academic Publishers. xi + 503 pp.
31. Cooksey, C., *Hematoxylin and related compounds an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications*. Biotechnic and Histochemistry, 2010. **85**(1): p. 65-82.
32. de Oliveira, L.F.C., et al., *Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil*. Vibrational Spectroscopy, 2002. **28**(2): p. 243-249.
33. Marshall, P.N. and R.W. Horobin, *The oxidation products of Haematoxylin and their role in biological staining*. The Histochemical Journal, 1972. **4**(6): p. 493-503.
34. Kim, D.S., et al., *NMR assignment of brazilein*. Phytochemistry, 1997. **46**(1): p. 177-178.
35. Feather, P., E. Inman, and A.T. Peters, *Haematein and its Derivatives*. Journal of the Society of Dyers and Colourists, 1962. **78**(7): p. 321-326.
36. Romagnoli, M., et al., *Wood colour in Lapacho (Tabebuia serratifolia): Chemical composition and industrial implications*. Wood Science and Technology, 2013. **47**(4): p. 701-716.
37. Hussain, H., et al., *Lapachol: An overview*. Arkivoc, 2007. **2007**(2): p. 145-171.
38. Robards, K., et al., *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry, 1999. **66**(4): p. 401-436.
39. Olthof, M.R., P.C.H. Hollman, and M.B. Katan, *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. Journal of Nutrition, 2001. **131**(1): p. 66-71.

40. Espósito, B.P., et al., *A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids*. Analytical Biochemistry, 2002. **304**(1): p. 1-18.
41. Epsztejn, S., et al., *Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells*. Analytical Biochemistry, 1997. **248**(1): p. 31-40.
42. Shvartsman, M., E. Fibach, and Z.I. Cabantchik, *Transferrin-iron routing to the cytosol and mitochondria as studied by live and real-time fluorescence*. Biochemical Journal, 2010. **429**(1): p. 185.
43. Sohn, Y.-S., et al., *Rescuing iron-overloaded macrophages by conservative relocation of the accumulated metal*. British Journal of Pharmacology, 2011. **164**(2b): p. 406-418.
44. Präbst, K., et al., *Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin*, in *Methods in Molecular Biology*. 2017. p. 1-17.
45. Dufresne, A., et al., *Chemical and spectral studies of the products of some 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones with iron*. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 1973. **35**(3): p. 789-797.
46. Ravelo, A.G., A. Estévez-braun, and E. Pérez-sacau, *The chemistry and biology of lapachol and related natural products α and β -lapachones*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Atta ur, Editor. 2003, Elsevier. p. 719-760.
47. Hynes, M.J. and M. O'Coinceanainn, *The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(8): p. 1457-64.
48. Poreddy, A.R., et al., *Hydroxamate-based iron chelators: combinatorial syntheses of desferrioxamine B analogues and evaluation of binding affinities*. J Comb Chem, 2004. **6**(2): p. 239-54.
49. Raymond, K.N., *Biomimetic metal encapsulation*. Coordination Chemistry Reviews, 1990. **105**(C): p. 135-153.
50. Cusnir, R., et al., *Hydroxypyridinone Chelators: From Iron Scavenging to Radiopharmaceuticals for PET Imaging with Gallium-68*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(1): p. 116.
51. Scarrow, R.C., et al., *Ferric Ion Sequestering Agents. 13. Synthesis, Structures, and Thermodynamics of Complexation of Cobalt(III) and Iron(III) Tris Complexes of Several Chelating Hydroxypyridinones*. Inorganic Chemistry, 1985. **24**(6): p. 954-967.

52. Tenopoulou, M., et al., *Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it?* The Biochemical journal, 2007. **403**(2): p. 261-266.
53. Kogl, F. and G.C. van Wessem, *Analysis concerning pigments of fungi XIV Concerning oosporein, the pigment of Oospora colorans van Beyma*. Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas, 1944. **63**: p. 5-24.
54. Nagaoka, T., et al., *Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against Phytophthora infestans*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 2004. **59**(3-4): p. 302-304.
55. Terry, B.J., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein*. J Antibiot (Tokyo), 1992. **45**(2): p. 286-8.
56. Brown, T.P., et al., *Microscopic and ultrastructural renal pathology of oosporein-induced toxicosis in broiler chicks*. Avian Dis, 1987. **31**(4): p. 868-77.
57. Ramesha, A., et al., *Cytotoxic effects of oosporein isolated from endophytic fungus Cochliobolus kusanoi*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.
58. da Silva, F.M.R., et al., *Growth of the fungus Chaetomium aureum in the presence of lead: implications in bioremediation*. Environmental Earth Sciences, 2018. **77**(7).
59. Haruma, T., et al., *Root-endophytic Chaetomium cupreum chemically enhances aluminium tolerance in Miscanthus sinensis via increasing the aluminium detoxicants, chlorogenic acid and oosporein*. Plos One, 2019. **14**(2).
60. Arai, K., et al., *Metabolic Products of Aspergillus terreus. VII. Astechrome : an Iron-containing Metabolite of the Strain IFO 6123*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1981. **29**(6): p. 1510-1517.
61. Yin, W.B., et al., *A Nonribosomal Peptide Synthetase-Derived Iron(III) Complex from the Pathogenic Fungus Aspergillus fumigatus*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(6): p. 2064-2067.
62. Kalansuriya, P., et al., *Talarazines A-E: Noncytotoxic Iron(III) Chelators from an Australian Mud Dauber Wasp-Associated Fungus, Talaromyces sp (CMB-W045)*. Journal of Natural Products, 2017. **80**(3): p. 609-615.
63. Keller-Schierlein, W. and H. Diekmann, *Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 85. Zur Konstitution des Coprogens*. Helvetica Chimica Acta, 1970. **53**(8): p. 2035-2044.

64. Frederick, C.B., M.D. Bentley, and W. Shive, *Structure of triornicin, a new siderophore*. *Biochemistry*, 1981. **20**(9): p. 2436-2438.
65. Teshima, Y., et al., *Isolation and structural elucidation of pyridoxatin, a free radical scavenger of microbial origin*. *The Journal of Antibiotics*, 1991. **44**(6): p. 685-687.
66. Shang, Z., et al., *New PKS-NRPS tetramic acids and pyridinone from an Australian marine-derived fungus, Chaunopycnis sp.* *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015. **13**(28): p. 7795-7802.
67. Du, L., et al., *Crowdsourcing Natural Products Discovery to Access Uncharted Dimensions of Fungal Metabolite Diversity*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014. **53**(3): p. 804-809.
68. Konijn, A.M., et al., *The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 2128-2134.
69. Murphy, T.B., et al., *Syntheses of iron(III) aroyl hydrazones containing pyridoxal and salicylaldehyde. The crystal and molecular structure of two iron(III)-pyridoxal isonicotinoyl hydrazone complexes*. *Inorganica Chimica Acta*, 1985. **108**(3): p. 183-194.
70. Garrick, L.M., et al., *Ferric-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone, a synthetic iron chelate, alleviates defective iron utilization by reticulocytes of the Belgrade rat*. *J Cell Physiol*, 1991. **146**(3): p. 460-5.
71. Link, G., et al., *Effects of combined chelation treatment with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs and deferoxamine in hypertransfused rats and in iron-loaded rat heart cells*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 4172-4179.
72. Link, G., et al., *Exploring the "iron shuttle" hypothesis in chelation therapy: Effects of combined deferoxamine and deferiprone treatment in hypertransfused rats with labeled iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2001. **138**(2): p. 130-138.
73. Hershko, C., et al., *ICL670A: a new synthetic oral chelator: evaluation in hypertransfused rats with selective radioiron probes of hepatocellular and reticuloendothelial iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture*. *Blood*, 2001. **97**(4): p. 1115-1122.
74. van Tonder, A., A.M. Joubert, and A.D. Cromarty, *Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when*

compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC research notes, 2015. **8**: p. 47-47.

75. Lee, H.J., et al., *Pyridoxatin, an inhibitor of gelatinase A with cytotoxic activity.* Journal of Microbiology and Biotechnology, 1996. **6**(6): p. 445-450.

7. Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Gabriel Souto da Silva

Data de Nascimento: 19/07/1992

Poá – SP

FORMAÇÃO

02/2010 – 06/2015 Bacharelado em Química pela Universidade de São Paulo, USP – São Paulo, SP

02/2007 – 12/2009 Ensino Médio e Técnico em Informática Industrial pela Escola Técnica Estadual Presidente Vargas – Mogi das Cruzes, SP

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

02/2017 – 07/2017 Monitor da disciplina Química Geral e Inorgânica Básica para alunos do curso bacharelado em Oceanografia, a cargo da Prof. Dra. Denise de Oliveira Silva

02/2016 – 07/2016 Monitor da disciplina Química Básica para alunos do curso licenciatura em Geociências e Educação Ambiental, a cargo da Prof. Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas

02/2015 – 12/2015 Liceu de Artes e Ofícios de São Paulo

Cargo: Estagiário – Monitor Plantonista

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

02/2014 XVIII Disciplina Intersemestral - Grupo Químicas Integradas (G6) - Biocombustíveis: Fontes de energia renováveis para um mundo sustentável, UNESP Araraquara

01/2014 XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal, UFRJ.

08/2012 – 06/2013 Intercâmbio Acadêmico na Universidad Autónoma de Madrid, UAM – Madrid, Espanha

APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

07/2017 – 46° Congresso Mundial em Química – IUPAC 2017. Pôster: “Prospection of hidroxamate- and quinone-type siderophores for iron overload chelation therapy”