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

ANDERSON ARNDT

Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de
complexos de manganês(III) em *Danio rerio*

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/12/2009

ANDERSON ARNDT

Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de
complexos de manganês(III) em *Danio rerio*

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

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo
2009

Anderson Arndt

Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de complexos de manganês(III) em *Danio rerio*.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus familiares que me apoiaram em todo tempo.

A todos meus amigos espalhados por todos os cantos que nunca me deixaram desanimar nem por um segundo e proporcionaram ótimos momentos de discussões, conversas, desabafos e distrações, sempre me trazendo grande alegria.

Ao grande amigo que ganhei durante este mestrado, e também orientador (no sentido estrito da palavra), Prof. Dr. Breno Pannia Espósito.

A todos os colegas do Laboratório de Bioinorgânica Ambiental e Laboratório de Nanomateriais e Catálise.

À Prof^a. Dr^a. Maria Inês Borella, do Laboratório de Endocrinologia de Peixes – ICB/USP, e aos seus alunos que me ajudaram por diversas vezes, além do técnico de laboratório Cruz Alberto Mendoza Rigonati.

Aos professores do IQ/USP que me permitiram usar os equipamentos de vossos laboratórios.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio na aquisição de bens e reagentes ao laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/USP.

*“Pois onde estiver o seu tesouro,
aí também estará o seu coração.”*

Evang. de Mateus, cap.6, vers. 21

RESUMO

Arndt, A. **Síntese, caracterização e estudo da ação neurotóxica de complexos de manganês(III) em *Danio rerio***. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O manganês (Mn) é um elemento químico abundante na natureza, principalmente em minérios e presente também em alimentos e na água. É o cofator de enzimas importantes, como a superóxido dismutase mitocondrial. Entretanto, minerais e outras pessoas expostas a produtos manufaturados de Mn podem apresentar uma concentração excessiva desse metal no cérebro, adquirindo uma desordem neurológica similar ao mal de Parkinson conhecida por manganismo. Basicamente a neurotoxicidade do Mn pode estar associada com os vários estados de oxidação que ele pode alcançar, gerando espécies reativas de oxigênio durante a interconversão dessas espécies. Dessa forma, neste trabalho sintetizamos e avaliamos as propriedades pró-oxidantes e neurotóxicas de complexos de Mn(III) com desferrioxamina, [Mn(dfb)]; acetohidroxamato, [Mn(aha)₃]; citrato, [Mn(cit)]; cloro-salen, EUK 8; e acetato-salen, EUK 108. Tais compostos são propostos como miméticos da SOD e/ou catalase, entretanto podem apresentar atividade pró-oxidante. Estes complexos foram caracterizados espectrofotometricamente (UV/Vis e IV) e por voltametria cíclica. Foram determinadas as absorvidades molares dos complexos [Mn(aha)₃], EUK 8 e EUK 108. Os EUK's apresentaram dois processos redutivos, sendo apenas um reversível, enquanto o [Mn(cit)] apresentou apenas um processo redutivo reversível e os hidroxamatos [Mn(dfb)] e [Mn(aha)₃] não apresentaram processos redox na faixa de potenciais utilizada. Em teste de lipofilicidade todos os complexos apresentaram maior afinidade pela fase aquosa, sendo muito pouco particionados para a fase orgânica. Através do ensaio de supressão de fluorescência de calceína foi possível

estabelecer que os EUK's são relativamente mais estáveis do que os outros complexos, sendo o $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ o menos estável dos compostos estudados. Nas análises de atividade pró-oxidante, o $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ oxidou fortemente a sonda mesmo na ausência de outros cofatores, mas este processo é dependente da concentração de O_2 no meio. Os EUK's atuaram como pró-oxidantes em função da concentração de peróxido no meio. A atividade pró-oxidante foi suprimida por ascorbato, glutatona e Trolox[®], que agiram como antioxidantes, sugerindo implicações para a terapia do organismo. O teste de toxicidade aguda em paulistinhas (*Danio rerio*) adultos resultou na mortalidade de alguns animais quando expostos a $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$. Comparando o telencéfalo de peixes expostos ao $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ com um controle em microscópio, não se visualizou nenhuma alteração morfológica na região do núcleo dorsal, indicando que o complexo não causou nenhum dano visível nessa região.

Palavras-chave: manganês, neurotoxicidade, pró-oxidante, *Danio rerio*

ABSTRACT

Arndt, A. **Synthesis, characterization and study of the neurotoxic activity of manganese(III) complexes in *Danio rerio***. 2009. 92p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Manganese (Mn) is an abundant element which is present also in food and water. It is the cofactor of important enzymes such as mitochondrial superoxide dismutase. However, miners and other occupationally exposed individuals may present an excessive load of Mn in brain and develop manganism, a neurological disorder akin to Parkinson Disease. Basically, Mn neurotoxicity may stem from its wide redox cycle, generating reactive oxygen species in the process of converting from one oxidation state to another. Thus, in this work we synthesized and evaluated the pro-oxidant and neurotoxic characteristics of Mn(III) complexes with desferrioxamine, [Mn(dfb)]; acetohydroxamate, [Mn(aha)₃]; citrate, [Mn(cit)]; chloro-salen, EUK 8; and aceto-salen, EUK 108. Such compounds are proposed as mimetics of superoxide dismutase and/or catalase, however they may also be pro-oxidant. These complexes were characterized spectrophotometrically (UV/Vis and IR) and by cyclic voltammetry. Molar absorptivities were determined for [Mn(aha)₃], EUK 8 and EUK 108. EUK's displayed two reductive processes, only one of which was reversible, while [Mn(cit)] displayed only one (reversible) reductive process and hydroxamates [Mn(dfb)] and [Mn(aha)₃] did not display redox processes in the working range of potentials. Lipophilicity tests showed that all complexes have very low partition to the organic phase. Calcein fluorescence quenching studies showed that both EUK complexes are relatively more stable than the others, while [Mn(aha)₃] is the least stable. In the pro-oxidant activity studies, [Mn(dfb)] strongly oxidized the fluorescent probe even in the absence of ancillary substances such as peroxide. However, this effect was dependant on O₂ saturation in the solution. Both EUK acted

as pro-oxidants with a linear dependence on peroxide concentration. Pro-oxidant activity was eliminated by the treatment with antioxidants such as ascorbate, glutathione and Trolox®, which is of interest for the therapy of manganism. In the acute toxicity tests induced some mortality in adult *Danio rerio* exposed to [Mn(dfb)] or [Mn(aha)₃]. Comparison of the telencephalus of [Mn(dfb)]-exposed individuals with controls failed to indicate morphological alterations in the dorsal nucleus area, indicating that the complex did not affect visibly this brain region.

Keywords: manganese, neurotoxicity, pro-oxidant, *Danio rerio*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos compostos de manganês *MMT*, *Maneb*[®] e *Mancozeb*[®].

Figura 2: Energias de estabilização do campo ligante e efeito Jahn-Teller em Mn^{3+} .

Figura 3: Estrutura dos complexos EUK 8, EUK 134, MnTBAP e M40403.

Figura 4: Contraste de ressonância magnética contendo manganês, Teslascan[®].

Figura 5: Distribuição do manganês no cérebro de camundongos após uma única injeção intravenosa de $MnCl_2$ (2 mg/kg). Diferenças em relação a cada controle são indicadas (*P, 0.05; **P, 0.01; ***P, 0.001).

Figura 6: Mecanismos de transporte de manganês através da barreira hemato-encefálica para níveis fisiológicos de Mn.

Figura 7: O peixe paulistinha (*zebrafish*, *Danio rerio*).

Figura 8: Vista lateral do cérebro de paulistinha adulto e seções de corte (Rink e Wullimann, 2004).

Figura 9: Estruturas propostas dos complexos de Mn(III) neste estudo.

Figura 10: Estrutura da calceína.

Figura 11: Estrutura do ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA).

Figura 12. Princípio de funcionamento do método de detecção fluorimétrica de atividade redox. (a) A adição de um pró-oxidante (peróxido ou ascorbato) inicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) catalisada por Mn presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente. (b) Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de pró-oxidantes; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de pró-oxidante. (c) Em alguns casos específicos, a taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração do pró-oxidante, podendo ser usada, se assim se desejar, para quantificar a concentração do metal na amostra estudada.

Figura 13: Estruturas da Glutathione (GSH) e do Trolox[®].

Figura 14: Espectro na região do infravermelho de $[Mn(dfb)]$ e de mesilato de desferrioxamina.

Figura 15: Espectros no visível de $[Mn(dfb)]$ e no ultravioleta de dfb (soluções aquosas).

Figura 16: Espectro na região do infravermelho do ligante salen e do complexo EUK8.

Figura 17: Espectro na região do infravermelho do ligante salen e do complexo EUK 108.

Figura 18: Espectros na região do ultravioleta-visível do ligante salen (em etanol).

Figura 19: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo EUK 8 (em etanol).

Figura 20: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo EUK 108 (em etanol).

Figura 21: Gráficos da absorbância pela concentração de EUK 8 nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Figura 22: Gráficos da absorbância pela concentração de EUK 108 nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Figura 23: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ (solução aquosa).

Figura 24: Gráficos da absorbância pela concentração de $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Figura 25: Espectro na região do visível do complexo $[\text{Mn}(\text{cit})]$ (solução aquosa).

Figura 26: Voltamogramas de MnCl_2 e dos complexos de $\text{Mn}(\text{III})$.

Figura 27: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 28: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 29: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de $[\text{Mn}(\text{cit})]$ no ciclo 22 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 72.

Figura 30: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de EUK 8 no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 31: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de EUK 108 no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 32: Fluorescência da sonda em função da razão molar complexo:calceína.

Figura 33: Taxa de fluorescência em função da concentração de ascorbato.

Figura 34: Taxa de fluorescência em função da concentração de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e dfb.

Figura 35: Taxas de fluorescência em função da saturação relativa de oxigênio no tampão.

Figura 36: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 37: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 38: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{cit})]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 39: Absorbância nos máximos de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ (636 nm), $[\text{Mn}(\text{cit})]$ (430 nm) e $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ (535 nm) em função da concentração de ascorbato.

Figura 40: Taxa de fluorescência em função da concentração de peróxido.

Figura 41: Taxa de fluorescência em função da concentração de glutathione.

Figura 42: Taxa de fluorescência em função da concentração de Trolox[®].

Figura 43: Taxa de fluorescência em função da concentração de superóxido.

Figura 44: Porcentagem de sobrevivência dos paulistinhas em função do tempo a que foram expostos aos complexos [Mn(dfb)], [Mn(aha)₃] e EUK 108. Os valores nos boxes correspondem à concentração (μM) dos complexos estudados.

Figura 45: Cortes seqüenciais do telencéfalo de peixe do grupo controle (ampliação: esquerda -10×; direita - 20×).

Figura 46: Cortes seqüenciais do telencéfalo de um peixe exposto a 1000 μM de [Mn(dfb)] (ampliação: esquerda -10×; direita - 20×).

Figura 47: Cortes seqüenciais do telencéfalo de um peixe exposto a 1000 μM de [Mn(dfb)] (ampliação: esquerda -10×; direita - 20×).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise elementar (CHN) do produto de liofilização.

Tabela 2: Análise elementar (CHN) de EUK 8 e EUK 108.

Tabela 3: Cálculo da absortividade molar do EUK 8.

Tabela 4: Cálculo da absortividade molar do EUK 108.

Tabela 5: Cálculo da absortividade molar do $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$.

Tabela 6: Coeficiente de partição dos complexos em n-octanol/água a 24°C.

Tabela 7: Valores de t e pH dos aquários contendo $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e observações sobre o comportamento dos peixes.

Tabela 8: Valores de t e pH dos aquários contendo $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ e observações sobre o comportamento dos peixes.

Tabela 9: Valores de t e pH dos aquários contendo EUK 108 e observações sobre o comportamento dos peixes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Manganês	14
1.2. Complexos de Mn(III)	16
1.3. Manganês em medicina	18
1.4. Toxicidade do manganês	21
1.5. Bioindicador: <i>Danio rerio</i>	24
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Síntese dos complexos	28
3.2. Caracterização dos complexos	31
3.3. Estabilidade relativa dos complexos	34
3.4. Atividade pró-oxidante por fluorimetria	35
3.5. Avaliação da neurotoxicidade	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Síntese e caracterização dos complexos	41
4.2. Lipofilicidade	53
4.3. Voltametria Cíclica	54
4.4. Supressão da fluorescência da calceína	56
4.5. Atividade pró-oxidante por fluorimetria	61
4.6. Toxicidade aguda em paulistinha	73
4.7. Análise histológica	79
5. CONCLUSÕES	85
6. BIBLIOGRAFIA	87
SÚMULA CURRICULAR	92

1. Introdução

1.1 Manganês

O metal de transição manganês (Mn) é o 12º elemento químico mais abundante da crosta terrestre, constituindo cerca de 0,1% da mesma. Ele não é encontrado como metal livre na natureza, mas compõe mais que 100 minérios diferentes, sendo que a pirolusita – dióxido de manganês IV, (MnO₂) – é o mais comum. Foi considerado pela primeira vez como elemento químico em meados do século XVIII pelo químico sueco Carl Scheele, e já no século XIX começou a ser utilizado em ligas metálicas (*IMnI, 2009*).

Por ser abundante, está presente no solo, na água, no ar e nos alimentos. Dessa maneira é também comumente encontrado no corpo humano, sendo um elemento traço essencial para uma boa saúde. As principais fontes alimentares de manganês são nozes, cereais, brócolis e chás, mas também está presente em concentrações menores em carnes, frutas, ovos e legumes. No organismo humano compõe, entre outras, as enzimas mitocondriais piruvato carboxilase, glutamina sintetase (importante para o metabolismo de amônia no cérebro), arginase (formação de uréia), fosfatase alcalina e superóxido dismutase (MnSOD, antioxidante), além de ser essencial na formação normal da estrutura óssea, no funcionamento do sistema imune e atuar no metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos (*U.S. D-HHS, 2000; Gerber et al, 2002; Erikson et al, 2005*).

Fontes atmosféricas incluem emissões industriais, queima de combustíveis fósseis e erupções vulcânicas (*U.S. EPA, 2003; WHO, 2004*).

Uma importante fonte de manganês dissolvido são os ambientes anaeróbios onde óxidos de manganês particulado são reduzidos, como em alguns solos, sedimentos e pântanos. Outras possíveis fontes incluem a redução direta de óxidos de manganês particulado em am-

bientes aeróbios por compostos orgânicos, com ou sem luz ultravioleta, o desgaste natural de minerais contendo Mn(II) e ambientes ácidos (**WHO, 2004**).

As reservas mundiais de minérios com alto teor de manganês (> 44% da composição) são estimadas em 680 milhões de toneladas, situadas principalmente na Austrália, Brasil, Gâmbia e África do Sul, suprimindo cerca de 90% do mercado global. Atualmente cerca de 90% do manganês produzido é utilizado pela indústria metalúrgica na formação de ligas de ferro. Em 2007 a produção mundial total de ligas metálicas contendo manganês foi de 13,3 milhões de toneladas, sendo que a China produziu 46% (6,2 milhões de toneladas) (**IMnI, 2009**).

As ligas de ferro contendo manganês são muito apreciadas, pois aumentam a dureza do ferro sem reduzir sua maleabilidade e resistência, além de retirar o enxofre presente no minério de ferro, que poderia causar falhas no aço. A presença de manganês nas reservas de minério de ferro em Esparta é um dos principais motivos de suas armas de aço serem melhores que a de seus inimigos no período da Grécia Antiga (**IMnI, 2009**). O tipo de aço *Hadfield* (contendo 13% de Mn e 1,25% de C) é um dos mais duros e por isso é utilizado em situações que exigem resistência a choques mecânicos severos, como por exemplo, trilhos de trem, britadeiras e escavadeiras. Outros usos industriais importantes do manganês incluem a confecção de baterias ácidas, fabricação de vidros e cerâmicas e aditivos nutricionais (**WHO, 2004**).

Mais recentemente o manganês também tem sido utilizado na fabricação de outros compostos. O antidetonante *MMT* (*Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl*), Figura 1, surgiu no fim da década de 50 nos EUA para substituir o chumbo tetraetila adicionado aos combustíveis; desde então há muita discussão sobre possíveis riscos à saúde, por essa ser uma fonte antropogênica de Mn na atmosfera (**Zheng et al, 2000**). Atualmente somente cerca de 25 países ainda utilizam o *MMT*, sendo alguns no leste europeu e a Bélgica (**Walsh, 2007**), mesmo ainda não sendo possível estabelecer uma relação clara entre o uso do *MMT* e a concentração de Mn no ar.

Os fungicidas *Maneb*[®] (etileno-1,2-bisditiocarbamato de manganês) e *Mancozeb*[®] (etileno-1,2-bisditiocarbamato de manganês e zinco), Figura 1, são muito utilizados em plantações de frutas, vegetais, grãos e conservação de árvores ornamentais para proteção contra doenças. Porém exposições agudas e/ou crônicas a estes fungicidas estão relacionadas com alguns danos neurológicos, como toxicidade a neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos (v. a seguir) (Domico *et al*, 2006).

Figura 1: Estrutura dos compostos de manganês *MMT*, *Maneb*[®] e *Mancozeb*[®].

1.2 Complexos de Mn(III)

A configuração eletrônica do manganês ($Z = 25$) é $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^5$ e ele pode alcançar os estados de oxidação desde (-III) até (+VII). Dentre estes vários estados de oxidação acessíveis ao Mn, do ponto de vista ambiental e/ou bioquímico, os mais estáveis são Mn(II) e Mn(IV). O íon no estado de oxidação intermediário +3 desproporciona-se rapida-

mente em meio oxidante e pH neutro a Mn(II) e Mn(IV), se não houver um sistema de ligantes que o estabilize em solução. A reação de desproporcionamento do Mn^{3+} é dada por:

O íon Mn(III) tem configuração na camada de valência igual $3d^4$ e, quando de *spin* alto, apresenta o orbital e_g desigualmente ocupado, o que ocasiona uma distorção na estrutura pelo efeito Jahn-Teller (Figura 2). Os complexos formados neste estado de oxidação adotam preferencialmente uma simetria tetragonal, com quatro ligações curtas e duas relativamente mais longas, sendo semelhante nesse caso ao Cu(II). É o único cátion trivalente de importância biológica que adota esse ambiente estrutural, tendo, portanto o potencial de ser inserido em proteínas específicas. De fato, enzimas que contém o Mn(III) como sítio catalítico são: MnSOD, fosfatase ácida, Mn-catalase e Mn-peroxidase. Os átomos doadores normalmente são as chamadas “bases duras” como o oxigênio (em RO^-), N e F^- , e os complexos de Mn(III) com ligantes que induzem um campo fraco são normalmente mais estáveis do que seus análogos com Mn(II), dado que apresenta estabilização por campo ligante. Sua cinética de troca de ligantes é rápida (Hughes e Williams, 1988).

Figura 2: Energias de estabilização do campo ligante e efeito Jahn-Teller em Mn^{3+} .

1.3 Manganês em medicina

A enzima Mn-superóxido dismutase (SOD2 ou MnSOD) está presente na matriz mitocondrial catalisando a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formado normalmente na respiração celular e anormalmente em casos de inflamações agudas ou crônicas, conforme a reação (**Freeland-Graves *et al*, 2005**):

Onde Mn^{n+1} é a forma oxidada da MnSOD e Mn^{n+} a forma reduzida. Existem outras formas de SOD a base de outros metais (como SOD1 e SOD3 contendo Cu/Zn), mas apenas a MnSOD apresentou-se letal quando ausentes em ratos, causando cardiomiopatia, falha no fígado, anormalidades nas mitocôndrias e danos oxidativos no DNA (Melov, 2002).

Alguns compostos sintéticos de manganês têm sido propostos como agentes terapêuticos em diversas doenças, atuando como miméticos da enzima superóxido dismutase (Muscoli *et al*, 2003). Destacam-se três grupos: Mn(III)-metaloporfirinas; Mn(III)-salen; e Mn(II) com ligantes pentaazamacrocíclicos. Dentre os compostos de Mn-porfiratos, o MnTBAP (*Mn(III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin*, Figura 3) mostrou-se eficiente na redução de respostas associadas a inflamações nos pulmões e em modelos de derrame hemorrágico em ratos (Cuzzocrea *et al*, 1999). O Mn(II) pentaazamacrociclo (M40403, Figura 3) foi desenvolvido por modelagem computacional e também atua como protetor de inflamações agudas e crônicas, e como antioxidante em reperfusão e derrame (Salvemini *et al*, 2002). Os complexos de fórmula geral Mn(III)-salen foram desenvolvidos pela empresa Eukarion (recentemente adquirida pela Proteome Systems) com finalidade semelhante; tais compostos recebem habitualmente a designação “EUK-*n*” (onde *n* é um número sequencial da empresa). Os complexos da família EUK apresentam boa ação mimética das funções superóxido dismutase e catalase (Freeland-Graves *et al*, 2005; Baker *et al*, 1998).

Figura 3: Estrutura dos complexos EUK 8, EUK 134, MnTBAP e M40403.

Alguns outros complexos estáveis de Mn(III) são conhecidos por apresentarem propriedades catalíticas que podem definir sua utilidade ou perigo para um determinado sistema biológico. Complexos de Mn(III) com ligantes poli-hidroxamatos como as desferrioxaminas, sideróforos bacterianos utilizados terapeuticamente na quelação de excesso de ferro, já foram sugeridos como substitutos de baixo peso molecular para as superóxido dismutases em tratamentos de contenção de estresse oxidativo. O complexo de Mn(III) com citrato (um ligante abundante no plasma sanguíneo) aparentemente cruza a barreira hemato-encefálica (BHE) por

um sistema dependente de carregadores específicos e é, portanto, de interesse para a compreensão da neurotoxicologia do Mn(III) (Crossgrove *et al*, 2003).

O manganês pode ser identificado no cérebro sem necessitar de procedimentos invasivos, através de imagens por ressonância magnética (RM) devido suas propriedades ferromagnéticas. Pelo fato de melhorar as imagens em RM (dado que apresenta vários eletros desemparelhados), desenvolveu-se um agente de contraste contendo manganês complexado com a dipiridoxil (derivado da vitamina B₆), chamado Teslascan[®] (Figura 4) (Freeland-Graves *et al*, 2005).

Figura 4: Contraste de ressonância magnética contendo manganês, Teslascan[®].

1.4 Toxicidade do manganês

A principal rota de absorção de manganês é através do trato gastrointestinal, acumulando-se no fígado e em seguida excretado na bile antes de adentrar a corrente circulatória (Aschner e Aschner, 1991). Apesar disso, o manganês presente em material particulado pode ser absorvido pela circulação pulmonar (circulação sanguínea que oxigena as células pulmonares) e daí seguem à circulação sistêmica (circulação sanguínea que oxigena as células dos demais tecidos corporais) (Saric e Lucchini, 2007). A intoxicação por manganês está relacionada com danos neurológicos, similares ao mal de Parkinson e conhecida como manganismo

ou “loucura mangânica”, já que em alguns casos ele é anormalmente concentrado pelo cérebro, especialmente no gânglio basal (**Takeda, 2003**). Essa doença acomete pessoas expostas a sobrecargas de Mn, incluindo mineradores e especialmente os usuários de fungicidas como o *Maneb*[®] e *Mancozeb*[®]. Um estudo sugere que a concentração total de Mn no cérebro está entre 0,2 e 0,9 ng/mg do tecido, concentrando-se mais na ponte medular, no culículo inferior e no cerebelo (Figura 5).

Figura 5: Distribuição do manganês no cérebro de camundongos após uma única injeção intravenosa de MnCl_2 (2 mg/kg). Diferenças em relação a cada controle são indicadas (* P, 0.05; ** P, 0.01; *** P, 0.001) (**Sotogaku et al, 2000**).

O mecanismo de aquisição de Mn e/ou de seu transporte pela barreira hematoencefálica não são totalmente compreendidos, porém supõe-se que quando o Mn estiver livre (Mn^{2+}) ou ligado a alguns transportadores específicos, como transferrina (Mn^{3+}) ou citrato, ele tem maior facilidade em cruzar essa barreira (Figura 6).

Figura 6: Mecanismos de transporte de manganês através da barreira hemato-encefálica para níveis fisiológicos de Mn (Aschner *et al*, 2007).

A toxicidade do Mn(III) pode estar associada a seu potencial de atuar como pró-oxidante, por exemplo, oxidando o ascorbato para o radical ascorbila ou como metal ativo em uma reação de Fenton. Estudos recentes demonstram que o complexo Mn(III)-pirofosfato promove a oxidação da dopamina em células de rato (Reaney e Smith, 2005). Assim como ocorre com o cobre, o Mn^{2+} é capaz de catalisar a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot -}$ para H_2O_2 , de acordo com os ligantes presentes (por exemplo, polifosfatos), podendo gerar como produto final Mn^{3+} na ausência de mais superóxido no meio (III) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A enzima MnSOD atua com um mecanismo similar, mas o centro ativo da enzima contém o íon Mn^{3+} (IV):

Baseando-se nas informações de toxicidade de manganês as agências governamentais estipulam valores limites a que podemos estar expostos. Em água potável, a Organização Mundial de Saúde considera o limite de 0,5 mg/L de manganês suficiente para proteger a saúde humana (**WHO, 2006**), a Agência de Proteção Ambiental dos EUA estipula o valor de 0,05mg/L (**U.S. EPA, 2003**), enquanto o Ministério da Saúde brasileiro estipula o limite de 0,1 mg/L (**Ministério da Saúde, 2004**).

1.5 Bioindicador: *Danio rerio*

Dados sobre a neurotoxicidade do Mn na literatura sugerem que diferentes espécies animais podem apresentar diferentes sintomas e/ou padrões de acúmulo cerebral desse metal. Primatas não-humanóides intoxicados com Mn apresentam sintomas semelhantes aos humanos, entretanto os dados em roedores são menos conclusivos. Além disso, as alterações comportamentais observadas em humanos intoxicados não são reprodutíveis em roedores (**Dobson et al, 2004**).

Vários metais que são imunotóxicos em mamíferos (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn) também alteram as funções imuno-regulatórias de peixes (**Zelikoff, 1993**). O peixe paulistinha (*zebrafish*, *Danio rerio*, Figura 7) tem sido um dos modelos vertebrados mais utilizados para a extrapolação de dados de toxicologia para humanos, por ser de pequeno tamanho (1,0 – 5,0 cm),

fácil criação, muito fértil, produzir embriões transparentes e, particularmente, não ser alvo de uma legislação restritiva como a que regulamenta a experimentação com roedores, cães ou coelhos (Spitsbergen e Kent, 2003).

Figura 7: O peixe paulistinha (*zebrafish*, *Danio rerio*).

Estudos de diversos tipos de toxicidade aguda, subcrônica ou crônica com *Danio rerio* têm sido cada vez mais comuns. A toxicidade aguda de compostos metálicos, entretanto, tem recebido menos atenção (Hill *et al*, 2005). Concretamente, até onde alcançou nossa revisão bibliográfica, não foi estudado o efeito específico da presença de espécies de Mn(III) no surgimento de neurotoxicidade no *Danio rerio*. Em humanos, o gânglio basal é a região do cérebro onde ocorre preferencialmente o acúmulo de Mn em situações de sobrecarga desse metal (p. ex. manganismo) (Freeland-Graves, 2005; Crossgrove, 2003). O gânglio basal em humanos tem como correspondente o núcleo dorsal da área telencefálica ventral (Vd) do cérebro de *Danio rerio* (Rink e Wullimann, 2001; Rink e Wullimann, 2004; Wullimann e Mueller, 2004) (Figura 8).

2. Objetivos

- Síntese e caracterização dos complexos estáveis de Mn(III): Mn-desferrioxamina B [Mn(dfb)], Mn-acetohidroxamato [Mn(aha)₃], Mn-citrato [Mn(cit)], cloreto de Mn-salen (EUK8), acetato de Mn-salen (EUK108) (Figura 9). Exceto pelo complexo [Mn(aha)₃], os demais já foram descritos na literatura.
- Estudo da atividade pró-oxidativa dos complexos acima em tampões fisiológicos através de métodos fluorimétricos.
- Estudo da atividade neurotóxica dos complexos pró-oxidantes sobre peixes da espécie *Danio rerio* (“paulistinha” ou “zebrafish”).

Figura 9: Estruturas propostas dos complexos de Mn(III) neste estudo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Síntese dos complexos

3.1.1 [Mn(df_b)] (Faulkner *et al*, 1994)

O complexo [Mn(df_b)] é obtido através da reação de oxidação de MnCl₂ (Sigma) com o oxigênio atmosférico na presença de mesilato de desferrioxamina (df_b) (Novartis) em quantidades equimolares em água destilada a pH 9, ajustado com NaOH (Cromoline) (constantes de dissociação do df_b a 25°C: pK₁ = 8,30, pK₂ = 9,00 e pK₃ = 9,46) (Farkas *et al*, 1999). Agita-se a solução ao ar e a temperatura ambiente por, aproximadamente, 1h30'. A reação proposta seria dada por:

3.1.2 [Mn(cit)] (Klewicki e Morgan, 1998)

O complexo é sintetizado utilizando a reação de coproporcionamento entre os íons manganoso e permanganato na presença de excesso de ligante. Esta reação pode ser representada por (Shriver *et al*, 2008):

$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ (Fluka) é dissolvido em água destilada juntamente com citrato de sódio tribásico (Cromoline) a uma razão molar de 1:2 (sendo que nessa proporção o citrato está em excesso para deslocar o equilíbrio no sentido de formação do produto). Em seguida, KMnO_4 (Synth) suficiente é adicionado lentamente até se estabelecer uma razão molar $\text{Mn}(\text{II}):\text{Mn}(\text{VII})$ de 4:1. O complexo é formado na proporção 1:1 entre o metal e o ligante. A reação final (Klewicki e Morgan, 1998) é:

3.1.3 *EUK 8 e EUK 108* (Boucher, 1974; Doctrow *et al*, 2002)

O ligante salen (do acrônimo, em inglês, *salicylaldehyde* e *ethylenediamine*) é obtido através da reação em metanol à temperatura ambiente a partir de etilenodiamina (Sigma) e aldeído salicílico (Sigma) (razão molar 1:2) como um precipitado amarelo (Reação VIII). Depois de lavado, uma solução 0,02 M desse ligante em etanol 95% (Synth) é tratada com acetato de $\text{Mn}(\text{II})$ (Cromoline) (razão molar 1:2) e o sistema é deixado em refluxo por 3 horas (Reação IX). Após esse período, o solvente é removido por roto-evaporação e o resíduo seco é extraído com água destilada aquecida ($\sim 60^\circ\text{C}$) e em seguida filtrado. Para a obtenção do *EUK 8*, é adicionado KCl (Cromoline) a esse filtrado para se atingir uma concentração final de 1 M (Reação X). Para a obtenção de *EUK 108*, a massa adequada de acetato de potássio (Sigma) é adicionada para atingir a mesma concentração (Reação XI). Em ambos os casos, observa-se a formação de um sólido marrom-avermelhado, que é filtrado a vácuo, secado ao ar e recristalizado com acetona-éter dietílico (Synth).

Em ambos os complexos, os íons Cl^- ou OAc^- estão coordenados ao metal, não sendo apenas contra-íons (Boucher, 1974).

3.1.4 [Mn(aha)₃]

O complexo de Mn(III)-acetohidroxiato foi obtido de forma análoga à do complexo [Mn(dfb)], ou seja, pela oxidação do MnCl₂ na presença de ácido acetohidroxâmico (Haha) (Fluka) (pK_a = 9,27) (Farkas *et al*, 1999), em razão molar 1:3 em água destilada e pH 9,5, sob forte agitação por, aproximadamente, 2,5 horas (Reação XII).

A estequiometria metal:ligante de 1:3 foi sugerida por analogia com o complexo com o quelante hidroxamato hexadentado dfb, dado que após numerosas tentativas não foi possível isolar o derivado do ácido acetohidroxâmico para fins de caracterização por análise elementar.

3.2 Caracterização dos complexos

3.2.1 *Análise elementar*

A composição dos complexos obtidos na forma sólida foi determinada através de análise elementar em equipamento Perkin Elmer (C, H, N). Quando necessária, a quantificação de Mn foi feita através de emissão atômica com plasma de argônio induzido (ICP-OES) em aparelho SpectroFlame. Ambos os instrumentos são da Central Analítica do IQUSP.

3.2.2 *Espectroscopia no infravermelho (Nakamoto, 1997)*

Pastilhas de KBr com os ligantes livres e os complexos foram preparadas para a aquisição dos espectros na região do infravermelho com o aparelho Bomem MB 100, de responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Márcia Laudelina Arruda Temperini (IQUSP).

3.2.3 *Espectroscopia UV/Visível*

O íon 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. Entretanto, no íon Mn^{3+} (d^4) essa restrição desaparece e o último elétron pode ocupar tanto o orbital $x^2 - y^2$ quanto o orbital z^2 , podendo causar um alongamento das liga-

ções entre metal-ligante, o chamado efeito Jahn-Teller (Figura 2). Nessa condição ocorrem transições eletrônicas *d-d* e os complexos assumem colorações.

Pela regra de seleção de Laporte uma molécula ou íon centro-simétrico só terá transições permitidas quando houver uma mudança de paridade. Para um complexo octaédrico as transições *d-d* são proibidas por Laporte, pois são $g \leftrightarrow g$. Isso explica a baixa intensidade relativa de tais transições, com ϵ_{max} entre 20 e 100 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Mas essa regra pode ser relaxada caso o complexo sofra distorções de simetria ou quando houver uma vibração assimétrica. Para complexos tetraédricos, essa regra não se aplica, pois não possuem centro de simetria nem índices *g* ou *u* e o ϵ_{max} pode chegar a 500 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Outra transição que pode ocorrer é a chamada de transferência de carga quando um elétron desloca-se entre um orbital do ligante para o metal ou vice-versa. As transferências de carga apresentam alta intensidade e o ϵ_{max} está na faixa de 1000 a 50000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (Shriver *et al*, 2008).

Os espectros eletrônicos foram obtidos utilizando cubetas de quartzo em aparelho Shimadzu UV-1700 PharmaSpec, de propriedade do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos.

3.2.4 Voltametria cíclica

A atividade redox de complexos de manganês tem sido amplamente investigada, dados os vários estados de oxidação acessíveis para esse metal (+2, +3, +4, +7) (O'Hare *et al*, 2003; Baffert *et al*, 2003). Os possíveis efeitos do ligante sobre o comportamento redox do Mn(III) foram investigados em um potenciostato PAR 263, de responsabilidade do Prof. Dr. Lúcio Angnes (IQ-USP). Para efetuar as leituras no potenciostato foram utilizados eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência de Ag/AgCl preenchido com KCl e eletrodo

auxiliar de aço inox. A faixa de varredura foi de -0,8 V até 1,2 V, com uma velocidade de 100 mV.s⁻¹. Fizeram-se 10 leituras, registrando-se os dados apenas da última.

3.2.5 Lipofilicidade (Dearden e Bresnen, 1988; OECD, 1995)

A lipofilicidade dos complexos foi estudada através da determinação dos coeficientes de partição (*P*) *n*-octanol/água a 24°C pelo método *shake-flask*. Quinhentos microlitros das soluções aquosas dos complexos foram misturados em microtubos de 2 mL com igual volume de *n*-octanol ($\rho^{25^\circ\text{C}} = 0,827 \text{ g.mL}^{-1}$) (Cromoline) saturado com água. A agitação da mistura foi feita por 10 minutos à temperatura ambiente com um agitador de tubos AP56 Phoenix, de propriedade do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos. Em seguida a mistura foi centrifugada em microcentrífuga miniSpin plus (Eppendorf), também de propriedade do Laboratório, e as fases aquosa e orgânica foram separadas em microtubos diferentes. Em seguida foi feita a quantificação de Mn, por ICP-OES, na fase aquosa e na solução estoque, obtendo-se a quantidade de Mn na fase orgânica por diferença.

Os valores do coeficiente de partição foram então calculados de acordo com a Equação 1:

$$\log P = \log \left(\frac{c_{\text{octanol}}}{c_{\text{água}}} \right) \quad \text{Equação 1,}$$

onde c_{octanol} é a concentração molar do soluto em octanol e $c_{\text{água}}$ é a concentração molar do soluto em água (OECD, 1995).

3.3 Estabilidade relativa dos complexos

A calceína é um ligante orgânico que possui grande afinidade por cátions metálicos. Além disso, quando não complexada, ela emite fluorescência em 520 nm, após ser excitada em 485 nm. Diversos íons metálicos suprimem a fluorescência dessa molécula quando formam complexos (**Haugland, 2001**). Assim, é possível quantificar a estabilidade relativa de um complexo metálico através da redução da fluorescência dessa sonda (**Espósito *et al*, 2002b**).

A fluorescência da calceína (Biotium) (Figura 10) em meio tamponante HBS (*HEPES Buffered Saline*, HEPES 20 mM (Sigma), NaCl 150 mM (Cromoline), pH 7,4) tratado com Chelex[®] (Sigma) (1g.100mL⁻¹, como forma de reduzir a contaminação por íons metálicos) foi acompanhada em um leitor de microplacas BMG Fluostar Optima, de propriedade do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos. Após estabilização da leitura de fluorescência da calceína (~ 5 minutos), alíquotas de concentrações conhecidas dos complexos são adicionadas à solução, reiniciando-se a leitura. Nesse ponto, é onde se observa a redução de fluorescência, causada pelo efeito supressor do íon metálico coordenado à calceína.

Figura 10: Estrutura da calceína.

Quando a leitura torna-se constante, é adicionado ao meio DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético; Figura 11) (Acros Organics) suficiente para atingir a concentração de 1 mM. O DTPA em excesso liga-se mais fortemente ao Mn, retirando-o da calceína, que volta a fluorescer. Essa precaução é importante para estabelecer que a supressão da fluorescência da calceína foi causada apenas pela coordenação do metal, e não por reações secundárias que tenham destruído a sonda.

Figura 11: Estrutura do ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA).

Neste experimento o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{nta})]$ (nta = ácido nitrilotriacético (Vetec)) é utilizado como controle positivo de supressão (**Espósito *et al*, 2003**), e o complexo $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{nta})]$ foi introduzido para efeitos comparativos. $[\text{Fe}(\text{nta})]$ e $[\text{Mn}(\text{nta})]$ foram sintetizados misturando 70 mM de nta, titulado a pH 7 com NaOH, com 20 mM de sulfato de ferro(II) amoniacal (Cromoline) ou 10 mM de MnCl_2 , respectivamente (**Espósito *et al*, 2003**).

3.4 Atividade pró-oxidante por fluorimetria

A possibilidade de geração de espécies radicalares em tampões fisiológicos foi estudada através da reação de uma mistura pró-oxidante contendo ascorbato (Cromoline), peróxido de hidrogênio (Cromoline) ou superóxido (Sigma), e a sonda fluorimétrica cloreto de dihi-

drorodamina (DHR) (Biotium) na presença ou ausência dos complexos de manganês, e dos complexos [Fe(NTA)] e [Mn^{II}(NTA)]. Na forma reduzida, essa sonda não é fluorescente, entretanto, uma série de substâncias (ERO's, O₂) pode convertê-la à forma oxidada, fluorescente (Figura 12). Adaptamos este método para o nosso estudo, visto que foi originalmente concebido para a detecção de ferro redox-ativo em meio fisiológico (Espósito *et al*, 2003; Espósito *et al*, 2002a).

O meio fluorogênico consiste em uma solução de DHR 50 µM, preparada a partir de estoques congelados (100 mM em DMSO), em tampão HBS isento de ferro (pH 7,4). Esse tampão isento de ferro, uma precaução importante contra reações de Fenton colaterais indesejadas catalisadas por traços de Fe(III), é preparado pela lavagem da solução com Chelex® (1g.100mL⁻¹) antes do ajuste de pH. Aliquotas de 180 µL do meio fluorogênico são transferidas para uma placa transparente de 96 poços, nas quais já se encontravam 20 µL da solução de complexo metálico (10 µM em água). A leitura de fluorescência é executada em leitor de microplacas (BMG Fluostar Optima), operando com incubação a 37°C e $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 485/515$ nm. A intensidade de fluorescência de cada poço é medida em intervalos de dois minutos durante uma hora. Os dados são apresentados como “intensidade de fluorescência / tempo” e não como pontos finais, para minimizar erros (Figura 12) (Espósito *et al*, 2003; Espósito *et al*, 2002a).

Figura 12. Princípio de funcionamento do método de detecção fluorimétrica de atividade redox. (a) A adição de um pró-oxidante (peróxido ou ascorbato) inicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) catalisada por Mn presente na amostra, convertendo a sonda não-fluorescente DHR à sua forma fluorescente. (b) Curvas cinéticas de fluorescência são obtidas para diversas concentrações de pró-oxidantes; a partir dessas curvas, determinam-se seus coeficientes angulares (m), que correspondem à taxa de fluorescência para uma dada concentração de pró-oxidante. (c) Em alguns casos específicos, a taxa de fluorescência é linearmente dependente da concentração do pró-oxidante, podendo ser usada, se assim se desejar, para quantificar a concentração do metal na amostra estudada.

Também foi avaliada por esse sistema a capacidade antioxidante da glutathiona (GSH) (Sigma) e do Trolox[®] (Sigma) (derivado da vitamina E) em uma mistura contendo os complexos de Mn(III) e H₂O₂ (Figura 13).

Figura 13: Estruturas da Glutathione (GSH) e do Trolox®.

3.5 Avaliação da neurotoxicidade

3.5.1 Teste de toxicidade aguda (OECD, 1992)

Paulistinhas (*Danio rerio*) adultos foram mantidos em aquários de 40 litros, alimentados 2x ao dia com ração comercial e fotoperíodo de 12 horas para aclimação. Quando necessário, os animais foram expostos às espécies de Mn com maior potencial pró-oxidativo em várias concentrações por até 96h. Depois de 3, 6, 24, 48, 72 e 96h, foram registrados o pH e a temperatura. Não foi possível registrar os valores da concentração de oxigênio dissolvido e dureza da água pois só dispúnhamos de técnicas colorimétricas, não aconselhável neste caso pois os complexos são coloridos. Qualquer mudança no comportamento normal dos peixes também foi registrada, assim como a ocorrência de morte.

3.5.2 Técnicas de histologia – Inclusão em parafina

Após as 96 h de exposição dos peixes, escolheram-se aqueles que permaneceram vivos e aparentavam alguma modificação em seu comportamento (no caso de todos aparentarem o mesmo comportamento, a escolha foi aleatória) e efetuou-se anestesia com solução etanólica 40 mg/L de benzocaína e a dissecação do paulistinha. Os cérebros e/ou toda a cabeça dos exemplares foram removidos cirurgicamente com o auxílio de uma lupa Leica modelo MZ 12 5. Este material foi fixado em líquido de Bouin (750 mL de ácido pícrico saturado (Dinâmica), 250 mL de formol (Synth), 50 mL de ácido acético glacial (Synth)) entre 6 e 8 h. Após a fixação, o tecido foi lavado em água corrente de torneira por no mínimo uma hora, para retirar o excesso de fixador. Depois de lavado, foi colocado em etanol 70 % (Synth) para conservação do tecido. Quando da inclusão de toda a cabeça do paulistinha, procedeu-se a descalcificação do material após ele ter permanecido ao menos 24 h em etanol 70%. Para descalcificar, o material foi transferido para uma solução contendo EDTA (Cromoline) 10 M e NaOH 0,12 M. Após 24 h, conferiu-se delicadamente com um alfinete se o material já estava descalcificado (o tempo final depende do tamanho do material), retornando-o ao etanol 70%.

O material foi então desidratado através de banhos sequenciais de etanol 95%, etanol absoluto (3×), xilol (2×) e parafina a 60°C (3×). Após o terceiro banho de parafina (Easy Path) o material foi incluído em parafina, usando forminhas de papel. A orientação do material foi feita com uma pinça aquecida.

Após a inclusão e estando a parafina já endurecida, o bloco foi aparado com um estilete ao redor do material, tirando o excesso de parafina, e em seguida esse bloco foi montado em um taquinho de madeira. Com o bloco montado, o material está pronto para ser cortado em micrótomo.

Utilizando o micrótomo Leica modelo RM 2155, foram obtidos cortes sequenciais da região apresentada anteriormente do cérebro do exemplar. Cada corte teve entre 5 e 6 μm , e foi transferido para um banho-maria à temperatura de 42° C, deixando por 1 min para esticar o tecido. Depois de esticado, o corte foi transportado para uma lâmina de vidro impregnada com poli-L-Lisina (Sigma), para melhor aderência do corte na lâmina. Com as lâminas prontas, o material foi corado com hematoxilina de Harris e eosina de Putt (**Pearse, 1961**).

As lâminas foram analisadas com um microscópio óptico Zeiss modelo Axioscope 2 e as imagens foram captadas com uma câmera digital Pixera acoplada ao microscópio. Todas essas análises histológicas foram executadas nas instalações do Laboratório de Endocrinologia de Peixes (responsável: Dr^a. Maria Inês Borella – ICB-USP).

4. Resultados e Discussão

4.1 Síntese e caracterização dos complexos

4.1.1 $[Mn(dfbb)]$

O complexo foi sintetizado como descrito anteriormente, ajustando-se o pH, inicialmente igual a 5 medido com papel indicador, com NaOH 1 M. Notou-se a ocorrência da reação pela mudança da cor da solução: de incolor para verde-escuro. Alíquotas de 250 μ L da solução foram transferidas para microtubos e submetidos a liofilização em centrífuga à vácuo de propriedade da Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Baldini (IQ-USP). Notou-se a formação de uma mistura de sólidos esverdeados e brancos.

Fez-se análise elementar dos produtos sólidos obtidos na liofilização. No cálculo do resultado esperado considerou-se que o produto era composto pela mistura estequiométrica do complexo $[Mn(dfbb)]$ e os sais mesilato de sódio (CH_3SO_3Na) e cloreto de sódio ($NaCl$), segundo os produtos da reação de síntese (Reação V), e que eles continham 2 águas de hidratação (Tabela 1). Apesar de não ser recomendável efetuar a análise elementar para uma mistura de sólidos ao invés de um sólido puro, observou-se boa correlação entre os valores teóricos e experimentais.

Tabela 1: Análise elementar (CHN) do produto de liofilização.

Produto		%C	%H	%N
$C_{25}H_{48}N_6O_8Mn$ ($[Mn(dfbb)]$) + 2 NaCl + CH_3SO_3Na + 2 H_2O	Teórico	35,34	5,93	9,51
	Experimental	35,16	6,27	9,55

Obteve-se o espectro infravermelho deste sólido e o do mesilato de desferrioxamina (Figura 14).

Figura 14: Espectro na região do infravermelho de $[Mn(dfb)]$ e de mesilato de desferrioxamina.

Observa-se na Figura 14 que as regiões de absorção do infravermelho são muito semelhantes entre o complexo e o ligante. No espectro do complexo destacam-se as seguintes bandas (cm^{-1}): 3313 estiramento N-H; 2930 estiramento assimétrico CH_2 ; 1625 estiramento C=O do hidroxamato; 1560 estiramento C-N-H; 1460 CH_3 ; 1265 estiramento C-N e dobra-

mento N-H; 1160 estiramento C-N; 980 estiramento N-O. Para o ligante, nota-se uma banda em 3114 cm^{-1} referente a estiramento O-H, pois a desferrioxamina não está desprotonada (**Sieberner-Freibach *et al*, 2005**).

Também foram obtidos os espectros na região do ultravioleta-visível para soluções aquosas de dfb e $[\text{Mn}(\text{dfb})]$. O complexo apresentou um máximo de absorção em 636 nm, cuja absortividade molar é $128\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (**Faulkner *et al*, 1994**), porém no ultravioleta o complexo apresentou uma banda muito intensa. Esta absorção no visível com uma absortividade molar pequena indica que ocorre uma transição eletrônica entre os orbitais *d-d* do manganês (**Shriver *et al*, 2008**). O ligante apresentou uma pequena absorção na região de 200 nm (Figura 15).

Figura 15: Espectros no visível de $[Mn(dfbb)]$ e no ultravioleta de dfb (soluções aquosas).

4.1.2 EUK 8 e EUK 108

Tanto o ligante salen quanto os complexos EUK 8 e EUK 108 foram sintetizados conforme descrito na seção 3.1.3. Fez-se a análise elementar dos complexos (Tabela 2). Os resultados teóricos e da análise foram muito próximos.

Tabela 2: Análise elementar (CHN) de EUK 8 e EUK 108.

Complexo		%C	%H	%N
EUK 8	Teórico	48,93	4,62	7,13
$C_{16}H_{14}N_2O_2ClMn \cdot 2H_2O$	Experimental	49,95	3,68	7,19
EUK 108	Teórico	51,93	5,08	6,73
$C_{18}H_{17}N_2O_4Mn \cdot 2H_2O$	Experimental	52,38	4,10	6,28

Obtiveram-se os espectros na região do infravermelho tanto do ligante salen quanto dos complexos (Figuras 16 e 17).

Figura 16: Espectro na região do infravermelho do ligante salen e do complexo EUK8.

Figura 17: Espectro na região do infravermelho do ligante salen e do complexo EUK 108.

Como as estruturas do EUK 8 e do EUK 108 são muito semelhantes, observaram-se espectros IV também muito semelhantes, com os seguintes picos (cm^{-1}): 1624 estiramento C=N; 1600 e 1543 estiramento C=C aromático; 1467 dobramento “scissor” CH_2 ; 1385 deformação C-H da imina; 1279 estiramento C-O; 1203 estiramento C-N; 906 dobramento “rocking” CH_2 . A diferença foi que no espectro do EUK 108 observou-se também um pico em 1550 cm^{-1} referente ao grupo carboxilato do acetato ligado no Mn. As bandas em $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$

estão relacionadas ao O-H no ligante salen e às águas de hidratação nos complexos (Boucher, 1974).

Foram obtidos os espectros no ultravioleta e visível do ligante salen em solução etanólica (Figura 18).

Figura 18: Espectros na região do ultravioleta-visível do ligante salen (em etanol).

Obtiveram-se também os espectros no ultravioleta e visível das soluções etanólicas de EUK 8 e EUK 108 (Figuras 19 e 20, respectivamente).

Figura 19: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo EUK 8 (em etanol).

Figura 20: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo EUK 108 (em etanol).

Conhecendo as concentrações molares c de ambos os complexos em solução (solubilização de massa conhecida em um volume conhecido de etanol) e o valor da absorbância em cada comprimento de onda, calculou-se a absorvidade molar ϵ através da Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$, sendo o caminho óptico, b , igual a 1 cm) (Figuras 21 e 22 e Tabelas 3 e 4):

Figura 21: Gráficos da absorbância pela concentração de EUK 8 nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Tabela 3: Cálculo da absorvidade molar do EUK 8.

λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	R^2
400	5296	0,9996
282	17779	0,9993
238	38084	0,9998
218	33050	0,9994

Figura 22: Gráficos da absorbância pela concentração de EUK 108 nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Tabela 4: Cálculo da absorvidade molar do EUK 108.

λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	R^2
400	4304	0,9946
282	12911	0,9906
238	25792	0,9944
218	22532	0,9915

Nos EUK's também se observam três máximos de absorção no ultravioleta, com alto valor de absorvidade molar, indicando transições de transferência de carga. Essas transições ocorrem próxima da região do visível, o que explica a mudança de coloração entre os complexos (marrom-escuro) e o ligante de partida salen (amarelo). A banda observada em ~ 400 nm para os complexos (Figura 19 e 20) ocorre praticamente na mesma posição da banda do ligante livre (v. Figura 18), o que nos impede de definir a priori tratar-se de uma transição $d-d$ do metal, embora pelo valor relativamente elevado seja mais consistente com uma transição de transferência de carga (Shriver *et al*, 2008).

4.1.3 $[Mn(aha)_3]$

O complexo $[Mn(aha)_3]$ foi obtido como descrito anteriormente, ajustando-se o pH, inicialmente igual a 3 medido com papel indicador, para 9,5 com NaOH 1 M. Observou-se a mudança de cor da solução, durante a agitação de 2,5 h, de incolor para vermelho-vinho.

Obtiveram-se os espectros no ultravioleta e visível do ligante ácido acetohidroxâmico e do complexo (Figura 23). O ligante tem somente uma forte absorção no ultravioleta, mas não é possível definir um comprimento de onda de máximo de absorção com exatidão. Já o $[Mn(aha)_3]$ apresentou máximos de absorção em 535 e 284 nm. A concentração exata de manganês na solução do complexo foi determinada por ICP-OES, e sabendo-se os valores da absorção para cada concentração, calculou-se a absorptividade molar pela Lei de Lambert-Beer (com caminho óptico igual a 1 cm) (Figura 24 e Tabela 5).

Figura 23: Espectros na região do ultravioleta-visível do complexo $[Mn(aha)_3]$ (solução aquosa).

Figura 24: Gráficos da absorbância pela concentração de [Mn(aha)₃] nos comprimentos de onda de máximo de absorção.

Tabela 5: Cálculo da absorvidade molar do [Mn(aha)₃]

λ/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	R^2
535	227	0,9563
284	3395	0,9989

A transição na região do visível, com um baixo valor de absorvidade molar é típica para uma transição entre os orbitais $d-d$ do metal. Já a transição na região do ultravioleta, com um alto índice de absorvidade molar, representa uma transferência de carga.

4.1.4 [Mn(cit)]

Preparou-se solução aquosa de [Mn(cit)] conforme descrito anteriormente. Notou-se a ocorrência de reação pela alteração de cor, de incolor para laranja, após a adição de KMnO_4 . Registraram-se espectros ultravioleta e visível de citrato de sódio e do complexo (Figura 25). O citrato de sódio não apresentou absorção no ultravioleta-visível. Entretanto o complexo [Mn(cit)] absorveu no visível em 430 nm, com absorvidade molar de $310 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, como descrito na literatura (Duke, 1947).

Figura 25: Espectro na região do visível do complexo $[\text{Mn}(\text{cit})]$ (solução aquosa).

A absorção neste comprimento de onda com uma baixa absortividade molar indica uma transição eletrônica entre os orbitais $d-d$ do manganês.

4.2 Lipofilicidade

Os resultados dos cálculos de partição octanol-água (P) estão apresentados na Tabela

6.

Tabela 6: Coeficiente de partição dos complexos em n-octanol/água a 24°C.

	$c_{\text{água}} \text{ (ppm)}$	$c_{\text{octanol}} \text{ (ppm)}$	P	$\log P$
[Mn(dfb)]	$9,77 \pm 0,0521$	$0,180 \pm 0,130$	$0,0184 \pm 6,79 \times 10^{-3}$	-1,73
[Mn(aha) ₃]	$19,6 \pm 0,0890$	$2,17 \pm 0,232$	$0,111 \pm 20,7 \times 10^{-3}$	-0,95
[Mn(cit)]	$24,2 \pm 0,139$	-	não determinado	-
EUK 8	$15,5 \pm 0,176$	$1,75 \pm 0,313$	$0,113 \pm 55,1 \times 10^{-3}$	-0,95
EUK 108	$14,0 \pm 0,0766$	$1,05 \pm 0,352$	$0,0749 \pm 27 \times 10^{-3}$	-1,13

Nota-se pelos valores negativos de $\log P$ que todos os complexos possuem maior afinidade pela fase aquosa do que pela fase orgânica, mas dentre eles o EUK 8 e o [Mn(aha)₃] foram os mais particionados para o *n*-octanol. O complexo [Mn(cit)] praticamente não teve sua concentração alterada entre a solução estoque e a fase aquosa em contato com a fase orgânica, portanto o seu coeficiente de partição foi virtualmente zero.

4.3 Voltametria Cíclica

Para o experimento prepararam-se soluções aquosas 1 mM dos complexos de Mn(III), MnCl₂, mesilato de desferrioxamina, ácido acetohidroxâmico, citrato de sódio e salen, todas elas em KCl 0,1 M. Os voltamogramas estão representados na Figura 26.

Figura 26: Voltamogramas de MnCl_2 e dos complexos de Mn(III).

Através desses voltamogramas nota-se que o íon livre Mn(II) apresenta dois processos de redução, em 0,29 e 1,00 V, e dois de oxidação, em 0,01 e 0,78 V, reversíveis, o que pode indicar sua redução a Mn(I) e Mn(0). Dentre os complexos de Mn(III), os EUK's aparentemente apresentam dois processos redutivos (EUK 8: -0,13 e 0,26 V; EUK 108: -0,12 e 0,29 V), sendo que apenas um deles é reversível (EUK 8: -0,25 V; EUK 108: -0,33 V). O citrato de Mn(III) tem uma curva pouco resolvida, que parece indicar um processo redutivo em

0,97 V reversível em 0,54 V. Os hidroxamatos [Mn(dfb)] e [Mn(aha)₃] não apresentam processos redox na janela de potenciais estudada. Além disso, nenhum dos ligantes livres apresentou qualquer atividade redox nessa faixa de potenciais (**Habib *et al*, 2006**).

4.4 Supressão da fluorescência da calceína

Inicialmente prepararam-se soluções 0, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM de [Mn(dfb)], [Mn(aha)₃], [Mn(cit)], EUK 8, EUK 108, MnCl₂, mesilato de desferrioxamina, ácido acetohidroxâmico, citrato de sódio, salen, [Fe(nta)] e [Mn(nta)].

Em uma microplaca de 96 poços adicionaram-se 200 µL de solução 2 µM de calceína em meio HBS/Chelex[®]. No leitor de microplacas iniciaram-se as medidas de fluorescência com $\lambda_{exc} = 485$ nm, $\lambda_{emi} = 520$ nm e ganho = 900. Após a estabilização das leituras, interrompeu-se a leitura, removeu-se a microplaca e adicionaram-se 10 µL das soluções acima indicadas em cada poço, fazendo com que a concentração final de cada espécie fosse 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5 e 10 µM. A leitura foi retomada até que a diminuição da fluorescência se estabilizasse. Novamente retirou-se a microplaca do aparelho e acrescentaram-se 10 µL de DTPA 1 mM em cada poço, retornando à leitura até que a fluorescência estabilizasse novamente (Figuras 27-31). O ligeiro aumento da fluorescência (em comparação com a fluorescência inicial) após a adição de DTPA pode estar relacionado à remoção de traços de metais (principalmente Fe), todavia presentes no tampão e/ou na sonda comercial. Nenhum dos ligantes apresentou diminuição na fluorescência da calceína.

Figura 27: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de $[Mn(dfb)]$ no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 28: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de $[Mn(aha)_3]$ no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 29: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de [Mn(cit)] no ciclo 22 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 72.

Figura 30: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de EUK 8 no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Figura 31: Supressão da fluorescência da calceína pela adição de EUK 108 no ciclo 6 e recuperação da fluorescência pela adição de DTPA no ciclo 37.

Na Figura 32, estão apresentados os efeitos do aumento da relação molar complexo:calceína na supressão da fluorescência da calceína. Quanto maior a estabilidade do complexo de partida, menor deveria ser a supressão da fluorescência da calceína (posto que o complexo não transferiria o íon metálico para a sonda).

Figura 32: Fluorescência da sonda em função da razão molar complexo:calceína.

Pelo ensaio de supressão da fluorescência da calceína é possível observar que os complexos EUK 8 e EUK 108 são menos suscetíveis à perda do Mn para a calceína, reduzindo a fluorescência dessa sonda em apenas 15 e 11%, respectivamente, para uma relação complexo:calceína igual a 5. Nessa mesma relação o complexo [Mn(aha)₃] suprime a fluorescência em 78%, enquanto o [Mn(cit)] suprime 58% e [Mn(dfb)] 35%. Isso indica que os complexos EUK's são os mais estáveis, ou os menos lábeis, da série de complexos utilizados. De fato, nota-se que, ao contrário do que ocorre com os EUK's, soluções aquosas do complexo hexadentado [Mn(dfb)] estocadas por longos períodos (tipicamente 2 meses) perdem sua coloração verde-esmeralda característica, o que sugere que o ambiente de coordenação salen é mais eficiente para proteger o metal contra reações de desproporcionamento. Entretanto, é de se notar que a estabilidade do complexo [Mn(dfb)], testada por essa reação de competição com a calceína, está no grupo dos complexos de alta estabilidade, o que é de se esperar, dado que a desferrioxamina é um sideróforo desenhado especificamente para a aquisição do cátion “duros” Fe(III) por microrganismos (Benite *et al*, 2002). Em laboratório observou-se que so-

lução aquosa de $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ perdeu sua coloração em cerca de 10 dias. O $[\text{Mn}(\text{cit})]$, em pH 6,8, sofre uma redução da absorção (em 430 nm) na primeira semana mas que é aumentada posteriormente, durando por até 120 dias (Klewicki e Morgan, 1998).

O polihidroxamato $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ é mais estável do que seu análogo $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$, o que é coerente com o aumento da estabilização oriundo do maior efeito quelato produzido por um ligante hexadentado (dfb) do que por um bidentado (aha) (Shriver *et al*, 2008). Por sinal, aha é o ligante com a menor denticção neste estudo; o citrato, que se comporta como ligante tetradentado, apresenta estabilidade ligeiramente superior.

4.5 Atividade pró-oxidante por fluorimetria

4.5.1 Teste com ascorbato

Prepararam-se soluções 220 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$, $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$, $[\text{Mn}(\text{cit})]$, EUK 8, EUK 108, mesilato de desferrioxamina, ácido acetohidroxâmico, citrato de sódio, salen, MnCl_2 e $[\text{Fe}(\text{nta})]$ e soluções 0, 27,5, 55, 110, 220 e 440 μM de ascorbato. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 10 μL de um dos compostos metálicos ou dos ligantes e 10 μL das diferentes soluções de ascorbato. Em seguida adicionou-se 200 μL de solução de DHR 50 μM em tampão HBS/Chelex®. A microplaca foi levada para leitura de fluorescência, com $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$, ganho = 600 e incubação a 37 °C. Registraram-se os dados da inclinação da curva de fluorescência pela concentração de ascorbato (Figura 33). O complexo $[\text{Fe}(\text{nta})]$ foi estudado como um controle positivo de aumento de oxidação de DHR em função da concentração de ascorbato (Espósito *et al*, 2002b).

Figura 33: Taxa de fluorescência em função da concentração de ascorbato.

A análise da Figura 33 revela dois fatos importantes:

- 1) Na *ausência* de ascorbato, dois complexos de Mn(III), o [Mn(dfbb)] e o [Mn(cit)] (mais marcadamente o primeiro), oxidam fortemente a sonda.
- 2) No caso do complexo Fe(nta), o comportamento pró-oxidante favorecido pela concentração de ascorbato foi verificado, conforme descrito originalmente (**Espósito *et al*, 2002b**). Entretanto, um efeito contrário foi observado para os complexos [Mn(dfbb)] e [Mn(cit)]: suas atividades pró-oxidantes *decrecem* à medida que se aumenta a concentração de ascorbato.

Realizamos alguns outros experimentos para estudar melhor ambos os fenômenos.

1) Efeito do O_2 em ausência de ascorbato

Para estudarmos melhor tal propriedade do [Mn(dfbb)], procedemos a um teste similar onde a concentração desse complexo foi variada. Para isso, prepararam-se soluções por dilui-

ção serial de 0 a 2000 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e mesilato de desferrioxamina. Em uma microplaca adicionou-se 10 μL das soluções, cada uma em um poço, e 200 μL de DHR 50 μM . Esta microplaca também foi levada para leitura de fluorescência, com $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$, ganho = 600 e incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$. Obteve-se a inclinação da curva de fluorescência da onda em função da concentração de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ (Figura 34).

Figura 34: Taxa de fluorescência em função da concentração de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e dfb.

Pela inspeção dessa figura é possível observar que o complexo $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ oxida a sonda fluorimétrica, mesmo na ausência de pró-oxidantes como ascorbato. O mecanismo é desconhecido até o momento. Uma suposição é a oxidação pelo oxigênio atmosférico do $\text{Mn}(\text{III})$ gerando um complexo $\text{Mn}(\text{V})$ -oxo que é fortemente oxidante e que por sua vez pode oxidar a sonda fluorimétrica, por analogia ao já sugerido como sendo o mecanismo de atividade catalase do EUK 8 (Amaral e Espósito, 2008). Outra hipótese é a geração de oxigênio singlete por um mecanismo similar ao que ocorre com o $\text{Cu}(\text{II})$ (Frelon *et al*, 2003).

Para avaliar a participação do oxigênio nesse mecanismo fez-se novamente este teste, mas variando a quantidade de oxigênio dissolvido na solução. Borbulhou-se 50 mL do tampão HBS/*Chelex* com N_2 (Oxilúmen) por 10 min num fluxo de 3 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Esta solução foi mistu-

rada nas devidas proporções com tampão sem borbulhamento com N_2 para originar soluções com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (o tampão nas condições normais de bancada foi considerado 100% em O_2). Prepararam-se soluções 200 μM de $[Mn(df b)]$, mesilato de desferrioxamina, $MnCl_2$ e $[Fe(nta)]$ (Figura 35). Em seguida, em microplacas adicionaram-se 10 μL das soluções, cada uma em um poço, e 200 μL de DHR 50 μM , preparado com as diferentes soluções de O_2 . As microplacas foram levadas para leitura de fluorescência, com $\lambda_{exc} = 485$ nm, $\lambda_{emi} = 520$ nm, ganho = 600 e incubação a 37 °C. Obteve-se a inclinação da curva de fluorescência da onda pela concentração de oxigênio dissolvido (Figura 35).

Figura 35: Taxas de fluorescência em função da saturação relativa de oxigênio no tampão.

Através desse gráfico podemos observar que a oxidação promovida pelo $[Mn(df b)]$ na sonda fluorimétrica aumenta conforme se aumenta a quantidade de oxigênio no meio. Isso indica que o oxigênio participa do mecanismo de atividade pró-oxidante do complexo, mas ainda não foi possível elucidar completamente como isto ocorre. Como visto anteriormente, é possível que o O_2 oxide o $Mn(III)$ a formas mais instáveis ($Mn(V)$), mas também pode signi-

ficar que a presença de O_2 na solução mantenha o centro metálico no estado de oxidação tri-valente, impedindo um eventual (e lento) processo de desproporcionamento, mesmo estando o metal formando parte de um complexo.

2) Efeito do ascorbato sobre complexos de Mn(III)

O efeito do ascorbato sobre os compostos de Mn(III) foi estudado também através de medidas fotométricas. Prepararam-se soluções 3,125 mM dos complexos [Mn(dfb)], [Mn(cit)] e [Mn(aha)₃] e 0, 0,98, 1,95, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25 e 62,5 mM de ascorbato. Numa microplaca de 96 poços adicionou-se 40 μ L da solução de ascorbato, cada concentração num poço, em 4 linhas horizontais da placa e em cada linha 160 μ L de uma das soluções dos complexos, sendo que na quarta linha adicionou-se água. Em seguida obteve-se um espectro de varredura dessa microplaca na região do visível para todos os complexos (Figuras 36, 37 e 38) no equipamento ELISA (Infinite M2000 - Tecan) de responsabilidade do Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista (IQUSP). Em seguida obtiveram-se gráficos da absorbância no máximo de cada um dos complexos em função da concentração de ascorbato (Figura 39).

Figura 36: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 37: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 38: Espectros de absorção no visível de $[\text{Mn}(\text{cit})]$ em função da concentração de ascorbato.

Figura 39: Absorbâncias nos máximos de $[Mn(dfb)]$ (636 nm), $[Mn(cit)]$ (430 nm) e $[Mn(aha)_3]$ (535 nm) em função da concentração de ascorbato.

A perda de coloração nos três casos acima (Figuras 36 – 38) é indicativa da redução dos complexos de Mn(III) aos seus análogos de Mn(II), promovida pelo ascorbato. Essa redução dá-se em proporções equimolares complexo:ascorbato (Figura 39). Isso explica porque a inclinação da curva de fluorescência diminui à medida que se aumenta a concentração de ascorbato na presença dos complexos (Figura 33). Os complexos de Mn(III) são bons oxidantes, mas sua redução a Mn(II) (promovida pelo ascorbato) torna essas espécies pouco reativas, como o próprio $MnCl_2$ (Figura 33). Nesse ponto é interessante notar que essa propriedade *in vitro* pode ter significância clínica, pois o ascorbato diminuiu os danos causados pelo manganês em

células PC12 (**Desole *et al*, 1997**). Estes fatos justificam a eficiência de tratamentos que incluem a vitamina C em pacientes com manganismo (**Rafael, 1957; Lee, 2000**)

4.5.2 Teste com peróxido

Prepararam-se soluções 220 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$, $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$, $[\text{Mn}(\text{cit})]$, EUK 8, EUK 108, mesilato de desferrioxamina, ácido acetohidroxâmico, citrato de sódio, salen, MnCl_2 e $[\text{Fe}(\text{nta})]$ e soluções 0, 0,11, 0,22, 0,44, 0,88 e 1,76 mM de peróxido de hidrogênio (a concentração de H_2O_2 foi determinada fotometricamente pelo método de (**Cotton e Dunford, 1973**)). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 10 μL de cada um dos compostos metálicos ou dos ligantes e 10 μL das diferentes soluções de peróxido. Em seguida adicionou-se 200 μL de solução de DHR 50 μM . A microplaca foi levada para leitura de fluorescência, com $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$, ganho = 600 e incubação a 37 °C. Registraram-se os dados da inclinação da curva de fluorescência em função da concentração de peróxido (Figura 40).

Figura 40: Taxa de fluorescência em função da concentração de peróxido.

Observou-se que nas condições experimentais os complexos EUK 8 e EUK 108 atuam como pró-oxidantes dependentes de peróxido, promovendo a oxidação da sonda DHR. Este comportamento está relacionado com o mecanismo de mimético da catalase que esses complexos possuem (XIII) (Amaral e Espósito, 2008).

Assim, uma baixa proporção estequiométrica de H_2O_2 em relação aos EUK's levaria a um aumento da concentração da espécie fortemente oxidante $\text{Mn(V)}\text{O}^{2-}$.

Já os outros complexos, os ligantes e o próprio peróxido sozinho não promovem a oxidação ou o fazem muito pouco. Interessantemente o dano à sonda DHR promovido pelo complexo $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ é independente da concentração de peróxido. Isso indica que este com-

plexo não apresenta ação mimética de catalase, como ocorre com os EUK's, talvez pelo fato de que, no complexo [Mn(dfb)], o acesso de H_2O_2 seja dificultado pelo ligante hexadentado.

Para avaliar o efeito de antioxidantes nessas reações, utilizou-se a glutathiona (GSH) e o Trolox[®]. Prepararam-se soluções 200 μM dos complexos de Mn(III), 1,6 mM de H_2O_2 , 0, 0,781, 1,56, 3,13, 6,25 e 12,5 mM de GSH e 0, 15,6, 31,3, 62,5, 125, e 250 μM de Trolox[®]. Numa microplaca de 96 poços adicionaram-se 80 μL das soluções de GSH ou de Trolox[®], 10 μL das soluções dos complexos, 10 μL da solução de peróxido e 100 μL de solução 100 μM de DHR. Em seguida fez-se a leitura de fluorescência, com $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$, ganho = 600 e incubação a 37 °C (Figuras 41 e 42).

Figura 41: Taxa de fluorescência em função da concentração de glutathiona.

Figura 42: Taxa de fluorescência em função da concentração de Trolox[®].

Tanto a glutathiona quanto o Trolox[®] reduziram a atividade pró-oxidante dos complexos, o que era esperado, pois já é bem conhecido que ambos os compostos apresentam atividade antioxidante (**Halliwell e Gutteridge, 2007**). Entretanto, curiosamente Trolox[®] reduz apenas metade da taxa de oxidação da sonda promovida por [Mn(dfb)].

4.5.3 Teste com superóxido

Prepararam-se soluções 220 μ M de [Mn(dfb)], [Mn(aha)₃], [Mn(cit)], EUK 8, EUK 108, mesilato de desferrioxamina, ácido acetohidroxâmico, citrato de sódio, salen, MnCl₂ e [Fe(nta)] e soluções aquosas 0, 0,11, 0,22, 0,44, 0,88 e 1,76 mM de superóxido de potássio (essas soluções de superóxido foram preparadas imediatamente antes do experimento, pois este ânion rapidamente se desproporciona). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 10 μ L de um dos compostos metálicos ou dos ligantes e 10 μ L das dife-

rentes concentrações de superóxido. Em seguida adicionou-se 200µL de solução de DHR 50 µM.

A microplaca foi levada para leitura de fluorescência, com $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 520 \text{ nm}$, ganho = 600 e incubação a 37 °C.

Registraram-se os dados da inclinação da curva de fluorescência em função da concentração de superóxido (Figura 43).

Figura 43: Taxa de fluorescência em função da concentração de superóxido.

Nota-se que o comportamento com o ânion superóxido foi muito similar aquele apresentado quando a mistura pró-oxidante era composta de peróxido. Como não tivemos sucesso na solubilização do superóxido em DMSO, a reação foi executada em meio aquoso. Nesse caso, é razoável supor que o superóxido tenha se desproporcionado a peróxido e oxigênio (XIV) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

4.6 Toxicidade aguda em paulistinha

Para este estudo escolheram-se os complexos [Mn(dfb)] e EUK 108, por terem se mostrado pró-oxidantes, e o [Mn(aha)₃], por se tratar de um complexo inédito. Para cada complexo separaram-se 4 aquários de 5 litros cada. Um destes quatro foi o controle (apenas água) e os outros continham solução aquosa 20, 200 e 1000 (520 para o [Mn(aha)₃]) µM. Em seguida, dentro de cada aquário adicionaram-se 10 peixes que passaram pela aclimação (instante t = 0). Como foi descrito anteriormente, mediu-se a temperatura e o pH de todos os aquários depois de 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas e houve acompanhamento de mortalidade e mudanças nos comportamentos dos animais (Tabelas 7, 8 e 9). Com essas informações foram montadas curvas da porcentagem de sobrevivência em função do tempo para cada um dos complexos (Figura 44).

Tabela 7: Valores de t e pH dos aquários contendo [Mn(dfb)] e observações sobre o comportamento dos peixes.

0h	pH*	t/°C	Obs.
0 µM	6,81	22,6	
20 µM	7,73	22,7	
200 µM	8,70	22,8	
1000µM	9,65	23,0	
3h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,60	22,6	
20 µM	7,47	22,6	
200 µM	7,76	22,7	
1000µM	7,11	22,8	
6h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,07	22,8	
20 µM	6,79	22,8	
200 µM	7,49	22,9	
1000µM	7,04	22,9	
24h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	6,20	22,2	
20 µM	6,34	22,2	
200 µM	6,80	22,3	
1000µM	6,94	22,4	
48h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	6,01	21,8	
20 µM	6,27	21,9	
200 µM	6,60	21,9	
1000µM	6,85	22,0	
72h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	6,60	21,9	
20 µM	6,69	21,9	
200 µM	7,00	22	
1000µM	7,16	22,2	
96h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	6,71	22,3	
20 µM	6,80	22,3	
200 µM	7,04	22,4	
1000µM	7,07	22,5	2 mortes

*em t = 0, ajustado para pH ~7 com HCl 2M quando necessário.

Tabela 8: Valores de t e pH dos aquários contendo $[\text{Mn(aha)}_3]$ e observações sobre o comportamento dos peixes.

0h	pH*	t/°C	Obs.
0 μM	7,31	26,5	
20 μM	8,73	26,6	
200 μM	8,84	26,6	
520 μM	8,69	26,6	
3h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,30	25,8	1 morto
20 μM	6,77	25,2	
200 μM	6,96	25,2	
520 μM	6,83	25,2	1 peixe com pouca movimentação
6h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,23	25,7	
20 μM	6,84	25,4	
200 μM	6,97	25,4	
520 μM	6,83	25,4	
24h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,26	26,1	
20 μM	7,08	26,0	2 mortos
200 μM	7,03	26,0	
520 μM	6,87	26,0	O que estava se mexendo pouco morreu
48h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,25	27,1	
20 μM	7,06	26,9	
200 μM	7,06	26,9	
520 μM	6,85	26,9	
72h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,21	27,2	
20 μM	7,14	27,1	
200 μM	7,11	27,1	
520 μM	6,84	27,1	
96h	pH	t/°C	Obs.
0 μM	7,22	25,1	
20 μM	7,22	25,0	
200 μM	7,20	25,0	
520 μM	6,88	25,0	

* em t = 0, ajustado para pH ~7 com HCl 2M quando necessário.

Tabela 9: Valores de t e pH dos aquários contendo EUK 108 e observações sobre o comportamento dos peixes.

0h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,12	26,8	
20 µM	6,89	26,7	
200 µM	7,01	26,7	
1000 µM	7,13	26,7	
3h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,10	26,6	
20 µM	6,99	26,7	Pouca movimentação de todos os peixes
200 µM	7,02	26,7	
1000 µM	7,17	26,7	
6h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,64	26,5	
20 µM	6,91	26,6	
200 µM	7,09	26,7	
1000 µM	7,22	26,5	
24h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,33	26,7	4 mortos e 1 nadando de lado
20 µM	7,41	26,7	5 mortos
200 µM	7,36	26,7	7 mortos e 1 nadando de lado
1000 µM	7,46	26,7	10 mortos
48h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,09	26,1	2 mortos sendo 1 o que estava nadando de lado
20 µM	7,26	26,1	
200 µM	7,36	26,1	1 morto, o que estava nadando de lado
1000 µM	--	--	
72h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	6,98	27,1	
20 µM	7,22	27,1	
200 µM	7,34	27,1	
1000 µM	--	--	
96h	pH	t/°C	Obs.
0 µM	7,11	27,2	
20 µM	7,45	27,2	
200 µM	7,67	27,2	
1000 µM	--	--

Figura 44: Porcentagem de sobrevivência dos paulistinhas em função do tempo a que foram expostos aos complexos [Mn(dfbb)], [Mn(aha)₃] e EUK 108. Os valores nos boxes correspondem à concentração (μM) dos complexos estudados.

Como é possível observar, os peixes sobreviveram relativamente bem quando expostos ao $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ e houve uma ligeira letalidade quando expostos ao $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$. Isso pode estar relacionado à menor estabilidade termodinâmica do $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ em comparação com o $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ averiguada pela competição com calceína, conforme discutido anteriormente (Item 4.4). Então, aparentemente a toxicidade dessas espécies seria função mais da sua capacidade de entregar o íon metálico ao órgão-alvo do que de eventuais propriedades pró-oxidantes que esses possam apresentar (a do complexo $[\text{Mn}(\text{dfb})]$, como visto, é bem maior do que a do complexo $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$, e independe da presença de pró-oxidantes). Isso não é de se estranhar dado que, no meio citossólico de organismos, o ambiente é altamente redutor, podendo atingir concentrações de glutatona de até 5 mM (**Halliwell e Gutteridge, 2007**), e como visto (Seções 4.5.1 e 4.5.2), esse antioxidante, assim como o ascorbato e o Trolox®, bloqueia eficientemente o dano provocado pelos complexos de Mn(III) em moléculas orgânicas (DHR). Tal efeito protetor já foi verificado em células em cultura tratadas com EUK 8 (**Amaral e Espósito, 2008**). Portanto, um animal saudável (com as defesas antioxidantes operacionais) em princípio teria menor probabilidade de sofrer os efeitos agudos do dano oxidativo provocado por Mn(III), ao menos no grau de desenvolvimento empregado neste estudo (animais adultos). Restaria avaliar o efeito da exposição crônica a esses complexos.

Em paralelo a essa discussão, é interessante notar que nossos dados de atividade pró-oxidante (e da sua reversão pela presença de antioxidantes) poderiam portanto ser preditivos da toxicidade ou não de um determinado complexo metálico. As possibilidades de simplificação de testes *in vitro* decorrentes da eventual verificação dessa hipótese são enormes e merecem ser mais estudadas.

Além disso, $[\text{Mn}(\text{aha})_3]$ foi um dos complexos que apresentou maior lipofilicidade e talvez tenha tido uma difusão um pouco mais facilitada para as células do peixe, causando a mortalidade apresentada, ainda que modesta.

Já quando expostos ao EUK 108 houve um aumento significativo de mortes, entretanto não se pode concluir que o complexo foi o único responsável por esse efeito, pois no controle (peixes em água limpa) houve 60% de mortes. Neste caso, o motivo que levou estes peixes à morte é desconhecido e o experimento para o EUK 108 ficou comprometido.

De acordo com trabalhos recentes de outros membros do nosso grupo de pesquisa, a LC50 (concentração letal para 50% da população) de diferentes espécies de Mn em embriões de *Danio rerio* atingiu valores entre 3,34 mM e 80 mM do metal (**Hernández, 2009**), muito maiores do que os estudados aqui. Além disso, o fato de que os peixes adultos são mais resistentes do que os embriões explicaria a ausência de danos neurotóxicos observados neste trabalho, o que também está de acordo com resultados do grupo, onde embriões de paulistinha são progressivamente menos suscetíveis à toxicidade do Mn em função do tempo pós-fertilização (**Hernández, 2009**).

4.7 Análise histológica

Os peixes que sobreviveram ao teste de toxicidade aguda foram anestesiados e tiveram suas cabeças cirurgicamente removidas, sendo imediatamente introduzidas na solução do fixador, e após 24 h, transferidas para uma solução de etanol 70%, por mais 24 h. Em seguida foram descalcificadas e tratadas novamente em etanol 70%. Com um exemplar que estava no aquário de controle e outros dois que estavam no aquário contendo 1000 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$, procedeu-se as etapas de inclusão em parafina até o preparo das lâminas de microscópio. As lâminas foram analisadas e obtiveram-se as seguintes imagens (Figuras 45, 46 e 47).

Figura 45: Cortes sequenciais do telencéfalo de peixe do grupo controle (ampliação: esquerda -10×; direita - 20×).

Figura 45 (cont): Cortes seqüenciais do telencéfalo de peixe do grupo controle (ampliação: esquerda -10×; direita - 20×).

1

2

Figura 46: Cortes seqüenciais do telencéfalo de um peixe exposto a 1000 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ (ampliação: esquerda -10 $\times$; direita - 20 $\times$).

Figura 47: Cortes seqüenciais do telencéfalo de um peixe exposto a 1000 μM de $[\text{Mn}(\text{dfb})]$ (ampliação: esquerda -10 $\times$; direita - 20 $\times$).

Analisando os telencéfalos na região do núcleo dorsal, Vd (v. Figura 8), não se observa nenhuma alteração morfológica entre o controle e os peixes expostos à maior concentração do complexo, indicando que se o complexo causou algum dano ao organismo do peixe, não foi nessa região do cérebro. Biópsias mais completas, incluindo a do tecido das brânquias, que pode se inflamar pela contaminação com íons metálicos, são necessárias para esclarecer mais completamente o mecanismo de toxicidade dos complexos de Mn(III) (**Correia, 2008**). No caso de neurônios, sabe-se que disfunções no metabolismo energético (lactato, ascorbato) são provocadas por espécies ambientalmente relevantes de Mn, ao menos em alguns estágios de diferenciação (**Hernández, 2009**).

5. CONCLUSÕES

As etapas de síntese dos complexos foram bem sucedidas, sendo obtidos conforme descrito na literatura. Houve dificuldades quanto à obtenção de alguns deles na forma sólida, sendo que apenas EUK 8 e EUK 108 originaram produtos sólidos e a liofilização do [Mn(dfb)] originou uma mistura de sólidos. Portanto para apenas estes três compostos foram obtidos espectros na região do infravermelho. A espectroscopia no ultravioleta-visível foi uma importante ferramenta para caracterizar estes complexos, e o cálculo da absorvidade molar do [Mn(aha)₃] merece destaque, pelo fato de ser um complexo inédito. O ensaio de lipofilicidade demonstrou que todos os complexos são pouco lipofílicos, mas o [Mn(aha)₃] e o EUK 8 foram os que apresentaram maior lipofilicidade.

Os testes de supressão da fluorescência da calceína apresentaram os complexos EUK 8 e EUK 108 com uma estabilidade relativa superior aos outros complexos, sendo o [Mn(aha)₃] menos estável que seu análogo hexadentado [Mn(dfb)] devido à menor denticção do acetohidroxamato quando comparado à desferrioxamina.

A atividade pró-oxidante dos complexos aponta o [Mn(dfb)] como um composto fortemente pró-oxidante mas dependente de O₂. Os mecanismos para esse comportamento ainda não foram totalmente elucidados. Os complexos EUK 8 e EUK 108 apresentaram uma clara atividade pró-oxidante a proporções estequiométricas em relação ao H₂O₂ estudadas, o que sugere a formação de um intermediário Mn(V)-O²⁻ fortemente oxidante. Também foi possível inferir que o ascorbato reduz os complexos para Mn(II), inativando seu potencial como pró-oxidante, o que pode ter implicações para a terapia do manganismo, e que os antioxidantes GSH e Trolox[®] efetivamente reduzem a atividade pró-oxidante dos complexos.

Com base nos ensaios realizados, os complexos [Mn(dfb)] e EUK 108 mostraram-se como possíveis indutores de danos neurológicos em *Danio rerio*, pois o centro de Mn(III) é

estabilizado por um eficiente sistema quelante. Além disso, o complexo $[Mn(aha)_3]$ também foi incluído no teste, por se tratar de um composto não descrito na literatura. De fato, no experimento de toxicidade aguda, observou-se algumas mortes e alterações comportamentais entre os peixes, que provavelmente estão indiretamente relacionadas à estabilidade termodinâmica dos complexos ou diretamente relacionadas às suas lipofilicidades. Entretanto a análise morfológica do telencéfalo de alguns peixes tratados com $[Mn(dfb)]$ não apresentou nenhuma alteração visível em relação aos peixes que permaneceram em água limpa, sugerindo que apenas estágios de desenvolvimento inferiores (embriões) sejam suscetíveis à toxicidade por Mn e, portanto, bioindicadores adequados da contaminação por esse metal.

6. Bibliografia

- Amaral, S. e Espósito, B.P. *Fluorimetric study of the pro-oxidant activity of EUK 8 in the presence of hydrogen peroxide. Biometals* (2008) **21**, 425-432.
- Aschner, M. e Aschner, J.L. *Manganese neurotoxicity – cellular effects and blood-brain-barrier transport. Neurosci. Biobehav. Rev.* (1991) **15**, 333-340.
- Aschner, M.; Guilarte, T.R.; Schneider, J.S.; Zheng, W. *Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. Toxicol. and Appl. Pharmacol.* (2007) **221**, 131-147.
- Baffert, C.; Collomb, M.N.; Deronzier, A.; Knudsen, S.K.; Latour, J.M.; Lund, K.H.; McKenzie, C.J.; Mortensen, M.; Nielsen, L.P. e Thorup, N. *Biologically relevant mono- and di-nuclear manganese II/III/IV complexes of mononegative pentadentate ligands. Dalton Transactions* (2003), 1765-1772.
- Baker, K.; Marcus, C.B.; Huffman, K.; Kruk, H.; Malfroy, B.; Doctrow, S.R. *Synthetic combined superoxide dismutase catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: A key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. J. of Pharmacology and Exp. Therapeutics* (1998) **284**, 215-221.
- Benite, A.M.C.; Machado, S.D.; Machado, B.D. “*Sideróforos: ‘uma resposta dos microorganismos’*” *Química Nova* (2002) **26**, 1155-1164.
- Boucher, L.J. *Manganese Schiff’s Base Complexes – 2: Synthesis and spectroscopy of Chloro-complexes of some derivatives of (Salicylaldehydeethylenediimato) manganese(III). J. Inorg. Nucl. Chem.* (1974) **36** 531-536.
- Correia, T.G. *Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais*. Dissertação de mestrado, IB-USP, 2008.
- Cotton, M.L. e Dunford, H.B. *Studies on Horseradish-peroxidase – 11: Nature of compounds I and II as determined from kinetics of oxidation of ferrocyanide. Can. J. Chem.* (1973) **51**, 582-587.
- Crossgrove, J.S.; Allen, D.D.; Bukaveckas, B.L.; Rhineheimer, S.S.; Yokel, R.A. *Manganese distribution across the blood-brain barrier I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferring. Neurotoxicology* (2003) **24**, 3-13.
- Cuzzocrea, S. ; Zingarelli, B. ; Constantino, G. ; Caputi, A.P. *Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-induced pleurisy. Free Radical Biol. Med.* (1999) **26**, 25-33.
- Dearden, J.C. e Bresnen, G.M. *The measurement of partition coefficients. Quant. Struct-Act. Relat.* (1988) **7**, 133-144.

Desole, M.S.; Esposito, G.; Migheli, R.; Sircana, S.; Delogu, M.R.; Fresu, L.; Miele, M.; De Natale, G.; Miele, E. *Glutathione deficiency potentiates manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. Pharmacol. Res.* (1997) **36**, 285-292.

Dobson, A.W.; Erikson, K.M.; Aschner, M. *Manganese neurotoxicity. Redox-active metals in Neurol. Disord.* (2004) **1012**, 115-128.

Doctrow, S.R.; Huffman, K.; Marcus, C.B. *Salen-manganese complexes as catalytic scavengers of hydrogen peroxide and cytoprotective agents: structure-activity relationship studies. J. Med. Chem.* (2002) **45** 4549-4558.

Domico, L.M. ; Zeevalk, G.D. ; Bernard, L.P.; Cooper, K.R. *Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. Neurotoxicology* (2006) **27**, 816-825.

Duke, F.R. *The theory and kinetics of specific oxidation – I: The trivalent manganese oxalate reaction. J. Am. Chem. Soc.* (1947) **69**, 2885-2888.

Erikson, K.M.; Syversen, T.; Aschner, J.L.; Aschner, M. *Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2005) **19**, 415-421.

Espósito, B.P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Hershko, C. e Cabantchik, Z.I. *Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. Blood* (2003) **102**, 2670-2677.

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.* (2002a) **32**, 42-49.

Espósito, B.P.; Epsztejn, S.; Breuer, W. e Cabantchik, Z.I. *A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. Anal. Biochem.* (2002b) **304**, 1-18.

Farkas, E.; Enyedy, E.A.; Csóka, H. *A comparison between the chelating properties of some dihydroxamic acids, desferrioxamine B and acetohydroxamic acid. Polyhedron* (1999) **18**, 2391-2398.

Faulkner, K.M.; Stevens, R.D. e Fridovich, I. *Characterization of Mn(III) complexes of linear and cyclic desferrioxamines as mimics of superoxide-dismutase activity. Arch. Biochem. Biophys.* (1994) **310**, 341-346.

Freeland-Graves, J.H.; Bose, T.; Karbassian, A. in Gielen, M.; Tiekink, E. (eds.) *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents*, Wiley, 2005.

Frelon, S.; Douki, T.; Favier, A.; Cadet, J. *Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. Chem. Res. Toxicol.* (2003) **16**, 191-197.

Gerber, G.B.; Léonard, A. e Hantson, P. *Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2002) **42**, 25-34.

Habib, A.; Shireen, T.; Islam, A.; Begum, N.; Alam, A.M.S. *Cyclic voltammetric studies of copper and manganese in the presence of L-leucine using glassy carbon electrode. Pak. J. Anal. & Envir. Chem.* (2006) **7**, 96-102.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. in *Free Radicals in biology and medicine* 4ª edição (2007), Oxford University Press Inc., New York.

Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Molecular Probes, Inc., 2001.

Hernández, R.B. *Manganês: o papel do fracionamento químico e da especiação como determinantes de seu comportamento geoquímico e neurotóxico nos organismos em desenvolvimento*. Tese de doutorado, IQ-USP, 2009.

Hill, A.J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R.E. *Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol. Sci.* (2005), **86**, 6-19.

Hughes, N.P.; Williams, R.J.P. in Graham, R.D.; Hannam, R.J.; Uren, N.C. (eds.) *Manganese in Soils and Plants*, Kluwer Academic, 1988.

International Manganese Institute (IMnI) <http://www.manganese.org>, acessado em 12/08/2009

Klewicki, J.K.; Morgan, J.J. *Kinetic behavior of Mn(III) complexes of pyrophosphate, EDTA, and citrate. Environ. Sci. Technol.* (1998) **32**, 2916-2922.

Lee, J-W. *Manganese Intoxication. Arch. Neurol.* (2000) **57**, 597-599.

Melov, S. *Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. The International J. of Biochem. and Cell Biol.* (2002) **34**, 1395-1400.

Ministério da Saúde, portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

Muscoli, C. ; Cuzzocrea, S. ; Riley, D.P. ; Zweier, J.L. ; Thiernemann, C. ; Wang, Z. ; Salvemini, D. *On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. Br. J. Pharmacol.* (2003) **140**, 445-460.

Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B*, 5ª edição. Wiley Interscience, New York, 1997.

O'Hare, D.; Fucassi, F.; Cragg, P.J. e Green, M.H.L. *The voltammetric behavior of superoxide dismutase/catalase mimics. Electroanalysis* (2003) **15**, 1101-1107.

OECD Guideline for testing of chemicals 107, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method* (1995).

OECD Guideline for testing of chemicals 203, *Fish Acute Toxicity Test* (1992).

- Pearse, A.G.E. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill, London, 1961.
- Rafael, P. *Diagnosis and treatment of manganese intoxication: report of a case*. *Arch. Ind. Health*. (1957) **16**, 64-66.
- Reaney, S.H.; Smith, D.R. *Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells*. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* (2005) **205**, 271-281.
- Rink, E. e Wullimann, M.F. *Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (Danio rerio)*. *Brain Res.* (2004) **1011**, 206-220.
- Rink, E. e Wullimann, M.F. *The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (shiatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum)*. *Brain Res.* (2001) **889**, 316-330.
- Salvemini, D. Muscoli, C.; Riley, D.P.; Cuzzocrea, S. *Superoxide dismutase mimetics*. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* (2002) **15**, 439-447.
- Saric, M.; Lucchini, R. *Manganese. Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, 2007.
- Shriver, D.F.; Atkins, P.W.; Overton, T.L.; Rourke, J.P.; Weller, M.T. e Armstrong, F.A. *Química Inorgânica*. Tradução da 4ª edição, Bookman, 2008.
- Siebner-Freibach, H.; Yariv, S.; Lapidés, Y.; Hadar, Y.; Chen, Y. *Thermo-FTIR spectroscopic study of the siderophore ferrioxamine B: Spectral analysis and stereochemical implications of iron chelation, pH, and temperature*. *J. Agric. Food Chem* (2005) **53**, 3434-3443.
- Sotogaku, N.; Oku, N.; Takeda, A. *Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection*. *J. of Neurosci Res.* (2000) **61**, 350-356.
- Spitsbergen, J.M. and Kent, M.L. *The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations*. *Toxicol. Pathol.* (2003) **31**, 62-87.
- Takeda, A. *Manganese action in brain function*. *Brain Res. Rev.* (2003) **41**, 79-87.
- U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *Toxicological Profile for Manganese*, Setembro 2000.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) - *Health Effects Support Document for Manganese*. EPA Nº 822R03003, Washington, DC, USA, Fevereiro, 2003.
- Walsh, M.P. *The global experience with lead in gasoline and the lessons we should apply to the use of MMT*. *Am. J. Ind. Med.* (2007) **50**, 853-860.
- World Health Organization (WHO), *Guidelines for drinking-water quality*, 2006.
- World Health Organization (WHO), *Manganese and its compounds: environmental aspects*, 2004.

Wullimann, M.F. e Mueller, T. *Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. J. Comp. Neurol.* (2004) **475**, 143-162.

Zelikoff, J.T. *Metal pollution-induced immunomodulation in fish. Rev. of Fish Disease* (1993) **3**, 305-325.

Zheng, W. ; Kim, H. ; Zhao, Q. *Comparative toxicokinetics of manganese chloride and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in Sprague-Dawley rats. Toxicol. Sci.* (2000), **54**, 295-301.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Anderson Arndt

Local e data de nascimento: São Paulo/SP em 13 de maio de 1983

2. EDUCAÇÃO

Ensino Médio no Instituto Concórdia de São Paulo, São Paulo, 2000

Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas na Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, 2007-2009

4. PUBLICAÇÕES

- Esposito, B.P.; ARNDT, Anderson ; AMARAL, S. Fluorimetric study of the pro-oxidant activity of Mn(III) complexes. In: 38th International Conference on Coordination Chemistry, 2008, Jerusalém. Livro de Resumos, 2008.

- ARNDT, Anderson ; Esposito, B.P. . Supressão de fluorescência e atividade pró-oxidativa de complexos de manganês(III). In: 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2008.

- ARNDT, Anderson ; VALVASSORI FILHO, A. ; FRANCO, A ; PENTEADO, José Carlos P ; CARVALHO, Lilian R F de . O que inalamos dentro de um carro novo?. In: 13 Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói. Livro de Resumos, 2005.

- ARNDT, Anderson ; PENTEADO, José Carlos P ; CARVALHO, Lilian R F de . Avaliação de adsorventes sólidos usados para amostragem de gases no ar. 13 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, São Carlos - SP.