UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Compostos de ferro de interesse farmacológico: Avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil

HECTOR AGUILAR VITORINO

TESE DE DOUTORADO

Área: Química

Versão corrigida

Orientador: Breno Pannia Espósito

São Paulo

Data de depósito na SPG: 18/11/2015

HECTOR AGUILAR VITORINO

Compostos de ferro de interesse farmacológico: Avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Breno Pannia Espósito

São Paulo

2015

"Em algum lugar, algo incrível espera para ser conhecido"

Carl Sagan

À minha mãe Paulina, ao meu pai Genaro

(In memoriam), ao Miguel e aos meus irmãos

Mirian, Elizabeth, Genaro, Elvira, Miguel,

Angel, Luis e Jennifer.

Agradecimentos Especiais

Aos meus pais, ***Paulina Vitorino Quiñones e Genaro Aguilar Castro, e a Miguel Angel Vargas Arqque*** *pelo exemplo de perseverança, pelas lições ao longo da vida, principalmente por sempre me incentivarem a estudar, adquirir novos conhecimentos e por aceitarem minha ausência em vários momentos.*

Ao meu grande amor, ***Priscila Ortega****,*
por sempre me apoiar em todas as formas de ajuda, carinho, amor e dedicação.

Aos meus irmãos ***Mirian, Elizabeth, Genaro, Elvira, Miguel, Angel, Luis e Jennifer,*** *por tudo que aprendi, pelo apoio constante e a força que me deram a longa distância durante minha estadia em São Paulo.*

Aos meus sobrinhos ***Valery, Patrícia, Enrique, Grace, Estefani, Thiago, Carito, Briana e Noah*** *que são a grande alegria da família.*

Ao ***Prof. Dr. Breno Pannia Espósito****,*
por me receber de portas abertas em seu laboratório, por todo ensinamento e ajuda sempre que precisei, pela sua empolgação contagiante pela ciência e em especial pela grande amizade.

Agradecimentos

*À **profa. Flavia Pinheiro Zanotto,** pela colaboração incondicional como o uso de laboratório, discussões de biologia marinha e em especial a amizade.*

*À **Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira,** por todo o empenho em me auxiliar sempre que precisei.*

*À **Profa. Dra. Liane Marcia Rossi,** pela colaboração do uso de laboratório e orientações na sua especialidade.*

*Ao **Prof. Dr. Flavio Maron Vichi**, pela colaboração no uso do equipamento de difração de raios-X.*

*Ao **Prof. Josef Wilhelm (Willi) Baader,** pelo apoio financeiro para meu desenvolvimento como pesquisador na realização deste projeto.*

*À **Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva,** pela seriedade permanente oferecida no momento de ser qualificado para encaminhar meu título de doutor.*

*Ao Prof. **Dr. Robert Hider** – King´s London College – pela orientação e discussões nos meses que trabalhamos juntos.*

*Ao **Dr. Vincenzo Abbate** – King´s London College – pela constante ajuda e auxílio constante no laboratório durante os meses de estadia em Londres.*

*Ao **MSc. Luca Mantovanelli**, pela colaboração constante na manipulação das artêmias, que foi o caminho para a produção de nosso primeiro artigo.*

*À **MSc. Fabiane Capraro,** mais que uma exímia técnica, uma grande amiga que tive o privilégio de conhecer, agradeço toda sua ajuda durante estes anos.*

*Aos funcionários do IQ-USP **Francisco Augusto de Azevedo, Milton Cesar Santos, Marcelo de Alcantara e Silvia Paula de Oliveira,** pelo apoio e orientação*

constante, que foram uma parte importante para o meu desenvolvimento administrativo e organizacional.

Aos Docentes do departamento de Química fundamental do Instituto de Química.

A ***Roxana Y. Pastrana Alta,*** *pela amizade, ajuda constante e inspiração para poder desenvolver meu projeto no exterior, ´´no pain, no gain´´, ´´fighting´´, ´´gar´´, ´´fuchifu´´ muchas gracias.*

A ***Gustavo Fernandez,*** *pela inspiração inicial e ajuda constante para poder suportar todos os meus problemas no começo de estadia no São Paulo, pelos lanches ´´Roldonianos´´, pela grande amizade.*

A ***Marco Aurélio Suller García,*** *pela amizade, brigas e ajuda constante durante o desenvolvimento do meu projeto.*

A ***Dibakar Goswami,*** *pela amizade e momentos vividos durante sua estadia no Brasil.*

A todos os amigos e colegas do laboratório ***LAQBAM****, em especial a* ***Jessica Esposito****,* ***Carolina Arashiro e Paloma de Queiroz****.*

À ***Universidade de São Paulo*** *por ceder a infraestrutura para o desenvolvimento desse trabalho.*

A ***FAPESP e CAPES*** *pelo apoio financeiro.*

E enfim a todos aqueles que vibraram juntos pela realização e conquista deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

Vitorino, H.A. Compostos de ferro de interesse farmacológico: Avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil. 2015. (196p). Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A sobrecarga de ferro é uma condição desfavorável tanto para humanos (portadores de disfunções no metabolismo desse metal, ou submetidos a intensos regimes de transfusão) como, possivelmente, para os organismos aquáticos. Metalofármacos de ferro compreendem agentes anti-hipertensivos, anti-microbianos e suplementos minerais; mais recentemente, o uso de nanomateriais magnéticos à base de ferro vem sendo proposto para diversas aplicações clínicas ou farmacológicas. Contudo, os possíveis danos por sobrecarga induzida desses compostos não são totalmente compreendidos tanto para humanos e no ambiente aquático. Neste trabalho se usaram fármacos comerciais com diferentes revestimentos, de uso animal e humano, obtidos de diferentes indústrias brasileiras. Também se sintetizaram derivados de ferroceno (Fc) (TMH-Fc, TMH_2-Fc), e nanopartículas magnéticas solúveis em água de três tamanhos (5,8,12 nm) pelo método de decomposição térmica a partir do $Fe(acac)_3$. Em seguida, se avaliou a estabilidade dos metalofármacos de ferro em meios fisiologicamente relevantes, frente a sideróforos e/ou moléculas envolvidas no transporte do metal (CAL, Fl-Tf, Fl-DFO), mostrando disponibilidade de ferro só para os derivados de Fc a pH 7,4. A capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio, medida por oxidação da DHR, foi detectada só para os derivados de Fc e nanomaterias. Um teste de toxicidade em *Artemia salina* de primeiro estágio foi positivo para o TMH-Fc (LC50 76,7 µM). Finalmente se estudou a capacidade de estocagem de ferro em células epiteliais de hepatopâncreas do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*, em diferentes etapas de desenvolvimento (E, R, F e B). Todas mostraram transporte de metalofármacos e nanomaterias, e só os tipos celulares F e B incorporaram os derivados de Fc. Vários dos compostos de ferro estudados, com aplicações principalmente farmacológicas, poderiam ser disponibilizados no meio ambiente, principalmente no aquático. Os nossos resultados mostram que a capacidade de disponibilizar ferro e de gerar EROs podem ser quantificadas eficazmente por métodos de fluorescência. Além disso, sua possível toxicidade pode ser monitorada no meio

marinho por bioindicadores de toxicidade e de acúmulo de metais.

Palavras-chave: ferro, *Artemia salina*, *Ucides cordatus*, toxicidade, fluorescência

ABSTRACT

Vitorino, HA. Iron compound of pharmacological interest: Evaluation of stability, toxicity against aquatic organisms, transport in cells and capacity to generate labile iron pool. 2015. (196p). Thesis (PhD) - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Iron overload is an unfavorable condition for both humans (patients with disorders in the metabolism of the metal, or subjected to intense transfusion) and possibly to aquatic organisms. Iron metallodrugs include antihypertensive agents, antimicrobial and mineral supplements. More recently, the use of magnetic iron based nanomaterials has been proposed for various clinical or pharmacological applications. However, possible overload damage induced by these compounds is not fully understood for both humans and aquatic organisms. For this work, we used commercial drugs with different coatings, for animal and human use, obtained from different Brazilian industries. Also we synthesized ferrocene (Fc) derivatives (TMH-Fc TMH2-Fc) and water soluble magnetic nanoparticles in three different sizes (5,8,12 nm) by the thermal decomposition method from $Fe(acac)_3$. We evaluated the stability of iron metallodrugs in physiologically relevant medium against siderophores and/or molecules involved in metal transport (CAL, Fl-Tf, Fl-DFO), where we found iron availability only for ferrocene derivatives at pH 7.4. The ability to generate reactive oxygen species was measured by oxidation of DHR, and was present in the ferrocene derivative and nanomaterials. A toxicity assay on first stage *Artemia salina* was positive for TMH-Fc (LC50 76.7 µM). Finally, we studied the iron storage capacity of hepatopancreatic *cells* of a *mangrove crab*, *Ucides cordatus*, at different stages of development (E, R, F and B). All displayed transport of metallodrugs and nanomaterials, and only the cell types F and B incorporated ferrocene derivatives. Several of the iron compounds studied, particularly of pharmaceutical application, could be made available in the environment, especially in water. Our results show that the ability to supply iron and to generate ROS can be effectively quantified by fluorescence methods. In addition, their possible toxicity can be monitored in the marine environment with biomarkers of toxicity and accumulation of metals.

Keywords: iron, *Artemia salina*, *Ucides cordatus*, toxicity, fluorescence

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

5-DTAF: 5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína)

ACN: Acetonitrila

ACN: Acetonitrila

AO: Fármacos via administração oral

apo-Tf: apotransferrina

CAL: Calceína

CAL-AM: Calceína-acetoximetila

CALFe: Calceína ligada ao ferro

CALFeH: Calceína protonada ligada ao ferro

CHN: Analise elementar dos elementos C, H e N

CP: Ceruloplasmina

D: Diâmetro da nanopartícula

DFE: Éter difenílico

DFO: Desferroxamina

DFP: Deferiprona

DHR: Dihidrorodamina

DMF: Dimetilformamida

DMT1: Transportador de metal divalente 1

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DRX : Difração de raios X

EROs (ROS): Espécies reativas de oxigênio

F_3O_4: Magnetita

FAAS: Espectroscopia de absorção atômica de chama

FAS: Ferrous ammonium sulfate

Fc: Ferroceno

$Fe(acac)_3$: *Tris*(acetilacetonato) de ferro(III)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína isómero I

Fl: Fluoresceína

Fl-DFO: Desferroxamina fluorêscente

FPN-1: Ferroportina-1

FTIR: Espectroscopia vibracional com transformada de Fourier na região do infravermelho

HBS: Hepes Buffered Saline

h**olo-Tf**: holotransferrina

IV: Fármacos via administração intravenosa

LC50: Concentração letal 50

LIP: Reservatórios de ferro lábil

LPI: Ferro labil plasmático

LPO: Lipoperoxidação

MOPS: 3-(Nmorpholino)-propanesulfonic acid

NP: Nanopartícula

NTBI: Ferro não ligado à transferrina

OA: Ácido oleico

OC: 1,2-octanodiol

RD: Rodamina

Rf: Índice de retenção

Rh: Raio hidrodinâmico

RMN: Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

RMN^{1}H: Espectroscopia por ressonância magnética nuclear de prótons

TEA: Trietilamina

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão

Tf: Transferrina

TLC: Cromatografia em camada delgada

(TMH)$_2$-Fc: *bis*{3,5,5 –Trimetilhexanoil} ferroceno

TMH: 3,5,5-Trimetilhexanoilo

TMH-Fc: 3,5,5 –Trimetilhexanoil ferroceno

UV-Vis: Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

ζ : Potencial Zeta

Sumário

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Ferro 15
1.1.1 Ferro na biologia 16
1.1.2 O Ferro e o metabolismo humano 17
1.1.3 Transporte de metais na célula 21
1.1.4 Transporte de ferro na célula 22
1.2 Estresse oxidativo 25
1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio 26
1.2.2 Lipoperoxidação (LPO) 28
1.3 Detecção fluorimétrica de ferro 29
1.4 Fármacos no meio ambiente 35
1.4.1 Metalofármacos de Fe e sua toxicidade 41
1.4.2 Nanofármacos 42
1.5 Bioindicadores de toxicidade aquática 44
1.5.1 *Artemia salina* (*Crustacea, Branchiopoda*) 45
1.5.2 *Ucides cordatus (Crustacea, Brachyura, Ocypodidade)* 46
2. OBJETIVOS 49
3. PARTE EXPERIMENTAL 51
3.1 Compostos Comerciais de ferro 51
3.1.1 Análise por absorção atômica dos compostos de ferro comerciais 52
3.1.2 Análise por espectroscopia de absorção no UV – Vis 52
3.2 Compostos não comerciais de ferro 52
3.2.1 Síntese de derivados de ferroceno 52
3.2.2 Análise elementar 60
3.2.3 Rendimento 60
3.2.4 Ensaio qualitativo de solubilidade 60
3.2.5 Espectroscopia vibracional 60
3.2.6 Análise por RMN ^{1}H 61
3.3 Síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) 61
3.3.1 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (5 nm) 62
3.3.2 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (8 nm) 63

3.3.3 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (12 nm) 63
3.3.4 Análise elementar 64
3.3.5 Espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS) 64
3.3.6 Difração de raios X 64
3.3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 65
3.3.8 Suspensão das nanopartículas de magnetita em meio aquoso com Tween 80 65
3.3.9 Potencial Zeta 65
3.3.10 Raio hidrodinâmico 66
3.4 Síntese de transferrina fluorescente (Fl-Tf) 66
3.4.1 Preparação de membrana de diálise para purificação 66
3.4.2 Preparação da transferrina fluorescente a partir da apotransferrina 66
3.4.3 Preparação da transferrina fluorescente a partir de holotransferrina 67
3.5 Síntese de desferrioxamina fluorescente (Fl-DFO) 67
3.6 Estudo da estabilidade dos compostos de ferro frente a quelantes fluorescentes 68
3.7 Estudo de estabilidade dos fármacos comerciais frente a deferiprona e citrato . 70
3.7.1 Estabilidade frente a DFP 70
3.7.2 Estudo de estabilidade competitiva entre DFP e citrato 71
3.8 Determinação da capacidade de geração de ferro lábil redox-ativo dos compostos de ferro 71
3.9 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina* 72
3.9.1 Toxicidade em artêmias adultas 72
3.9.2 Toxicidade em artêmias de primeiro estágio 74
3.9.3 Lipoperoxidação em *Artemia salina* 75
3.10 Transporte de ferro em células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus* 77
3.10.1 Obtenções de células de hepatopâncreas 77
3.10.2 Transporte de ferro 78
3.10.3 Viabilidade celular 79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 81
4.1 Determinação do conteúdo de ferro dos metalofármacos comerciais de uso veterinário e humano 81
4.2 Caracterização de TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno 87
4.3 Descrição e caracterização das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) 96
4.4 Quantificação de fluorescência da transferrina fluorescente (Fl-Tf) 108

4.5 Quantificação da marcação de fluorescência da desferrioxamina fluorescente (Fl-DFO) 109

4.6 Estudo da estabilidade dos compostos de ferro frente a quelantes endógenos e exógenos 111

4.6.1 Estudo da estabilidade dos fármacos comerciais. 114

4.6.2 Estudo da estabilidade dos derivados de ferroceno 123

4.6.3 Estudo da estabilidade das nanopartículas de magnetita 129

4.7 Estudo da capacidade de geração de ferro lábil dos compostos de ferro 132

4.8 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina* para os metalofármacos comerciais e derivados de ferroceno. 135

4.8.1 Toxicidade em artêmias adultas 135

4.8.2 Toxicidades em artêmias de primeiro estágio 136

4.8.3 Lipoperoxidação em *Artemia salina* 137

4.9 Estudo de viabilidade, transporte e quantificação de ferro intracelular em células de hepatopâncreas de caranguejos *Ucides cordatus* frente aos compostos de ferro. 140

4.9.1 Transporte de ferro a partir dos fármacos comerciais 141

4.9.2 Transporte de ferro a partir dos derivados de ferroceno 148

4.9.3 Transporte de ferro a partir das nanopartículas de magnetita revestida (Fe_3O_4-OA-Tween 80) 152

5. CONCLUSÕES 158

6. PERSPECTIVAS 160

7. BIBLIOGRAFIA 162

8. SÚMULA CURRICULAR 191

9. ANEXOS 198

Capítulo 1

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ferro

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, depois do alumínio, e o mais abundante dos elementos de transição. Nos estágios iniciais da vida, grande atividade vulcânica resultou numa atmosfera redutora, o que manteve o ferro prontamente disponível como o íon Fe(II). Com o advento de organismos fotossintéticos, a concentração de oxigênio molecular na atmosfera aumentou, produzindo o ambiente oxidante que conduziu à predominância do atualmente observado ferro férrico, menos biodisponível[1]. As condições de mudança causaram uma pressão evolutiva, com a vida tendo que se adaptar ou para utilizar o mais solúvel mas menos abundante Cu^{+}, ou traçar estratégias para solubilizar e reduzir o ferro férrico em presença de dioxigênio. Ambas as respostas evolutivas surgiram, significando uma nova bioquímica de ferro tornada possível após o advento do oxigênio[2].

A posição de ferro na tabela periódica, no meio da primeira fila do bloco de elementos de transição, implica que ele pode existir em vários estados de oxidação (de -II a +VI). No entanto, nos sistemas biológicos os estados de oxidação importantes são Fe(II) (d^6), Fe(III) (d^5) e Fe(IV) (d^4). Fe(IV) só está presente como um intermediário de reação no centro ativo de algumas enzimas e a maior parte da química solução de ferro é dominada pela sua capacidade do ciclo redox entre os estados Fe(II) e Fe(III)[1] . Ambos os íons ferrosos e férricos ao hidrolisar em soluções aquosas formam complexos de hidróxido de ferro insolúvel[3]. Como o Fe(II) só começa a hidrolisar a valores de pH a 8,5, de acordo com as condições fisiológicas de pH neutro o ferro ferroso livre pode existir em concentrações relativamente elevadas (~ 0,1 M)[4]. Para o Fe(III), a hidrólise começa a cerca de pH 2 e é um fator dominante a valores de pH neutros. De acordo com os valores de pH fisiológico, a espécies mononuclear dominante é $Fe(OH)_3$, que tem uma solubilidade de 10^{-12} M[5]. Nestas condições, a concentração do íon Fe(III) livre está limitada a 10^{-20} M[1]. Esta baixa disponibilidade de Fe(III) levou à evolução de sideróforos e fitossideróforos por microrganismos e plantas, respectivamente, a fim de solubilizar e mobilizar as quantidades de ferro requeridas para o crescimento e desenvolvimento[6]. Nos seres vivos, o ferro está ligado às proteínas, quer incorporados em diferentes grupos protéticos ou diretamente quelado pela cadeia peptídica[7].

A maneira mais simples de compreender e prever as reações de complexação de ferro é pela teoria ácido-base duro-macio (HSAB)[8]. Fe(III) é um íon relativamente pequeno com uma elevada densidade de carga, e assim, pode ser classificado como um ácido duro, e se espera que forme complexos estáveis com os doadores duros. Em sistemas biológicos, os mais prováveis doadores duros têm o átomo de oxigênio como ponto de coordenação e incluem ácidos carboxílicos, hidroxila e grupos fosfato. Fe(II) está em uma linha de fronteira de metal duro e macio, e em termos da teoria HSAB deverá favorecer ligantes de nitrogênio e enxofre, tais como histidina, porfirina, metionina e cisteína especialmente. O Fe(III) tem um número de coordenação 6, comumente formando complexos octaédricos, mas em outros estados de oxidação como IV e V pode formar complexos bipiramidal trigonais[9] e tetraédricos[10] respectivamente.

Uma boa escolha das condições de coordenação permite o controle do potencial de redução para o par de Fe^{3+} / Fe^{2+}. Isto pode ser ajustado por ligantes bem escolhidos, para que os sítios de ferro abranjam quase toda a gama biologicamente significativa de potenciais de redução, a partir de -0.5 V até +0.6 V [11].

1.1.1 Ferro na biologia

O ferro é um elemento onipresente que exerce um papel central em praticamente todos os organismos vivos, está envolvido em processos essenciais para a vida, como o transporte, armazenagem e ativação de oxigênio molecular, redução de nucleotídeos e dinitrogênio, e de transporte de elétrons[12]. A adequação única para cumprir esses papéis decorre da abundância natural de ferro e a adequação de sua química aquosa, especialmente a extrema variabilidade de suas propriedades redox que podem ser afinadas por ligantes bem escolhidos [11]

O ferro é fundamental para a biologia dos organismos que vivem em um ambiente rico em oxigênio. Ao fornecer um local de ligação específico para o oxigênio na porção de heme hemoglobina, o ferro aumenta muito a capacidade de transporte de oxigênio em soluções aquosas e facilita a entrega de oxigênio para os tecidos de organismos multicelulares[13]. O ferro um dos principais componentes da costra terrestre, mas seus benefícios são compensadas por sérias limitações para a sua utilidade biológica[2]. O ferro disponível serve como catalisador para a formação de radicais livres, muito perigosos que danificam os componentes macromoleculares da célula[14].

Em suma, existe no meio ambiente mais ferro em forma férrica (Fe(III)), que é praticamente insolúvel em água a pH neutro. E para enfrentar essas dificuldades, sistemas complexos de transporte e aquisição de ferro evoluíram em todos os organismos, e não surpreendentemente, o desequilíbrio nos níveis de ferro pode originar diversas desordens em todos os organismos [15,16].

1.1.2 O Ferro e o metabolismo humano

Apesar de que a quantidade total de ferro no organismo de um homem adulto médio é de cerca de 4 g, apenas 0,5-2 mg ingressa e sai do corpo diariamente. A homeostase de ferro vai se manter pela minuciosa regulação da absorção de ferro, porque não existe um mecanismo fisiológico exclusivo de excreção de ferro[17]. Em vez disso, o ferro normalmente deixa o corpo só através da perda de sangue menstrual e através da descamação de células epiteliais da pele e da mucosa do trato gastrointestinal, vias biliares e urinário. A absorção de ferro é regulada em resposta ao nível de reservas de ferro do corpo e pôr a quantidade de ferro necessária para a eritropoiese. A deficiência de ferro nos tecidos e a eritropoiese podem acelerar a absorção de ferro muitas vezes, podendo ser mais eficiente a eritropoiese do que a deficiência de ferro[15,18].

A distribuição do ferro dentro do corpo de uma pessoa normal está ilustrada na **Figura 1.1.** A porção maior, variando de 65% a 75% do total, é encontrada na hemoglobina das células vermelhas do sangue. Uma vez que as células vermelhas do sangue alcançam o fim da sua vida útil, são fagocitadas por macrófagos reticuloendoteliais, que reciclam o ferro heme. A maior parte de ferro do corpo, por conseguinte, cicla através destes dois tipos de células derivadas de medula óssea. Outros tecidos usam pequenas quantidades de ferro. A maior parte do estoque de ferro do corpo é armazenado no fígado, e em um homem adulto normal, a reserva de ferro no fígado pode variar de 0,5 a 1 g. Crianças e mulheres menstruadas têm reservas de ferro do fígado muito menores por causa de suas necessidades acrescidas de ferro e aumento das perdas de ferro, respectivamente. Na gravidez, uma fração significativa de ferro corporal total é desviada para o desenvolvimento do feto. Em situações de deficiência de ferro, precursores eritróides têm prioridade e a produção de células vermelhas do sangue continua à custa de outros tecidos[15,19,20].

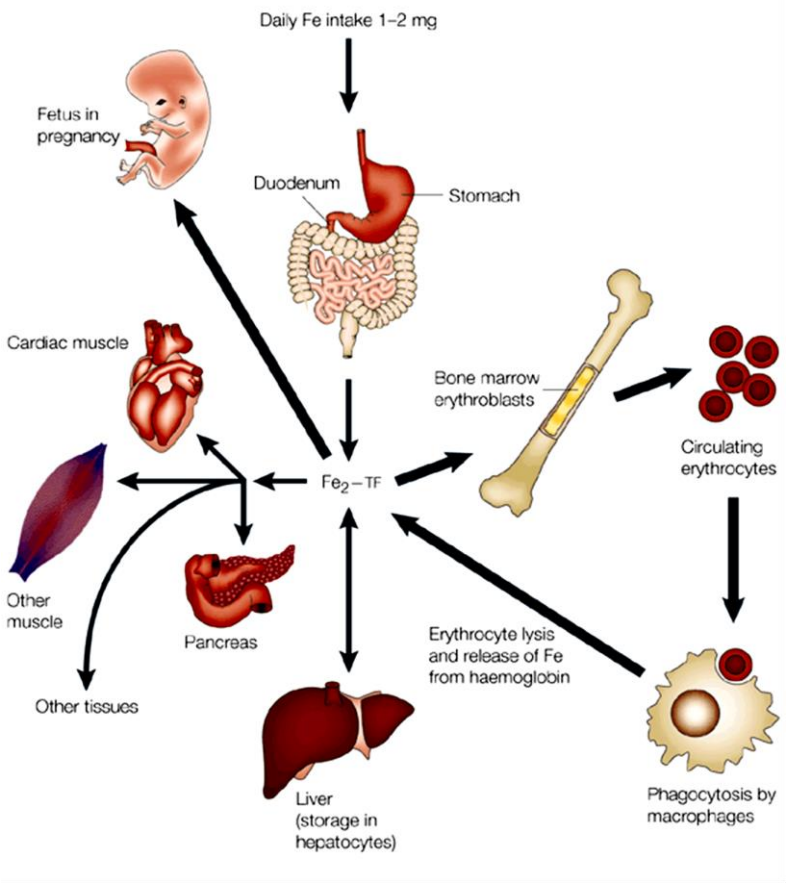


Figura 1.1: Distribuição de ferro dentro do corpo[15]

A eritropoiese torna-se limitada uma vez que os estoques de ferro estão esgotados[21]. Em contraste, na sobrecarga de ferro, a eritropoiese prossegue normalmente e o excesso de ferro é depositado em outros tecidos[22]. O fígado assume a principal carga de ferro, mas, com o tempo, os miócitos cardíacos, células acinares pancreáticas e outras células também se tornam carregadas com ferro[15,19].

A anemia ferropriva, que geralmente resulta de ingestão de ferro na dieta inadequada, ou perda excessiva de sangue, é a anemia nutricional e mais comum[23]. A falta de ferro também pode resultar de um defeito hereditário pouco comum (anemia microcítica) na absorção de ferro, mas a origem dos genes mutantes que levam a esta condição ainda não foi identificada em humanos[24–27]. A sobrecarga de ferro, pelo contrário é quase sempre causada por uma tendência hereditária para absorver o excesso de ferro, ou por uma deficiência crônica que leva o paciente a necessitar de transfusões sangüíneas freqüentes. Existem várias desordens de sobrecarga de ferro que produzem sinais e sintomas clínicos semelhantes (**Caixa 1.1**), e mutações causais foram identificados por

algumas delas, como a hemocromatose hereditária, que é mais compreendida das perturbações de sobrecarga de ferro.

Transtornos do metabolismo do ferro

Falta de ferro

Manifestações principais

- Anemia (palidez, fadiga, diminuição da tolerância ao exercício físico)
- Fraqueza
- Pica (alotriofagia)

Causas

- Ingestão de ferro na dieta inadequada
- Perda de sangue
- Intolerância ao leite infantil
- Consumo de substâncias que interferem com absorção (por exemplo, antiácidos e farelo)
- Perda de epitélio de absorção no intestino
- Insuficiência gástrica, falta de suco gástrico

Sobrecarga de ferro

Manifestações principais

- Fadiga
- Depressão
- Dor nas articulações
- Aumento da pigmentação da pele
- Doença hepática que pode progredir para cirrose
- Aumento do risco de carcinoma hepatocelular
- Cardiomiopatia e arritmias
- Diabetes
- Hipogonadismo, impotência

Causas

- Hemocromatose hereditária HH (tipo 1*, HFE associado)
- Hemocromatose juvenil (tipo 2*)
- Hemocromatose autossômica dominante
- Hemocromatose não-HFE (Tipo 3*, TFR2-associada)
- Anemia sideroblástica congênita
- Aceruloplasminemia
- Hemocromatose neonatal (de vários tipos)
- Talassemias; Doença renal crônica (necessidade de transfusões)

* Os três tipos de hemocromatose são designados de acordo com a classificação utilizada pelo banco de dados *On Line Mendelian Inheritance in Man* (OMIM)[28]

Caixa 1.1: Transtornos do metabolismo de ferro[15].

Até recentemente, pouco se sabia sobre como o ferro entra e sai de células de mamíferos. Como um grande íon carregado, o ferro não pode cruzar bicamadas lipídicas diretamente e por isso requer maquinaria celular para facilitar o seu transporte. A transferrina, uma proteína abundante no plasma que foi identificada há mais de meio século [29], liga-se ao íon Fe(III) com alta afinidade e o solubiliza, atenuando a sua reatividade e o entregando às células. Este ciclo eficiente de endocitose mediada por receptor, desencadeada pela ligação de transferrina a um receptor específico da superfície celular (**Figura 1.2**), é um dos processos mais bem compreendidos em biologia celular[30,31]. Mas o ciclo de transferrina não poderia explicar como o ferro atravessa a membrana endossomal para entrar no citoplasma. Esta questão, dentre outras, como por exemplo como as células epiteliais de absorção que revestem o intestino absorvem ferro da dieta, e como uma célula regula a exportação de ferro, ficou sem resposta, e por muitos anos o estudo de transporte de ferro esteve em um impasse. Com o advento da genética molecular, no entanto, novas ferramentas se tornaram disponíveis para responder a estas perguntas importantes[15,32,33].

A holotransferrina (holo-Tf) liga-se a receptores de transferrina (TfR) na superfície da célula. Os complexos localizam poços revestidos por clatrina, os quais invaginam para iniciar a endocitose[19]. Se formam endossomos especializados, e se tornam ácidos através da ação de uma bomba de prótons. A acidificação leva a alterações conformacionais proteicas que liberam o ferro da transferrina[19]. A acidificação também permite o transporte de ferro acoplado a prótons para fora dos endossomos através da atividade do transportador de metal divalente 1 (DMT1). Posteriormente , a apotransferrina (apo-Tf) e o receptor de transferrina retornam à superfície celular, onde são dissociados a pH neutro . Ambas as proteínas participam de novas rodadas de entrega de ferro. Em células não-eritróides, o ferro é armazenado como ferritina e hemossiderina[15].

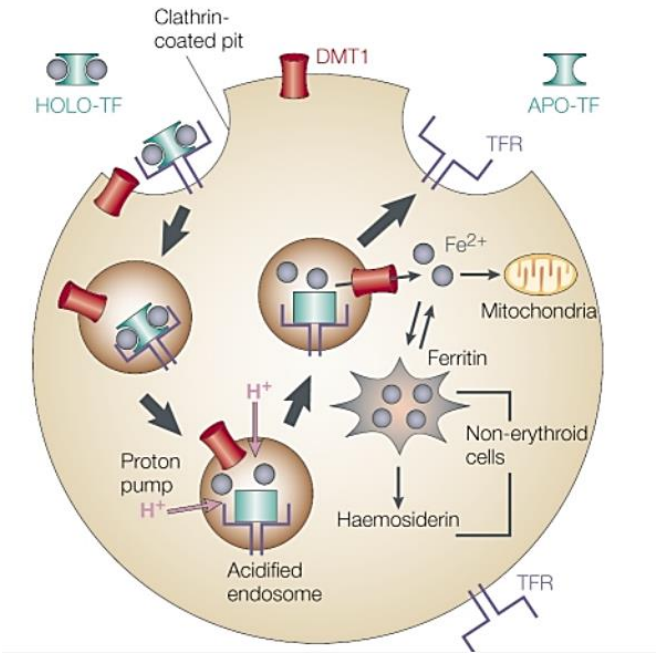


Figura 1.2: O ciclo de transferrina[15]**.**

1.1.3 Transporte de metais na célula

Os metais são os poluentes mais comuns e estão presentes nas mais diversas áreas de costa em todo o mundo. Metais de transição, como por exemplo, cobre, zinco, ferro, cobalto ou manganês, são essenciais para a manutenção da saúde da maioria dos organismos, estando presente na composição de diversas proteínas envolvidas nas mais diversas funções biológicas[34]. No entanto, em excesso, esses metais se tornam tóxicos, ligando-se inapropriadamente a moléculas biológicas ou formando perigosos radicais livres. Portanto, para manter a homeostase desses metais, através do balanço entre absorção e excreção, é necessário haver um fino balanço de suas concentrações já que eles são vitais para os organismos na sua maioria[34].

Para manter a concentração de metais essenciais dentro do padrão fisiológico (que é variável entre os diversos grupos taxonômicos) são necessários diversos mecanismos que controlam a sua ingestão, acúmulo, distribuição e destoxificação[35]. As principais rotas para a homeostase do metal são: regulação de transporte na membrana plasmática, ligação intracelular a proteínas, como metalotioneínas, e compartimentalização em lisossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático, por exemplo[36–39].

Existem três mecanismos homeostáticos para entrada de metais nas células: (*i*) ligação em sítios específicos como em moléculas ligantes (sendo a metalotioneína a mais importante); (*ii*) compartimentalização em vesículas de membranas, mais frequentemente presentes em lisossomos; (*iii*) formação de precipitados insolúveis como concreções Ca/Mg ou grânulos Ca/S. Estes mecanismos apresentam diversos graus de eficácia em diferentes organismos e em diferentes tipos de células no mesmo organismo[40].

Várias rotas têm sido propostas para o transporte de metais através da membrana citoplasmática, sendo elas: (*i*) transporte iônico mediado por ligação do metal à membrana; uma vez no citosol, o metal se liga a proteínas e então é continuadamente transportado de forma passiva na célula, fazendo com que o metal se torne, consequentemente, indisponível para retornar ao meio externo[41]; (*ii*) transporte através de canais de proteínas onde os íons de metal são transportados por gradiente hidrofílico; (*iii*) difusão passiva do metal na bicamada lipídica dissolvida; e, (*iv*) endocitose – englobamento de partículas ferro-metálicas as quais são transferidas para vesículas intracelulares. Essas duas últimas rotas são, provavelmente, as de menor importância para a absorção típica de metais da solução pelos crustáceos aquáticos[42–44]. Além disso, a absorção junto à membrana celular é governada por transportadores específicos, transporte por canais de proteínas, difusão passiva de metais lipossolúveis e, também, por endocitose[45].

1.1.4 Transporte de ferro na célula

Um aspecto importante do metabolismo do ferro é que diferentes tipos de células precisam lidar com ferro em maneiras diferentes. O transporte de ferro envolve tanto a sua importação (trazendo ferro na célula do ambiente externo) e sua exportação (liberando ferro das células para uso em outros lugares). Processos ferro-importação e ferro-exportação em diferentes tipos de células, de acordo com nossa compreensão atual de proteínas de ferro-transporte, são mostrados na **Figura 1.3.**

Em células envolvidas na aquisição de ferro para o corpo, incluindo sinciciotrofoblastos e enterócitos duodenais (**Figura 1.3 a**), o ferro deve atravessar duas duplas camadas lipídicas. E deve ser importado através de uma membrana e exportado através de outra à medida que se transporta através da barreira epitelial. Há pouco o nada de

transporte paracelular de ferro, entre células que estão unidas por junções apertadas e justas entre as membranas laterais, em indivíduos normais[15,19].

Os eritrócitos (**Figura 1.3 b**) são únicos entre os principais tipos de células envolvidas na manipulação de ferro. Embora tenham um processo de absorção de ferro altamente eficiente, todo o ferro de eritrócitos é mantido pela célula e a maior parte dele está comprometido com a síntese de hemoglobina. Portanto, é pouco provável que os eritrócitos possuam um aparelho para a exportação de ferro[15,46].

Dois principais tipos de células estão envolvidos no armazenamento de ferro: hepatócitos e macrófagos reticuloendoteliais. Os hepatócitos (**Figura 1.3 c**) funcionam como um depósito de armazenamento para a maior parte do ferro que não é necessário em outros lugares. Eles têm mecanismos para aquisição de ferro tanto ligado à transferrina e ferro lábil que circula quando os sítios de ligação da transferrina estão totalmente ocupados O ferro em sistemas vivos parece predominantemente associado com proteínas, mas também pode se encontrar em formas referidas como ferro lábil, ou seja, associado a espécies menos estáveis e, portanto, mais reativas (e, em alguns casos, redox-ativas) [47].O ferro não-ligado à transferrina é quase indetectável no plasma de indivíduos normais, mas pode estar presentes em quantidades significativas em indivíduos com sobrecarga de ferro. Os mecanismos de absorção de ferro ligado à transferrina e não ligado à transferrina diferem, mas uma vez dentro da célula, o ferro armazenado é mais encontrado na ferritina, uma envoltura de múltipla subunidades de proteínas que pode acomodar até 4500 átomos de ferro[48]. Os hepatócitos exportam ferro em resposta às necessidades dos tecidos, promovendo a sua ligação à transferrina para reentrar em circulação. Os macrófagos reticuloendoteliais (**Figura 1.3 d**), do fígado e baço, também processam e armazenam ferro. Eles são importantes para a reciclagem de ferro a partir de células vermelhas senescentes do sangue. Dado que a maioria do ferro do organismo é encontrada na hemoglobina dos glóbulos vermelhos, a reciclagem de ferro é essencial para a homeostase de ferro. Os detalhes de reciclagem de ferro não são compreendidos, mas a heme oxigenasse provavelmente contribui para catalisar a liberação de ferro do heme. Como hepatócitos, os macrófagos têm um mecanismo para a exportação de ferro para a transferrina[15,46,49].

Existem quatro tipos de células que tem funções especiais no manejo de ferro: enterócitos duodenais (**Figura 1.3 a**) que absorvem ferro não heme da dieta, que é reduzido por uma ferriredutase de membrana e transportado para dentro da célula através do transportador de metal divalente 1 (DMT1)[50]. Uma parte do ferro é armazenado no interior da célula na ferritina, o restante deve passar através da membrada basolateral para atingir ao plasma. Um exportador de ferro, ferroportina-1 (FPN-1), provavelmente realiza a transferência do ferro basolateral em cooperação com a hefestina, uma possível ferroxidase. A hefestina é a homologa à oxidase de plasma ceruloplasmina (CP), que pode ter uma função análoga à da CP na exportação de ferro a partir de outras células. O ferro é absorvido e carregado pela apotransferrina (apo-Tf) para dar holotransferrina (holo-Tf) através de um mecanismo de captação de ferro na célula[19]. Precursores eritróides (**Figura 1.3 b**) capturam ferro através do ciclo da transferrina, tal como descreve na **Figura 1.2**. Células eritróides provavelmente não tem nenhum mecanismo de exportação de ferro; essencialmente todo o ferro nessas células é incorporado na hemoglobina[15]. Os hepatócitos (**Figura 1.3 c**) capturam ferro através de pelo menos duas vias distintas. Tem o ciclo da transferrina e um sistema de transporte que leva o ferro não ligado à transferrina (NTBI, *Non-transferrin-bound iron*), já identificado[51]. Os hepatócitos armazenam ferro na ferritina; quando o ferro é necessário em outras partes do corpo, pode liberar ferro para a transferrina, através da FPN[52]. A CP parece ajudar a exportação de ferro a partir dos hepatócitos, mas sua função exata não é bem conhecida[15]. Os macrófagos reticuloendoteliais (**Figura 1.3 d**) realizam a reciclagem do ferro. Eles ingerem os glóbulos vermelhos (RBC) envelhecidos e o lisam num compartimento fagolisossomal. A hemoglobina é degradada e o ferro é liberado a partir do heme. A enzima heme oxigenasse pode participar neste processo. O mecanismo de exportação de ferro dos macrófagos ainda não é conhecido, mas novamente pode implicar a FPN-1 e CP, similar à exportação de ferro dos hepatócitos[15].

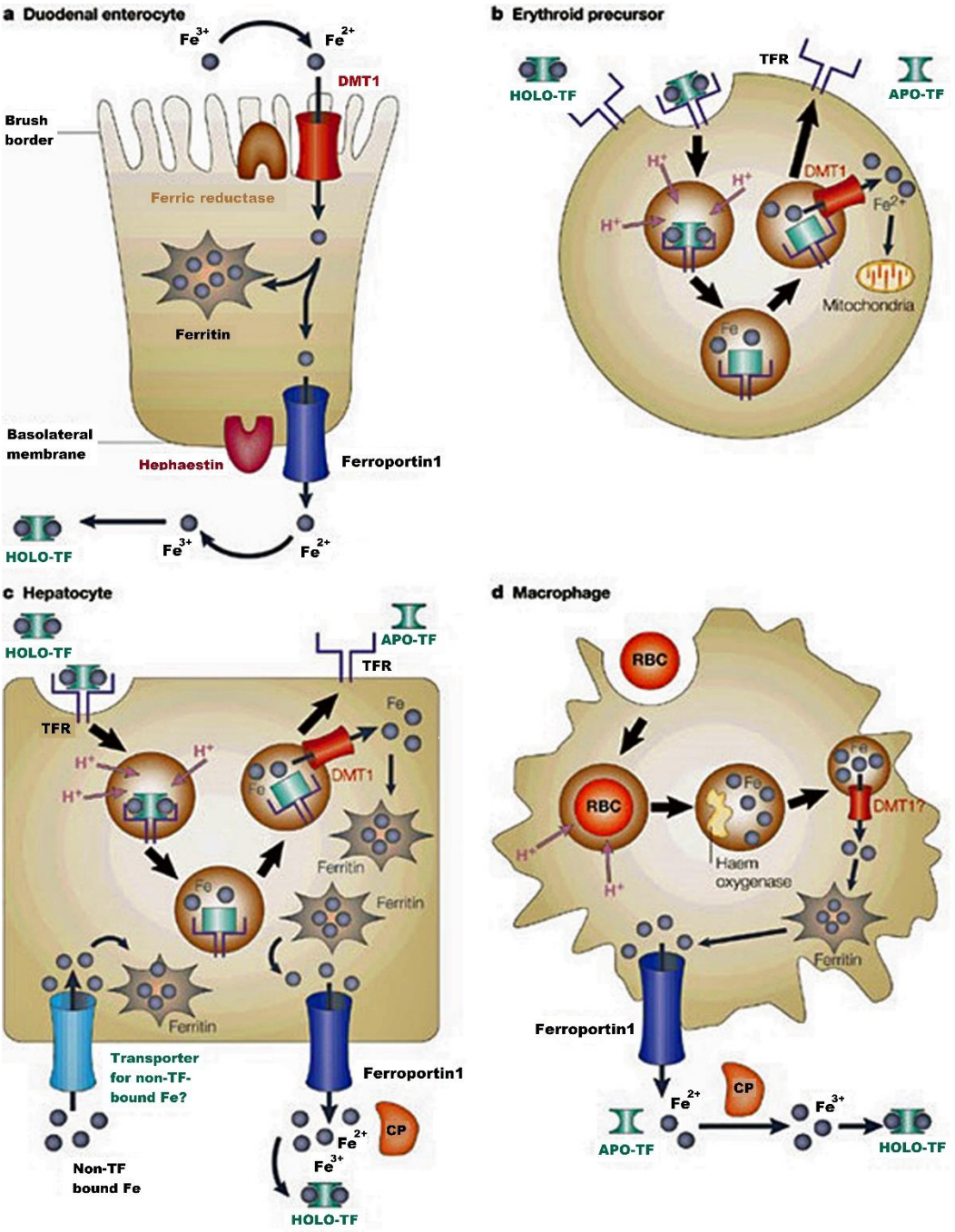


Figura 1.3: Transporte de ferro celular[15]

1.2 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é a consequência de um desbalanço entre produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo se dar tanto pelo aumento na formação destas espécies quanto pela queda na capacidade antioxidante celular. A con-

sequência da instalação desse processo é a perda das funções celulares que podem, em última instância ocasionar sua morte[53].

1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons não emparelhados na camada mais externa ou camada de valência, o que lhes confere meia vida curta e alta reatividade com outras biomoléculas, principalmente proteínas, lipídeos e o ácido desoxirribonucléico (DNA)[54].

Existem, entretanto, moléculas altamente reativas, devido à sua instabilidade, mas que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada e, assim, não podem ser classificadas como radicais livres. Essas moléculas são derivadas do metabolismo do oxigênio, sendo conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs). Os radicais livres são: alcoxila ($RO^{\bullet}$), peroxila ($RO_2^{\bullet}$), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$)[55] e dentre as espécies não radicalares, se tem, ozônio (O_3), oxigênio singlet ($^1O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl)[56]. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos[54] . O oxigênio, por causa à sua inerente configuração, tende a receber um elétron de cada vez e formar compostos intermediários altamente reativos, ressaltando-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [57].

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser formado pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2) na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria[56] e no complexo de multicomponentes enzimáticos NADPH oxidase[58], mas, ao contrário da maioria dos radicais livres, é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma molécula de oxigênio

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Equação 1.1: Dismutação de dois ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) participa de processos químicos relevantes no ambiente biológico. A principal função dele é contribuir na produção do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) através de reação de oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+}, produzindo o radical superóxido (reação de Haber-Weiss) que promove a formação de H_2O_2, que em presença de Fe^{2+} da origem a $OH^{\bullet}$ (Reação de Fenton)[54,59] .

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \qquad \text{(Reação de Haber-Weiss)}$$

$$(2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+} \qquad \text{(Reação de Fenton)}$$

$$(Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2^{-\bullet} + 2H^+) \longleftarrow \text{Lenta}$$

Equação 1.2: Reação de Haber-Weiss e Reação de Fenton exemplificando a formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para promover a formação do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) utilizando Fe^{2+}.

O peróxido de hidrogênio, quando não eliminado do organismo pelas enzimas antioxidantes da família das peroxidasses (GPx) e catalases (CAT), pode gerar radicais hidroxilas ($^{\bullet}OH$). Apesar de causar efeitos danosos (peroxidação lipídica), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tem importância vital para as células de defesa e, sem ele, o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, já que ele é gerado in vivo por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório para combater corpos estranhos [54,60].

O radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a instaurações. Nos experimentos em laboratório, o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) pode facilmente ser sequestrado por inúmeras moléculas devido à sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário ministrar altas concentrações de antioxidante para que este alcance o local onde o radical hidroxila esteja presente em

concentração suficiente para suprimi-lo, o que não é factível. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical hidroxila (•OH): reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação [59].

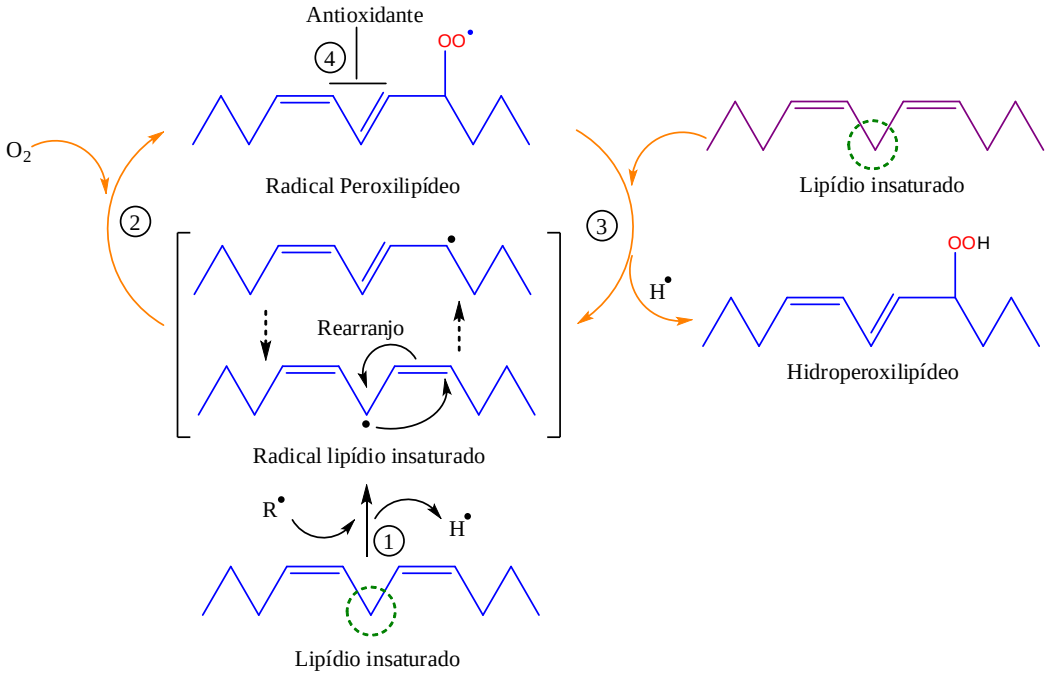
1.2.2 Lipoperoxidação (LPO)

Uma das consequências do estresse oxidativo, devido ao desequilíbrio favorecido pelos pró-oxidantes sobre os níveis de antioxidantes, é originar danos oxidativos em células, tecidos e órgãos[60]. Tem sido reconhecido que níveis elevados de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem infligir danos diretos aos lipídios. As fontes primárias de produção de EROs endógenos são as mitocôndrias, membrana plasmática, retículo endoplasmático, e peroxissomos[61] através de uma variedade de mecanismos, incluindo reações enzimáticas e / ou auto-oxidação de vários compostos, tais como catecolaminas e hidroquinona. Diferentes estímulos exógenos, tais como a radiação ionizante, radiação ultravioleta, o fumo do tabaco, infecções de agentes patogênicos, toxinas ambientais, e exposição ao herbicida / insecticidas, são fontes *in vivo* para produção de EROs. Os dois EROs mais prevalentes que podem afetar profundamente os lipídios são principalmente radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e hidroperoxila ($HO^{\cdot}_2$).

O radical hidroperoxila ($HO^{\cdot}_2$) desempenha um papel importante na química da peroxidação lipídica. Esta forma protonada de superóxido produz H_2O_2 que pode reagir com os metais ativos redox incluindo ferro ou cobre para gerar mais $HO^{\cdot}$ através de reações Fenton ou de Haber-Weiss **(Equação 1.1)**. O $HO^{\cdot}_2$ é um oxidante muito mais forte do que o ânion superóxido-radical e poderia iniciar a oxidação da cadeia de fosfolipídios polinsaturados, levando ao comprometimento da função da membrana [60,62].

A lipoperoxidação (LPO) pode ser descrita como um processo em que oxidantes podem atacar os lipídeos contendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono. Esse é o caso especial dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), que envolvem a captação de hidrogênio a partir de um átomo de carbono, e a inserção de oxigênio, resultando em radicais (hidro)peroxilipídeos [62]. Glicolípideos, fosfolípideos (PLS) e colesterol (Ch) também são alvos bem conhecidos de modificação peroxidativa prejudicial e potencialmente letal, ou, ao menos, conduzir a danos que podem facilitar o desenvolvimento de vários estados patológicos e envelhecimento acelerado. O impacto de lipídeos na mem-

brana da célula de oxidação e a forma como estes danos oxidativos estão envolvidos em ambos os processos fisiológicos e patológicos importantes condições foram analisadas em várias avaliações[63–66]. O processo global da LPO consiste em três etapas: iniciação, propagação, e terminação **(Esquema 1.2)** [62,67,68].



Esquema 1.1: Processo de lipoperoxidação[60]: (1) Na iniciação, a abstração de um átomo de hidrogênio alílico da cadeia de lipídio (LH) por um radical livre (R•) gera um radical lipídico (L•) centrado no carbono. (2) Na fase de propagação, L• reage rapidamente com o oxigênio para forma um radical LOO•. (3) Este retira um átomo de hidrogênio a partir de outra molécula de LH para formar outro radical lipídio L• e hidroperoxilipídeo LOO• (4) A reação de terminação ocorre quando os antioxidantes doam um átomo de hidrogênio às espécies de radicais peroxila resultando na formação de produtos não radicalares.[60]

1.3 Detecção fluorimétrica de ferro

A luminescência é geralmente considerada como a emissão de luz de um estado eletronicamente excitado e é dividida em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da conformação do elétron no estado excitado. Em estados singletos excitados, *Sn*, o elétron no orbital excitado está emparelhado com relação ao elétron no orbital de estado fundamental, ou seja, é de spin oposto. O retorno ao estado fundamen-

tal, $S_1 \rightarrow S_0$, é permitido por spin e ocorre muito rapidamente pela emissão de um fóton, ou seja, fluorescência. Em contraste, quando o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação de spin como o elétron estado fundamental, a transição para o estado fundamental, $T_1 \rightarrow S_0$, é spin proibido e a emissão do fóton é relativamente mais lenta, ou seja, fosforescência[69,70].

Existem muitas formas de supressão de fluorescência. O supressor pode ser um doador de elétrons, e o estado excitado pode ser o aceptor. Os supressores podem atuar por transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), um processo não-radiativo, onde existe fluorescência do doador e receptor de sobreposição espectral ou o supressor pode ser um supressor por colisão. Neste caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um encontro difusivo com um supressor, dentro do tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, sem a emissão de um fóton (**Figura 1.4 a**)[71]. Para a supressão por colisão as moléculas não são alteradas quimicamente no processo[71–73].

Para halogênios, alguns pseudo-halogênios e alguns outros átomos pesados, a supressão é através da passagem intersistema para o estado tripleto excitado, promovido pelo acoplamento spin-órbita do fluoróforo excitado (singleto) e o halogênio após contato. Uma vez que a emissão do estado tripleto é lenta, a emissão tripleto é susceptível de ser suprimida por outros processos (**Figura 1.4 b**)[71]. Outros mecanismos de supressão incluem supressão estática, onde fluoróforos formam complexos não-fluorescentes com supressores, um processo que não depende da difusão ou colisões moleculares. A supressão também pode ocorrer através de diversos processos triviais, tais como a atenuação da excitação da luz pelo próprio fluoróforo ou outras espécies de absorção. Exceto por transferência de energia e estes processos triviais, os mecanismos de supressão envolvem o contato muito próximo entre o estado excitado de uma espécie fluorescente e o supressor e são por vezes referidos como supressores de contato[71–73].

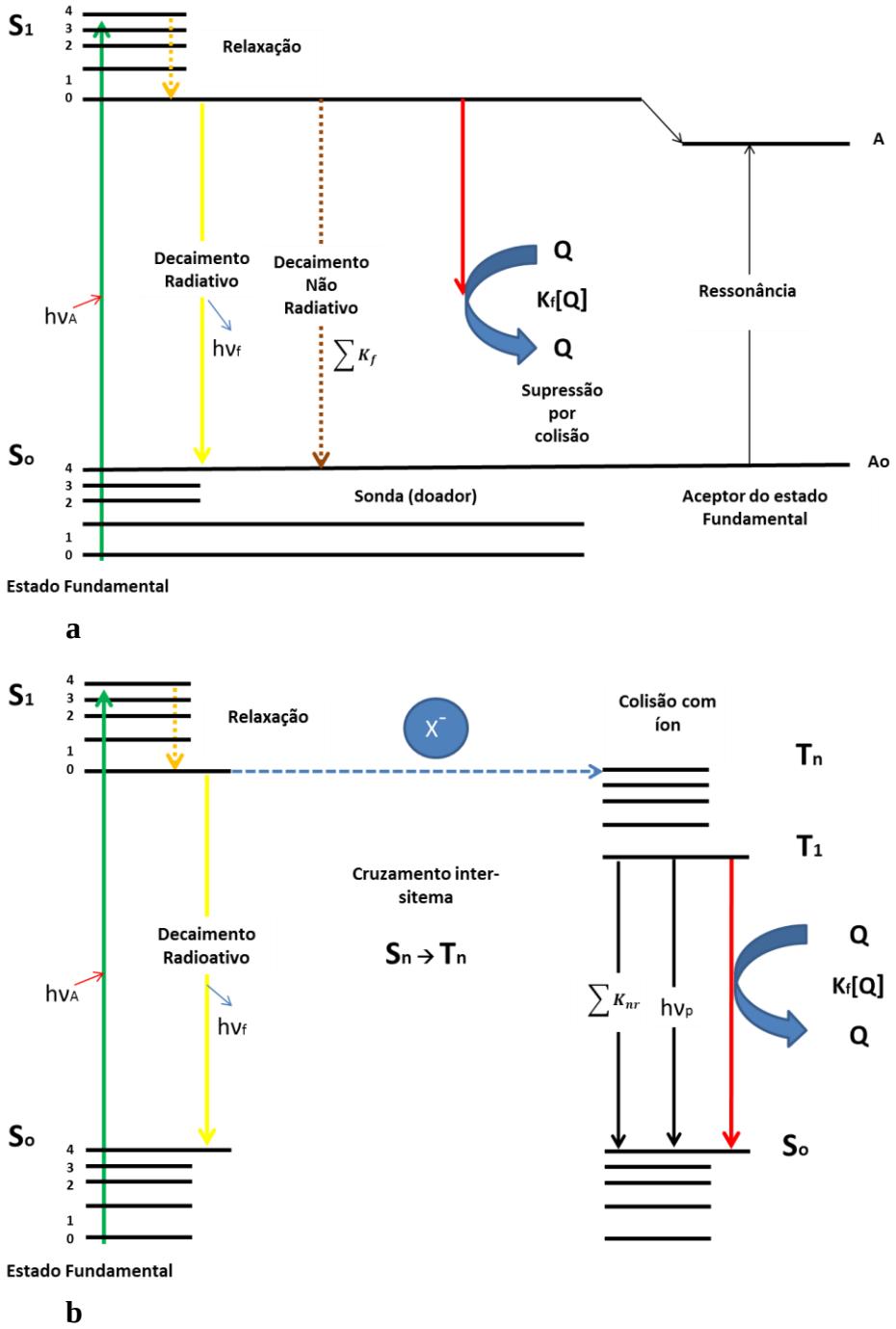


Figura 1.4: Diagrama de Jablonsky mostra: (a) absorção $h\nu_A$; decaimento não radioativos $\sum K_{nr}$; decaimento radioativo $h\nu_F$, i.e. *fluorescência*, e outros caminhos não radioativos para o estado fundamental de supressão de fluorescência por colisões e FRET. (b) supressão de fluorescência por íons de halogênios, onde o estado tripleto resultante pode ser despovoado por: processos não radioativos; decaimento radioativo $h\nu_P$, i.e. *fosforescência i* ou supressão, por exemplo pelo O_2 dissolvido.[71].

Detectores de ferro por fluorescência são baseados em sondas ou moléculas sensíveis ao ferro, que sofrem mudanças rápidas e monitoráveis como resultado da interação com o ferro disponível[74,75]. Os sensores fluorescentes de ferro apresentam uma porção sinalizadora (fluoróforo) com alto rendimento quântico e outra porção definida para fornecer a mais alta capacidade de complexação pelo ferro[76].

Fluoróforos comuns como o nitrobenzfurazan (NBD) ou fluoresceína (Fl) podem ser acoplados a quelantes de ferro, tais como desferrioxamina (DFO) ou sideróforos invertidos [77,78]. O quelante aproxima o íon metálico do ambiente fluoróforo, e aquele desencadeia a supressão de fluorescência por transferência de carga ou de energia [79,80]. O ferro catiônico é inerentemente paramagnético, e portanto, capaz de originar uma desativação não radioativa[81].

Vários quelantes e sideróforos têm sido utilizados como receptores de alta afinidade por ferro, com a fluoresceína como porção fluorescente. Na **Figura 1.5** se mostram as primeiras sondas desenhadas para cumprir o papel de sensor de metais, que é representado por NBD e Fl, análogos de desferroxamina (NBD-DFO e Fl-DFO) [75,82], sideróforos invertidos (RSF)[83], DTPA (Fl-DTPA)[84], EDTA (calceína), fenantrolina (Fl-Fen, verde) e transferrina marcada com fluoresceína (Fl-Tf) [85].

Outros sideróforos naturais ou sintéticos, diferentes do DFO, podem ser acoplados a sondas fluorescentes ou tornados intrinsicamente fluorescentes na busca de sintetizar novas sondas fluorescentes específicos de ferro[83,86–90]. Os ligantes conjugados de fluoresceína mostrados na **Figura 1.5** tem o mesmo rendimento de fluorescência da fluoresceína nativa em condições fisiológicas (pH 7,4). Quando complexados ao ferro, esses conjugados apresentam supressão de fluorescência [75].

Em condições ambiente as sondas guardam uma estequiometria (metal:sonda) 1:1 para o Fl-DFO, Fl-DTPA e CAL; 2:1 para a Fl-Tf, e 1:3 para a Fl-Phen[91–93]. A detecção de ferro lábil pode ser conseguida sem saturar completamente a sonda. A eficiência da supressão máxima devido ao metal varia entre 70 e 90%, dependendo da sonda (**Figura 1.6)** com a CAL, Fl-Phen, e Fl-DFO mostrando valores mais elevados de supressão (background insignificante), enquanto que a Fl-Tf mostra os menores valores de supressão com background significativo[91].

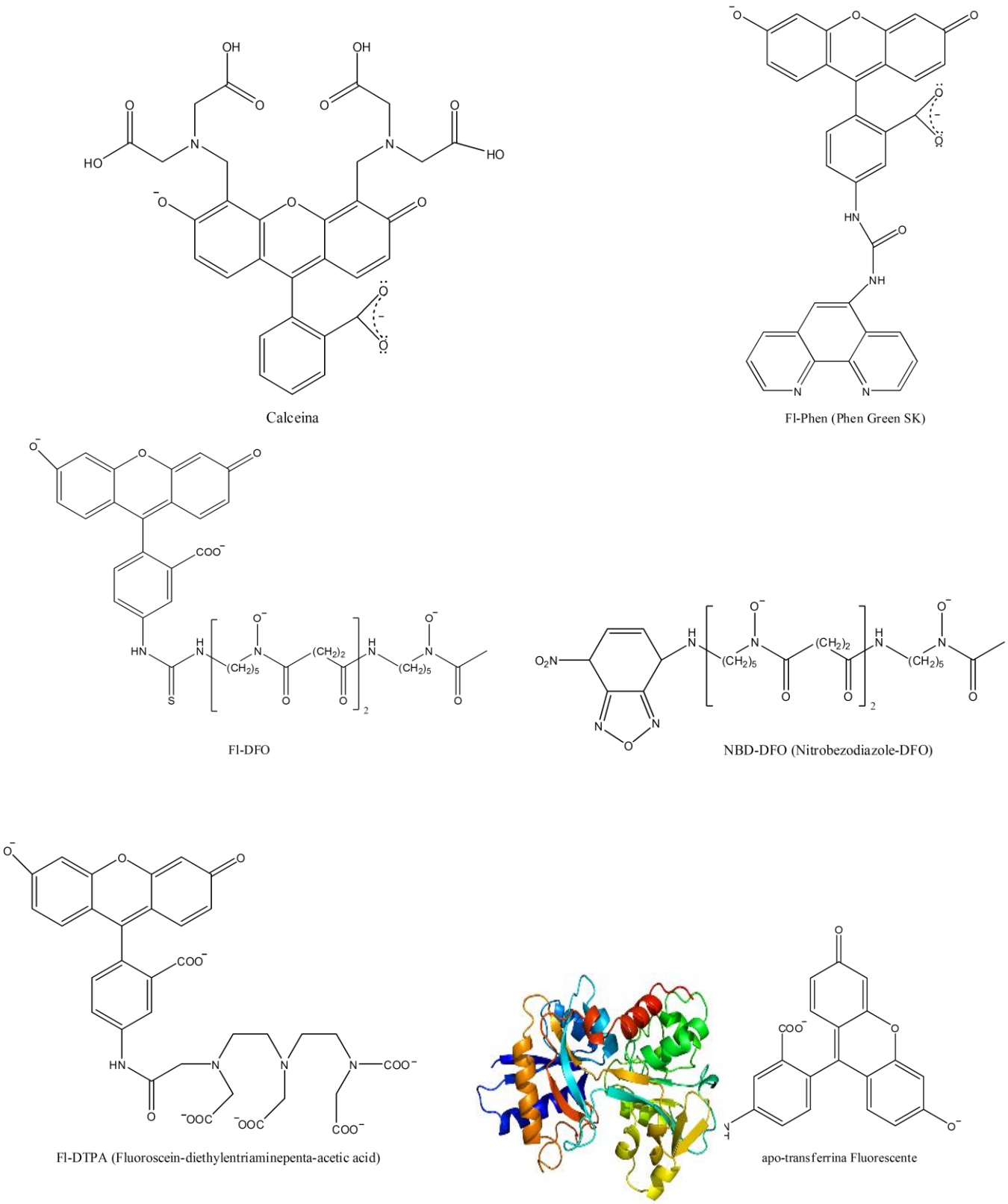


Figura 1.5: Estruturas químicas de algumas sondas fluorescentes para ferro[91].

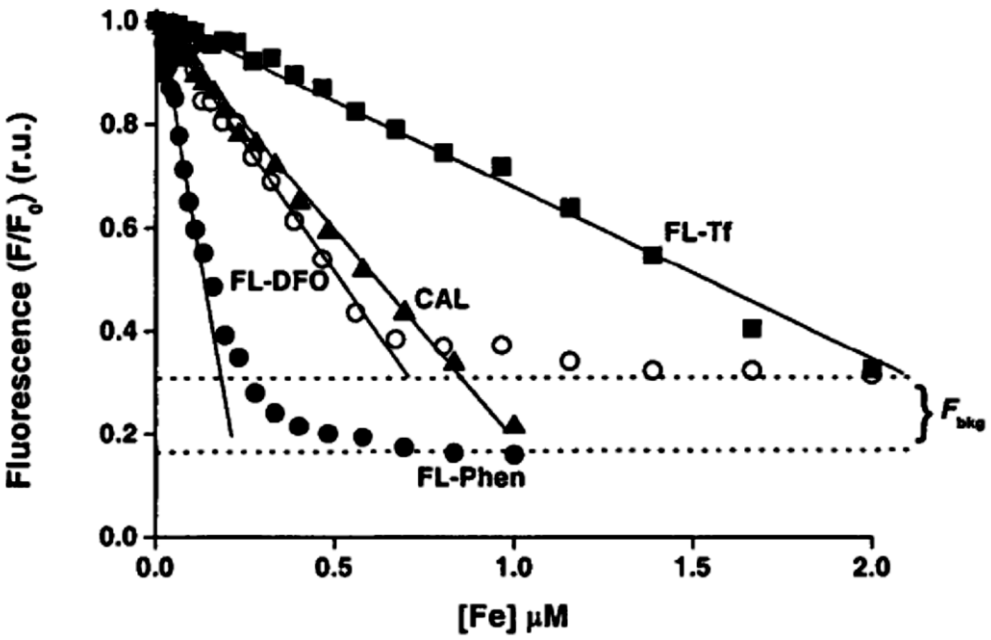


Figura 1.5: Detecção de ferro por titulação fluorimétrica com diferente sondas vs. concentração de ferro[91]

Devido ao interesse em estudar os reservatórios de ferro lábil celulares, muitas técnicas foram aprimoradas[50,91,92,94–96]. Métodos iniciais envolveram o monitoramento de pequenas quantidades de ferro lábil através da transferrina[97], complexação com desferrioxamina, detecção por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)[98], e fracionamento de espécies citossólicas de baixo peso molecular e identificação de complexos que contem ferro em células [99]. Uma necessidade de estudar o ferro lábil não-destrutivamente levou ao desenvolvimento de técnicas de fluorescência. O protocolo mais comum utiliza calceína-acetoximetila (CAL-AM), o éster de calceína que é membrana-permeável e não-fluorescente[100]. A CAL-AM é hidrolisada por esterases intracelulares, liberando calceína, que se liga ao ferro no reservatório lábil. A supressão da fluorescência resultante é usada para calcular a concentração de ferro total (**Figura 1.7**) Mas esta técnica não pode ser aplicada para o estudo de qualquer outro íon metálico, devido à pouca seletividade da calceína, que deveria ser contrabalançada com o enorme excesso de ferro em relação a outros íons metálicos no citossol. Um número de novos quelantes fluorescentes têm sido recentemente desenvolvidos para permitir imagens mais sofisticadas dos reservatórios de ferro lábil em células vivas, incluindo alguns que são seletivos para Fe(II) ou Fe(III) [94,101,102].

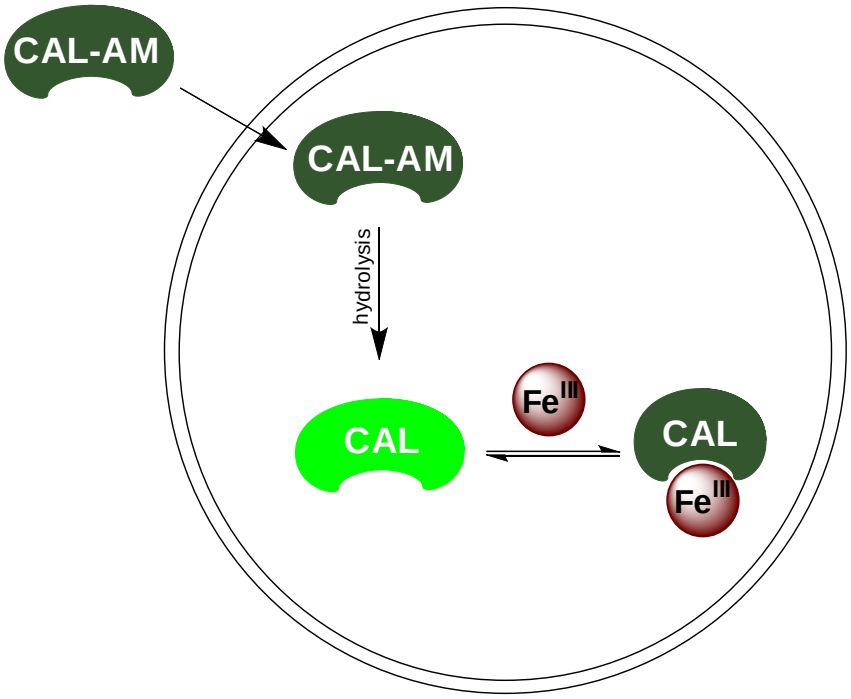


Figura 1.7: O método da calceína para a medição de reservatórios de ferro lábil (LIP). (A) As células são tratadas com o derivado acetometoxi da calceína (CAL-AM), que é não fluorescente e é permeável pela membrana. Na célula, o CAL-AM é hidrolisado a calceína (CAL), que é altamente fluorescente, mas é suprimida bruscamente mediante a ligação com ferro[94].

1.4 Fármacos no meio ambiente

Atualmente, se reconhece que a água pode ser ao mesmo tempo uma fonte vital para os organismos vivos e um veículo para eliminação de poluentes. Esse antagonismo pode ser considerado como parte do atual problema no ambiente que está inserida no conflito entre natureza, tecnologia e indústria. Este paradigma é acompanhado pelo emprego de bioindicadores, que consistem em indicadores bioquímicos e celulares na presença de contaminantes através da análise de fluidos corpóreos bem como células ou tecidos, e atualmente parâmetros comportamentais têm sido reconhecidos por estabelecer interferências ecológicas juntamente com observações bioquímicas e/ou fisiológicas[103,104].

Muitas áreas estuarinas e costeiras em desenvolvimento são objeto de despejo de metais pelo homem e o acúmulo destes, especificamente ou não essenciais, é muito dependente da concentração ambiental na água e o período ao qual os animais são expostos a essas concentrações, além de existir também outros fatores que afetam processos de acúmulo, como temperatura e salinidade[105]. Nas últimas décadas, entretanto, em decorrência dos processos de urbanização e de industrialização, quantidades consideráveis de metais são introduzidas nos sistemas aquáticos.

A porção costeira do mar está frequentemente contaminada por diversos tipos de poluentes e patógenos humanos devido à atividade humana[106–108], e a mineração é considerada uma das mais importantes fontes antropogênicas de metais, juntamente com a queima de combustível fóssil, incineração, processo e produção de substâncias químicas. Além disso, o despejo industrial e atividades como extração de metal, representam contínua ameaça para o ambiente aquático[109].

A vida aquática está constantemente exposta à contaminação química devido ao aumento da variedade de atividades antropogênicas que podem induzir diversos mecanismos de toxicidade, cada um contribuindo para a variação dos estágios que levam à efeitos deletérios, podendo ao final, serem potencializados[106,110]. Muitos destes componentes perigosos tais como os metais, podem ser acumulados em tecidos de crustáceos em concentrações mais elevadas que aquelas encontradas na coluna de água e sedimento[111] , e, por isso, tanto os metais essenciais quanto os não essenciais podem se tornar tóxicos[112].

Problemas de poluição são comuns na costa do Atlântico, onde há constante despejo de metais, nutrientes e compostos orgânicos, e em diversos sistemas os efeitos diretos e indiretos de poluentes têm causado impactos ambientais e econômicos, os quais incluem o acúmulo de contaminantes na biota, causando considerável aumento de anomalias de reprodução e desenvolvimento relacionadas com a poluição. Além de tais efeitos, foram observadas alterações nas condições físicas, fisiológicas e bioquímicas de peixes e invertebrados em geral[113]. Como resultado da poluição através da introdução antropogênica direta e indireta de moléculas, surgem efeitos deletérios para fontes de habitat e até para a saúde humana[104].

Poluentes como os metais acumulados em sedimentos atingidos por esgotos podem ser prejudiciais para invertebrados bênticos expostos e podem ser carreados através da dieta, aos seres humanos, por exemplo, já que estes consomem frutos-do-mar. Tais contaminantes podem causar alterações dos processos biogeoquímicos e fisiológicos de organismos na base da cadeia alimentar, os quais podem ser quantificados por parâmetros biológicos estimados (frequentemente reportados como índices de estresse ou bioindicadores), cujas variações podem ser relacionadas com o *status* fisiológico dos animais[113,114].

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de organismos bênticos, próximos a esgotos, em acumular metais. Particularmente, as lagostas são conhecidas por acumular altas concentrações de metais oriundos do ambiente, principalmente no hepatopâncreas (glândula digestiva)[115]. Muitos contaminantes ambientais não somente entram através das brânquias, mas também exercem efeitos tóxicos primários no epitélio branquial devido à interferência em um ou mais processos fisiológicos essenciais dos animais[116].

Muitos fármacos, utilizados na medicina humana e veterinária, são excretados na sua forma original ou como metabólitos, e são detectados em ambientes aquáticos em baixas concentrações (ng L^{-1} – μg L^{-1}), mas que podem causar danos para o meio ambiente e para a saúde humana [117,118].

Nestes últimos anos várias pesquisas descreveram a presença de novos compostos chamados de "poluentes emergentes", em águas residuais e ambientes aquáticos[119]. A *Environmental Protection Agency* (EPA) dos EUA define poluentes emergentes como novos produtos químicos para os quais o descarte ainda não está legislado e que possuem efeitos desconhecidos sobre o meio ambiente e a saúde humana[120].

A presença de fármacos em ambientes aquáticos começou a receber atenção na década de 1970, onde uma pesquisa mostrou a presença de ácido clofíbrico, metabólito dos antilipêmicos clofibrato e etofibrato, na faixa de concentração de μg L^{-1}, em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) na cidade de Kansas, nos Estados Unidos[121]. Desde então, uma grande quantidade de trabalhos relatam a presença de fármacos em diversos ambiente aquáticos, em várias partes do mundo[122–126].

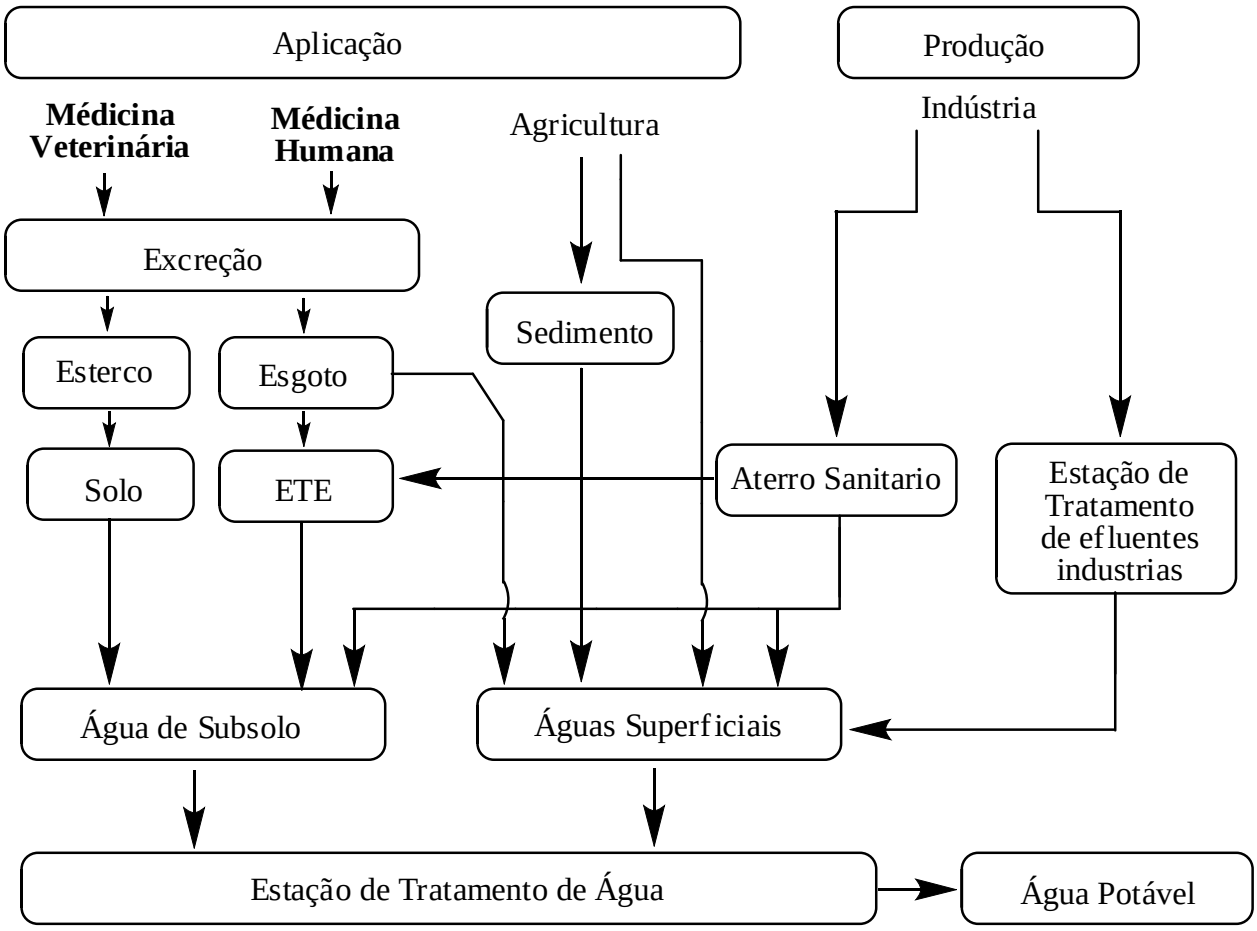
No Brasil, uma das primeiras pesquisas publicadas sobre a presença de fármacos em ambientes aquáticos, detectou a presença de ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico, entre outros em resíduos de ETE[127].

Em torno de 100.000 produtos farmacêuticos são atualmente registrados na *Food and Drug Administration* (FDA) [128]. A excreção desses produtos ou de seus metabólitos é a principal fonte de contaminação de sistemas naturais por fármacos, sendo que os antibióticos representam a maior porcentagem desses produtos. Os antibióticos são usados em medicina veterinária, humana e em culturas aquáticas para prevenir infecções microbianas[129].

O Brasil é o nono maior mercado de fármacos e medicamentos do mundo, e possui grandes indústrias em seu território[130]. A indústria nacional lidera as vendas no mercado interno e investe em pesquisas, como a fabricação de medicamentos genéricos. Segundo dados do Ministério da Saúde, o mercado farmacêutico movimenta anualmente em torno de R$ 54 bilhões (2014) com uma previsão para o 2017 de R$ 100 bilhões[131]. Em um estudo realizado em 2010, verificou-se a existência de 540 indústrias farmacêuticas cadastradas no Brasil, sendo 90 produtoras de medicamentos genéricos[132].

Os fármacos são absorvidos pelo organismo e estão propensos a reações metabólicas. No entanto, uma quantidade significativa de fármaco administrado não é absorvida pelo organismo e poderia ser eliminada através da urina, fezes ou esterco animal, podendo ser descartadas no esgoto doméstico[133]. Outra fonte de contaminação pode ocorrer através do descarte sem tratamento prévio de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, contaminando águas subterrâneas e mananciais[133].

O **Esquema 1.2** ilustra possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente. Existem três destinos possíveis para os fármacos encontrados nas ETE[134]: os biodegradáveis que são mineralizados a dióxido de carbono e água (p. ex. ácido acetilsalicílico); os que são processados metabolicamente ou serão degradados parcialmente (p. ex. penicilinas); e os persistentes (p. ex. clofibrato) [133].



Esquema 1.2: Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente[133].

As pesquisas que têm como principal objetivo a detecção de fármacos no meio ambiente iniciaram-se a partir da década de 1970. Nos Estados Unidos esta área de pesquisa iniciou-se em 1976[121], na Inglaterra em 1985[134], na Alemanha em 1996[135] e no Brasil, em 1997[127] .

Há quase vinte anos, detectaram-se diversos fármacos (diclofenaco, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno ,cetoprofeno, fenoprofeno etc.)[127,136] em amostras de águas residuais tratadas e não tratadas e em águas naturais, na cidade do Rio de Janeiro[127]. As concentrações dos fármacos encontrados nos efluentes de estações de tratamento de esgoto variaram entre 0,1 a 1 mg L^{-1}. As taxas de remoção dos fármacos, após a passagem pela ETE, variaram entre 12 a 90%. Desse modo, devido à remoção parcial, foi possível detectar alguns fármacos em rios, em concentrações que variaram entre 0,002 e 0,5 μg L^{-1}.

Outras pesquisas relatam a presença de fármacos em águas superficiais com um monitoramento espacial e sazonal na bacia do rio Atibaia, principal manancial de abastecimento público da cidade de Campinas (SP)[137]. Dentre os fármacos encontrados, se ressaltam: diclofenaco de sódio (96 a 115 ng L^{-1}), paracetamol (13 a 280 ng L^{-1}) e ácido acetilsalicílico (618 a 1036 ng L^{-1}). As maiores concentrações desses compostos foram observadas na época de seca e observou-se que o número de contaminantes aumentou ao longo do rio Atibaia, predominantemente a jusante da cidade de Campinas[137].

Numa pesquisa elaborada na China (2007) , foram identificados nove usuais antibióticos (ofloxacino, norfloxacina, roxitromicina , eritromicina, sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametoxazol, amoxicilina e cloranfenicol) em amostras de água coletada no Victoria Harbour, Hong Kong e no Pearl River em Guangzhou[138,139]. Com exceção da amoxicilina, todos os antibióticos foram detectados no Pearl River durante as épocas de cheia e seca com concentrações que variaram entre 11 a 67 ng L^{-1} e entre 66 a 460 ng L^{-1}, respectivamente[139]. A ocorrência, o destino, a influência sazonal e geográfica e a avaliação do risco ambiental dos onze fármacos mais consumidos em Portugal foram estudadas recentemente[140] nas ETE e estações de tratamento de afluentes. As coletas foram realizadas em diferentes estações de tratamento por todo país durante o verão e a primavera, em 2013. Os fármacos mais encontrados foram os reguladores de lipídios (bezafibrato, genfibrozila e sinvastatina), os anti-inflamatórios (diclofenaco, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno) e os antibióticos (azitromicina e ciprofloxacina)[138,139]. Em uma revisão sobre a detecção de uma série de antibióticos e hormônios sintéticos em diferentes efluentes e sistemas aquáticos do Vietnã [141], o antibiótico norfloxacina foi encontrado em efluentes hospitalares[142] e em lagoas de cultura de camarão[143] na faixa de concentração entre 10 a 15 μg L^{-1} e 0,06 a 6,06 mg L^{-1}, respectivamente.

A contaminação de águas por fármacos está se tornando uma preocupação mundial, com graves consequências ambientais. O conhecimento das causas, da ocorrência e dos efeitos dos fármacos como poluentes ambientais é necessário para a evolução de novas tecnologias nas ETE e no tratamento de resíduos industriais e melhor fiscalização governamental.

1.4.1 Metalofármacos de Fe e sua toxicidade

As inúmeras atividades biológicas exercidas por íons metálicos têm há algum tempo estimulado o desenvolvimento de fármacos à base de metais (metalofármacos). Embora o uso de compostos inorgânicos para o tratamento de enfermidades seja muito antigo, até a descoberta da atividade antitumoral do complexo denominado cisplatina, $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, em 1965, não havia grande interesse em sintetizar ou entender as bases moleculares responsáveis pelo mecanismo de ação destes compostos. De fato, a descoberta da cisplatina impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos à base de metais[144]. Elementos inorgânicos têm um papel importante em processos biológicos. Alguns compostos orgânicos usados na medicina não apresentam uma ação puramente orgânica, sendo ativados ou biotransformados após a coordenação com íons metálicos, incluindo as metaloenzimas. Dessa forma, a coordenação de metais a fármacos e moléculas que não são utilizadas como medicamento, representa um considerável potencial para aumentar a quantidade de medicamentos disponíveis para o tratamento de enfermidades[145]. No caso específico de compostos inorgânicos, a bioacumulação do íon metálico pode causar efeitos colaterais graves e, portanto, devem ser investigados aspectos farmacológicos e fisiológicos in vivo utilizando modelos animais que comprovem a eficácia e segurança do composto antes da liberação do fármaco para testes clínicos em humanos[146].

Os seres humanos são expostos naturalmente a baixas concentrações de metais através da água ou de alimentos, porém essa faixa de concentração tem aumentado devido a atividades antropogênicas, agrícolas e industriais[145]. Metais pesados em nível de traços são considerados um dos principais poluentes do meio ambiente. Em particular, a rápida difusão de metais pesados no ambiente necessita de uma determinação a níveis muito baixos, pois esses elementos tendem a se concentrar em todas as matrizes envolvidas, como alimentos, causando efeitos danosos, e em alguns casos, irreversíveis ao homem. Metalofármacos de Fe incluem suplementos à base de dextrano e/ou aminoácidos, de uso humano ou veterinário, anti-hipertensivos, e derivados do ferroceno, como o ferroceno-TMH e a ferrocloroquina **Figura 1.8,** que apresentam atividade antitumoral e antimicrobiana, além de induzirem sobrecarga do metal até mais eficientemente do que os íons livres[147] . Além disso, nanomateriais baseados em ferro, como Endorem® ou Feridex®, têm sido cada vez mais propostos como agentes carregadores, agentes de

contraste para imagens, direcionadores magnéticos de células e proteínas, e em terapia por hipertermia[148–151]. Portanto, é possível antecipar uma procura e produção maiores por derivados desse metal.

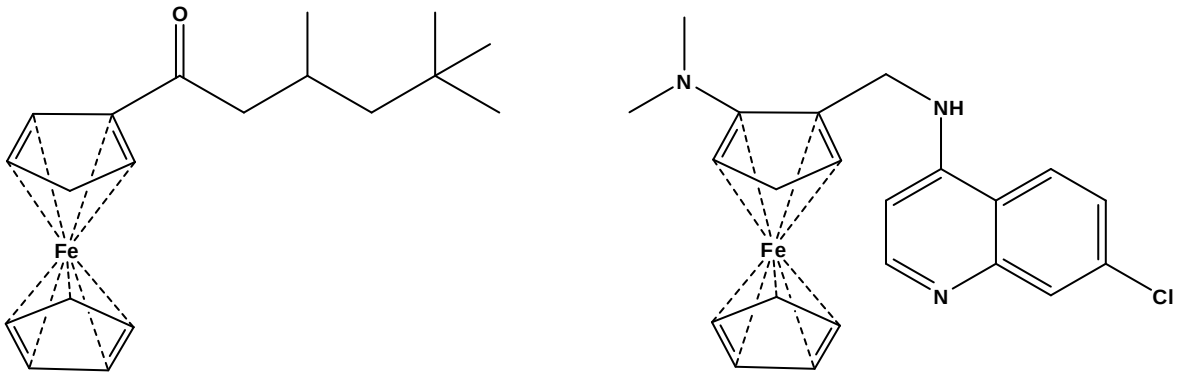


Figura 1.8: TMH-ferroceno (esquerda) e ferrocloroquina (direita).

A possibilidade de sobrecarga de ferro e concomitante dano oxidativo induzida por alguns suplementos[152] e derivados de ferroceno[14,153,154] tem sido reconhecida (mas isso não tem sido avaliado para nanomateriais [150]). Entretanto, até o momento os trabalhos se centraram na avaliação de aumento de NTBI em animais, sem avaliar os riscos de danos oxidativos (LPI), e especialmente suas estabilidades frente a complexantes competidores em meio fisiológico. Cremos que a compreensão desses fundamentos é necessária para racionalizar a toxicidade de metalofármacos de ferro e, por extensão, de outros metais.

1.4.2 Nanofármacos

Acredita-se que os nanofármacos podem atingir uma melhor relação risco-benefício como o aumento da eficácia farmacológica nos órgãos-alvo e uma absorção toxicológica reduzida nos órgãos-alvo, tendo como resultado uma diminuição de efeitos adversos[155].

Os campos crescentes da nanociência e nanotecnologia tem transformado muitos setores da indústria, com aplicações inovadoras nas áreas de biotecnologia, eletrônica, cosmética, ciência de alimento e farmacêutica. Em particular, a aplicação estratégica das nanotecnologias para a pesquisa e desenvolvimento farmacêutico levou ao desenvolvi-

mento com sucesso de nanofármacos, descritos como sistemas de administração de fármacos desenvolvidos para operar na faixa de tamanho de nanômetros com novas propriedades que proporcionam benefícios médicos no tratamento clínico de várias doenças[156,157].

A pesquisa sobre a distribuição racional e direcionamento de produtos farmacêuticos, terapêuticos e agentes de diagnóstico está na vanguarda de projetos em nanofármacos. Os primeiros esforços em nanofármacos foram focados em melhorar as propriedades moleculares dos agentes terapêuticos e de diagnóstico[156]. Mais recentemente, os pesquisadores da nanotecnologia tentaram aplicar novas modalidades de diagnóstico e terapêutico para uma melhora evolutiva na medicina. Os principais objetivos no desenvolvimento de nanofármacos são o direcionamento de uma específico de entrega, maior segurança e biocompatibilidade, desenvolvimento mais rápido dos novos medicamentos com uma margem de segurança e melhoramento no comportamento farmacocinético[156–158]

Algumas décadas antes que a comunidade cientifica e autoridades reguladoras reconhecessem as características dos nanofármacos, as nanopartículas de ferro foram introduzidos na prática clínica, como por exemplo complexos de ferro via intravenosa como suplemento[159]. Excedendo seu uso para o tratamento de anemia, as nanopartículas de óxido de ferro foram ou estão sendo desenvolvidas para uma ampla gama de usos médicos[160,161]. Esses medicamentos estão formados comumente por magnetita com um revestimento de sacarídeo biocompatível[162]. A biocompatibilidade das nanopartículas de óxido de ferro com o órgão-alvo é o primeiro pré-requisito para iniciar estudos clínicos, já que desde há muito tempo se acredita que as nanopartículas de ferro têm baixa toxicidade, e são bem tolerados no corpo humano[163]. No entanto, com a aplicação crescente de nanopartículas de óxido de ferro, a ocorrência de efeitos tóxicos, tais como estresse oxidativo e reações inflamatórias, têm atraído cada vez mais atenção[164]. As nanopartículas se acumulam nos lisossomos (após a internalização na célula), onde o pH baixo quebra o óxido de ferro do núcleo em íons de ferro[163,165]. Tem sido demostrado que a exposição a nanopartículas de ferro pode induzir citotoxicidade por inalação pulmonar através do estresse oxidativo e respostas inflamatórias em ratos[163,166]. Embora a substância ativa seja ferro em todos os produtos, diferenças claras na biodistribuição e toxicidade

entre os diferentes complexos têm sido mostrados em estudos clínicos[167–170] e não clínicos realizados[171–174].

Ademais, existem estudos que avaliam o uso de nanopartículas de ferro zero valente (nZVI) para a descontaminação de águas residuais que apresentam fármacos como os principais contaminantes[175–179] e alguns outros metais[180,181]. No entanto os nZVI apresentaram toxicidade em diferentes organismo aquáticos, especificamente três espécies de fitoplâncton marinho, uma espécie de fitoplâncton de água doce, e uma espécie de zooplâncton de água doce (Daphnia magna),devido à alta atividade redox que apresenta[182], somando isto aos metalofármacos de ferro presentes no ambiente, que serviriam como contaminantes específicos para outras espécies aquáticas [183].

Assim, este trabalho poderia ser um dos pioneiros quanto à avaliação de toxicidade e danos fisiológicos de metalofármacos de ferro em organismos aquáticos.

1.5 Bioindicadores de toxicidade aquática

Bioindicadores são modelos animais utilizados para determinar o grau de contaminação de um determinado ambiente[184].

Os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo crescente processo de contaminação oriundo de atividades industriais, agrícolas e urbanas. A mensuração apenas destes contaminantes no ambiente não traz respostas sobre os efeitos adversos que estas substâncias vêm causando nos organismos vivos presentes nestes ambientes[184,185].

Desta forma, no biomonitoramento dos corpos d’água devem ser incluídas ferramentas biológicas que tragam respostas sobre o estresse e os efeitos que estes poluentes vêm causando, possibilitando o estabelecimento de relações de causa-efeito[186].

Estas respostas biológicas, chamadas de bioindicadores, vêm sendo utilizadas para avaliar a exposição e o efeito causados por diferentes contaminantes, tais como, metais, compostos orgânicos e agrotóxicos. Os bioindicadores constituem uma abordagem eficiente nos estudos de avaliação do risco e impacto ambiental, pois detectam de forma precoce os efeitos reais que estão ocorrendo aos seres vivos em situações de ex-

posição a ambientes poluídos. O uso de bioindicadores é fundamental para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção a estes ambientes[186].

1.5.1 *Artemia salina* (*Crustacea, Branchiopoda*)

Modelos experimentais com *Artemia salina* (**Figura 1.9**) (Brachiopoda: Anostraca) são comumente utilizados para análise fisiológica comparativa entre crustáceos de ordens diferentes. Por serem facilmente manipuláveis em laboratório, fornecem possibilidades de estudo em diversos estágios do desenvolvimento, desde náuplios até adultos. Artêmias são consideradas um modelo confortável e confiável para testes e experimentos. Em 1956, foi publicado na Science o artigo *"Artemia como organismo de bioteste"*, alavancando as pesquisas e os testes com esses animais[187].

Artemia salina é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos d'água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 ‰[188]. Aqueles crustáceos desempenham um importante papel na corrente de energia da cadeia alimentar[189] e pode ser utilizada em ensaios de laboratório para determinar toxicidade de alguma substância através da estimativa da dose letal para 50% de uma população (valores de LC50)[190].

Animais dessa ordem são artrópodes primitivos que pouco se modificaram desde o período Triássico. Com um corpo segmentado e ligado a apêndices que parecem folhas, variam de tamanho entre 8-10 mm nos adultos machos e 10-12 mm nas fêmeas. O exoesqueleto é trocado periodicamente e nas fêmeas a muda precede todas as ovulações.

Os náuplios são diecdísicos, tipo de ciclo da muda com estágio de pré-muda predominantemente maior do que a intermuda[191], enquanto em adultos o período predominante do ciclo da muda é a intermuda[192] .

Artemia salina produz pequenos cistos que sobrenadam na água e são levados pelo vento e pela maré. Os cistos de *Artemia* tem um metabolismo inativo e não se desenvolvem se são mantidos secos. Quando esses cistos são imersos em água do mar, passam de formato bicôncavo, para esféricos, e dentro da casca, um embrião retoma as

atividades metabólicas. Depois de 20 horas aproximadamente (varia com temperatura e fotoperíodo)[193], o cisto é rompido e um embrião aparece[194]. Enquanto embrião, ele permanece embaixo da casca do cisto vazio e o desenvolvimento do náuplio é completo em um período curto após a eclosão do cisto[195].

Figura 1.9 :*Artemia salina*

1.5.2 *Ucides cordatus (Crustacea, Brachyura, Ocypodidade)*

Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) é um caranguejo, considerado o maior Ocypodidae de mangue (**Figura 1.10)** e pertence à família Ucididae[196], presente em mangues, um ambiente com condições flutuantes, devido ao ciclo de maré e à constante instabilidade do tempo, muito comuns em regiões tropicais. *Ucides cordatus* é considerado um bom osmorregulador, capaz tanto de hipo quanto de hiperosmorregular e, embora seja o gecarcinídeo aquático, possui dispositivos respiratórios que se assemelham aos dos caranguejos terrestres[197]. Além de ser um caranguejo que faz incursões terrestres na maré baixa, quando ocorre a limpeza da toca[197], apresenta comportamentos de construção e alimentação fora da água por diversas horas, ficando, portanto, diretamente exposto a contaminantes depositados no ambiente[197,198].

O caranguejo *Ucides cordatus* está amplamente distribuído ao longo da costa brasileira, habitando tocas individuais com até 1 metro de profundidade, situadas abaixo

das árvores do mangue. Além destes, uma alta pressão predatória do *Ucides cordatus* é exercida pelos seres humanos que usam o caranguejo como alimento[199] .

Ucides cordatus é considerado um importante membro da fauna do manguezal na costa Atlântica do continente americano. É também, naturalmente, uma espécie exposta a flutuações da salinidade, a qual pode variar de 2 a 33‰ e consegue manter uma concentração de sódio entre 300 e 390 mM, em salinidade acima de 34‰[200] . Esses fatores indicam a presença de mecanismos osmorregulatórios evoluídos capazes de bombear NaCl do meio externo para hemolinfa em salinidade abaixo de 26‰ e também, em meios mais concentrados, secretarsódio e cloreto[197].

Figura 1.10: Caranguejo *Ucides cordatus*

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

Fármacos em geral, sejam comerciais ou de pesquisa, e metalofármacos de ferro em particular, estão desenhados para ser estáveis e ao mesmo tempo ativos para desempenhar a função para a qual foram fabricados. Então, é importante entender a problemática destes compostos quando são liberados no meio ambiente, que interagem direta e indiretamente com nosso habitat.

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade dos diferentes compostos de ferro por métodos de fluorescência, frente a ligantes fluorescentes de diferente natureza e de grande afinidade pelo ferro (DFO, CAL, Tf), em diferentes meios biologicamente relevantes, como soro sanguíneo (humano) e água do mar (crustáceos).

Uma vez avaliada a estabilidade, outro parâmetro importante foi determinar a capacidade oxidante desses compostos, tanto em solução como em animais inteiros.

Um terceiro objetivo foi avaliar a toxicidade dos compostos de ferro em um biomodelo de toxicidade aquática (*Artemia salina*) através da mortalidade (LC50).

O quarto e último objetivo foi determinar, a nível celular, a quantidade de ferro transportado em linhagens de hepatopâncreas de caranguejos *Ucides cordatus* em diferentes estágios de desenvolvimento (E, R, F e B).

Capítulo 3

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Compostos Comerciais de ferro

Oito suplementos de ferro comerciais com diferentes envolturas orgânicas para o ferro(III), de uso humano e veterinário, de administração oral e intravenosa, foram obtidos de diferentes indústrias farmacêuticas do Brasil (**tabela 1**).

Tabela 3.1: Fármacos comerciais de ferro(III) de diferentes procedências de indústrias brasileiras.

Nº Amostra	Fármaco	Composto principal	Laboratório
F 1	Gleptoferril *†	Complexo Macromolecular de ferro(III) - Glucoheptonato dextrano	**Eurofarma Laboratórios Ltda**. Industria Brasileira
F 2	Biovet/Bio-Ferr *†	Complexo de Hidróxido de ferro(III) dextrano	**Laboratório BIOVET S.A.** Industria Brasileira
F 3	Dexiron*†	Complexo de Hidróxido de ferro(III) dextrano	**FATEC S.A.** Industria Brasileira
F 4	Ferro dextrano*†	Complexo de Hidróxido de ferro(III) dextrano	**Uzinas Chimicas Brasileiras S.A.** Industria Brasileira
F 5	Fertal*†	Complexo de Hidróxido de ferro(III) dextrano	**Mogivet Farmacêutica** Industria Brasileira
F 6	Ferrodex*†	Complexo de Hidróxido de ferro(III) dextrano	**Tortuga companhia Zootécnica Agraria** Industria Brasileira
F 7	Netrofer‡ ¥	Quelato de hidróxido ferro(III)-Glicinato	**EMS Sigma Pharma Ltda.** Industria Brasileira
F 8	Noripurum‡¥	*Complexo de Hidróxido ferro(III)-polimaltose*	**Nycomed Pharma Ltda.** Industria Brasileira

* Administração intravenosa (IV), ¥ Administração oral (AO), † uso veterinário, ‡ uso humano

3.1.1 Análise por absorção atômica dos compostos de ferro comerciais

A concentração de ferro dos fármacos comercias foi determinada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, AA6300 Shimadzu Atomic Absortion Spectrophotometer)[201]. A 500 µL de amostra são adicionados 5 mL de ácido nítrico e se aquece a 120 °C por 30 minutos. Em seguida se adicionam 5 mL de água Milli-Q e se transfere para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume acom água Milli-Q. Finalmente se prepara amostras de concentrações de 10 ppm para quantificar o conteúdo de ferro por FAAS[201]. A determinação das concentrações foi feita com ajuda de uma curva de calibração de ferro a partir do padrão 1000 ppm da Sigma-Aldrich em água Milli-Q.

3.1.2 Análise por espectroscopia de absorção no UV – Vis

Espectroscopia ultravioleta – visível (UV – Vis) é usada para mostrar a presença de a coordenação octaédrica de Fe(III) de spin alto. Os espectros obtidos foram registrados a partir de concentrações de 200 µM dos fármacos comerciais numa faixa de 200-1100 nm. As concentrações de ferro sacarose foram analisadas num HP 8453UV-Vis spectrophotometer. Todos os espectros foram registrados como absorbância em função do comprimento de onda em nanômetros.

3.2 Compostos não comerciais de ferro

3.2.1 Síntese de derivados de ferroceno

Dois grupos de compostos não comerciais foram obtidos a partir do ferroceno e $Fe(acac)_3$: 1) Derivados de ferroceno a partir da reação de acilação de Friedel-Crafts[202] do Ferroceno/ cloreto de 3,5,5-trimetilhexanoíla, e 2) nanopartículas de óxido de ferro hidrossolúveis pelo método de decomposição térmica do $Fe(acac)_3$ em meio orgânico[203,204], seguindo para ambas obtenções protocolos estabelecidos com algumas modificações.

Foram obtidos através da reação entre ferroceno (Fc) e cloreto de 3,5,5-trimetilhexanoíla, através de pequenas modificações no método de Nielsen[205] .

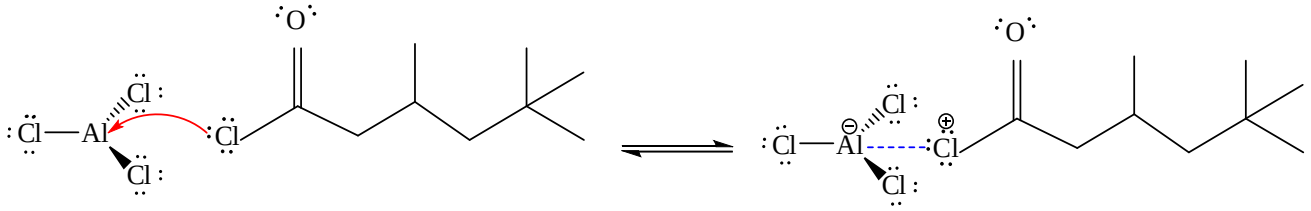
3.2.1.1 Síntese de TMH-Ferroceno

Em meio inerte de gás nitrogênio (Air Products) e com agitação, preparou-se uma mistura de reação de 1,29 g (9,7 mmol) de cloreto de alumínio (Sigma Aldrich),em 20,0 mL (25,5 mol) de diclorometano (Sigma Aldrich) e 1,50 g (8,1 mmol) de ferroceno (Sigma Aldrich) em 20,0 mL (25,5 mol) de diclorometano (Figura 1). O diclorometano foi saturado previamente com nitrogênio. Adicionou-se, gota a gota, 1,42 g (8,1 mmol) de cloreto de 3,5,5-trimetilhexanoíla (Sigma Aldrich) sob o sistema com água gelada (~ 3 ºC). O esfriamento do sistema foi feito com ajuda de uma mistura de água com nitrogênio líquido. Deixou-se a mistura sob aquecimento (~ 22,5 ºC) e manteve-se o sistema reagindo por 24 horas. Finalmente, adicionou-se sobre a mistura 50 g de gelo de água Milli-Q. Separou-se a fase orgânica e esta foi concentrada por evaporação a pressão reduzida. Diluiu-se o resíduo oleoso em 10 mL de tolueno sem tratar (Synth) e separou-se em uma coluna de gel sílica 60 (20 cm x 1 cm) (Merck) . A coluna foi eluída com tolueno e o eluato foi analisado por cromatografia em camada delgada (TLC, thin layer chromatograhy) com a fase estacionaria de sílica gel (Merck). As frações que contêm TMH-ferroceno (Rf=0,43) foram recolhidas e o tolueno foi eliminado por evaporação a pressão reduzida. O resíduo oleoso foi dissolvido em etanol sem tratar (Synth). Filtrou-se e eliminou-se o solvente a pressão reduzida, resultando um líquido oleoso vermelho-amarronzado.

Figura 3.1. Montagem para a reação de monossubstituição do ferroceno (o dosador é uma bureta de 5 mL).

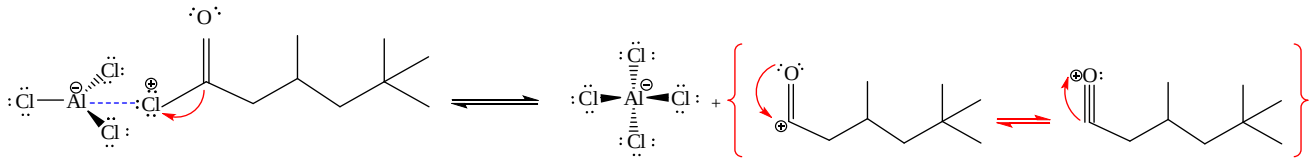
A proposta do mecanismo de monossubstituição do ferroceno através da acilação de Friedel-Crafts é esquematizada abaixo (**Esquema 3.1**):

Primeira etapa: Formação do íon acilia



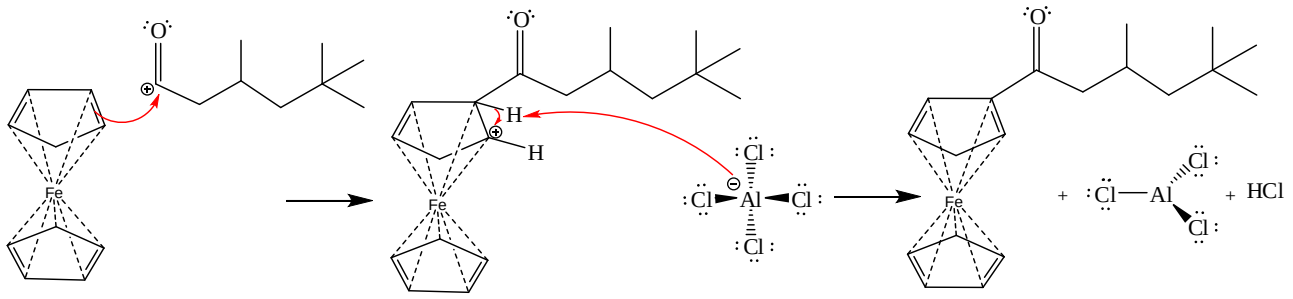
Cloreto de acila Complexo

Segunda etapa: Ataque eletrolítico

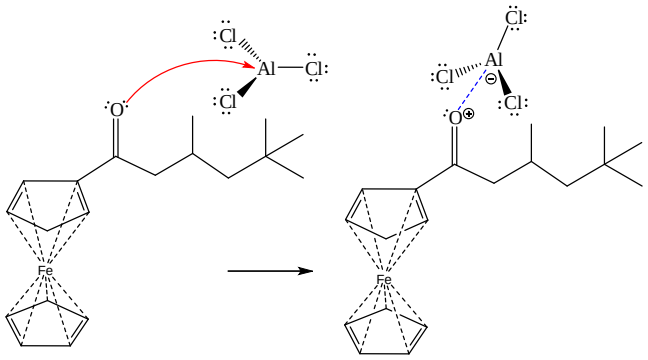


Íon acilia

Terceira etapa: perda de um próton e formação do produto.

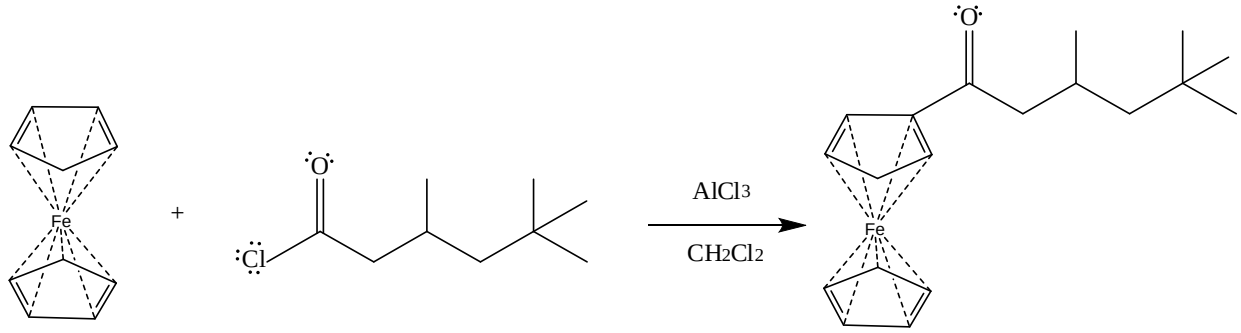


Complexo sigma TMH-ferroceno (Acil ferroceno)



Produto (complexo de Lewis)

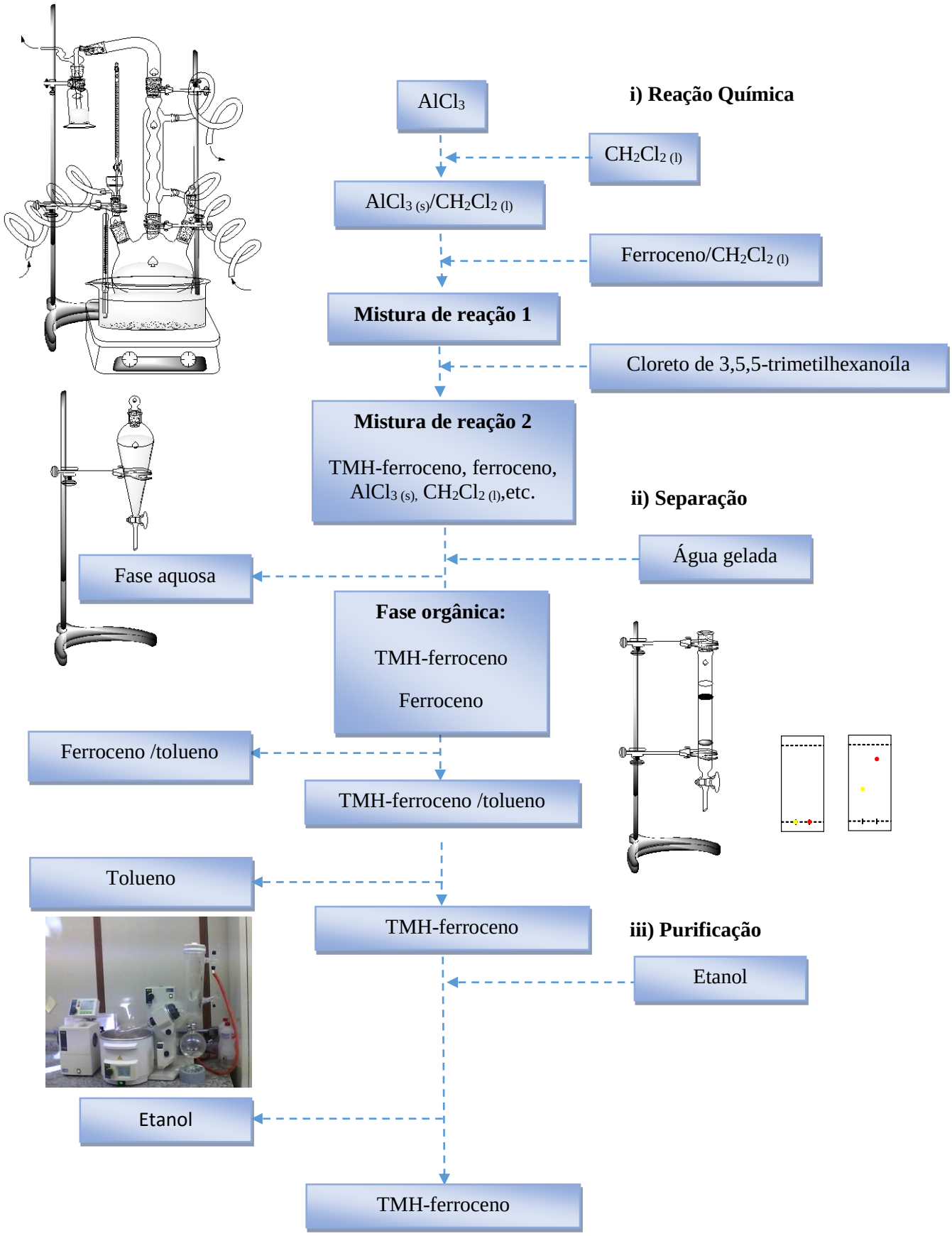
Equação global:



Ferroceno / 3,5,5 - cloreto de trimetilhexanoíla **TMH-ferroceno**

Esquema 3.1: Mecanismo de reação de Friedel-Crafts para a obtenção do TMH-Ferroceno[202].

Um fluxograma ilustrativo do procedimento sintético encontra-se abaixo (**Esquema 3.2**).



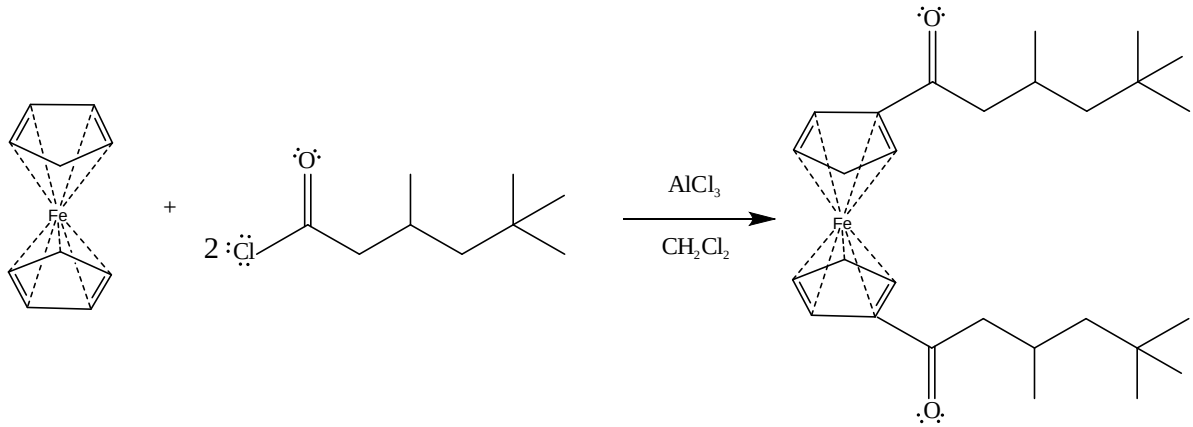
Esquema 3.2: Fluxograma para a síntese do TMH-Ferroceno.

3.2.1.2 Síntese de $(TMH)_2$-Ferroceno

Em meio inerte de gás nitrogênio (Air Products) e com agitação, preparou-se uma mistura de 1,79 g (13,4 mmol) de cloreto de alumínio (Sigma Aldrich) em 20,0 mL (25,5 mol) de diclorometano (Sigma Aldrich) e 2,18 g (12,4 mmol) de 3,5,5-trimetilhexanoíla (Sigma Aldrich) em 20,0 mL (25,5 mol) de diclorometano (**Figura 3.2**). Adicionou-se, gota a gota, 1,00g (5,4 mmol) de solução de ferroceno (Sigma Aldrich) em 20,0 mL (25,5 mol) de diclorometano sob o sistema com água gelada (~ 3 ºC). O esfriamento do sistema foi feito com ajuda de uma mistura de água com nitrogênio líquido. Deixou-se a mistura de reação sob aquecimento (~22,5 ºC) por 24 horas. Finalmente, adicionou-se sobre a mistura 50 g de gelo de água Milli-Q. Separou-se a fase orgânica e esta foi concentrada por evaporação a pressão reduzida. Dissolveu-se o resíduo oleoso em 10 mL de tolueno e separou-se em uma coluna de gel sílica 60 (20 cm x 1 cm) (Merck). A coluna foi eluída com tolueno sem tratar (Synth) e o eluato foi analisado através da cromatografia em camada delgada (TLC, thin layer chromatograhy) com a fase estacionaria de sílica gel (Merck). As frações que contêm $(TMH)_2$-ferroceno (Rf=0,26) foram recolhidas e o tolueno eliminado por evaporação a pressão reduzida. Dissolveu-se o resíduo oleoso em etanol. Filtrou-se e eliminou-se o solvente a pressão reduzida, resultando um líquido oleoso vermelho-amarronzado.

Figura 3.2. Montagem para a reação de dissubstituição do ferroceno (o dosador é um funil de decantação de 60mL).

O mecanismo de reação de dissubstituição do ferroceno é similar ao mecanismo de monossubstituição. A di-acilação ocorre na mesma posição, no anel ciclopentadienilo oposto ao mono-substituído.

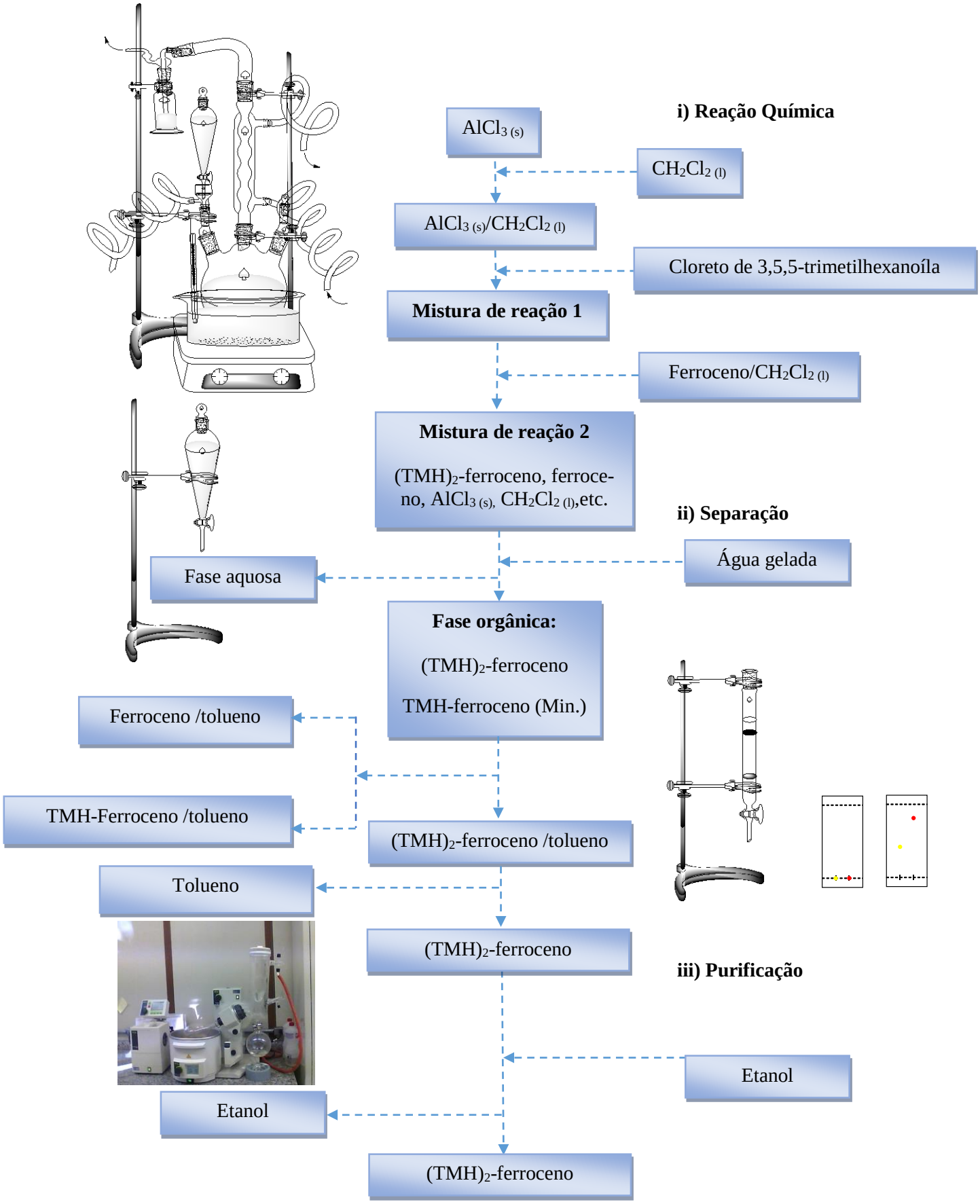


Ferroceno 3,5,5 - cloreto de trimetilhexanoíla **(TMH)$_2$-Ferroceno**

Esquema 3.3: Reação da síntese do derivado de ferroceno (TMH)$_2$-Ferroceno[202].

As disposições espaciais dos dois anéis pentadienilo estão substancialmente a livre rotação, que pode ter das conformações sugeridas, eclipsado (D5h) e/ou alternado (D5d)[206]. Estudos cristalográficos indicaram que, a temperatura ambiente, o ferroceno cristaliza em sistemas monoclínicos adotando uma conformação alternada e com uma simetria molecular D5h [207,208]. Mas estudos posteriores demostraram que esta estrutura não é correta e que o ferroceno apresenta polimorfismo. A uma temperatura inferior a 164 K o ferroceno cristaliza no sistema triclínico com uma conformação pseudo-eclipsada, ou seja, com um desvio $\delta = 9^0$, o que mostra que o ferroceno nunca está completamente eclipsado. Somente abaixo de 110 K a cristalização do ferroceno é ortorrômbica com uma conformação totalmente eclipsada e simetria molecular D5h[209]. Porém é provável que as estruturas mono e dissubstituídas possam ter estruturas com conformação alternada a temperatura ambiente.

Um fluxograma ilustrativo do procedimento sintético encontra-se abaixo (**Esquema 3.4**)



Esquema 3.4: Fluxograma para a síntese do $(TMH)_2$-Ferroceno.

3.2.2 Análise elementar

Análise composicional dos derivados de ferroceno no que se refere a carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi feita pela técnica de análise elementar (CHN) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), utilizando um analisador elementar da marca *Perkin-Elmer*, modelo 2400 CHN. Esta técnica é usada para determinar a fórmula química de esses compostos. Geralmente, se faz a combustão de uma quantidade conhecida de amostra a 925°C na presença de oxigênio puro, no caso dos compostos orgânicos e organometálicos.

3.2.3 Rendimento

O cálculo de rendimento de reação das sínteses dos derivados de ferroceno, foram calculados através da massa teórica obtida da reação (**Esquema 3.1 e 3.3**) e as massas experimentais (**Equação 3.1**) depois da purificação dos metalocenos obtidos.

$$\%\ \text{Rendimento} = \frac{\text{Massa experimental}}{\text{Massa teorica}} \text{x}100$$

Equação 3.1

3.2.4 Ensaio qualitativo de solubilidade

Realizaram-se testes qualitativos para a determinação da solubilidade dos compostos organometálicos, nos solventes: água, metanol, acetona, clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono e tolueno. Se teve como referência a solubilização dos derivados de ferroceno para uma concentração de 10mM.

3.2.5 Espectroscopia vibracional

A região do infravermelho do espectro eletromagnético é a região onde está localizada maior parte da energia das vibrações moleculares. As vibrações de átomos ou de grupos funcionais de um dado composto têm frequência característica, permitindo

assim, atribuir à substância, mediante espectroscopia de infravermelho combinado com outras técnicas, a classe correspondente dos compostos.

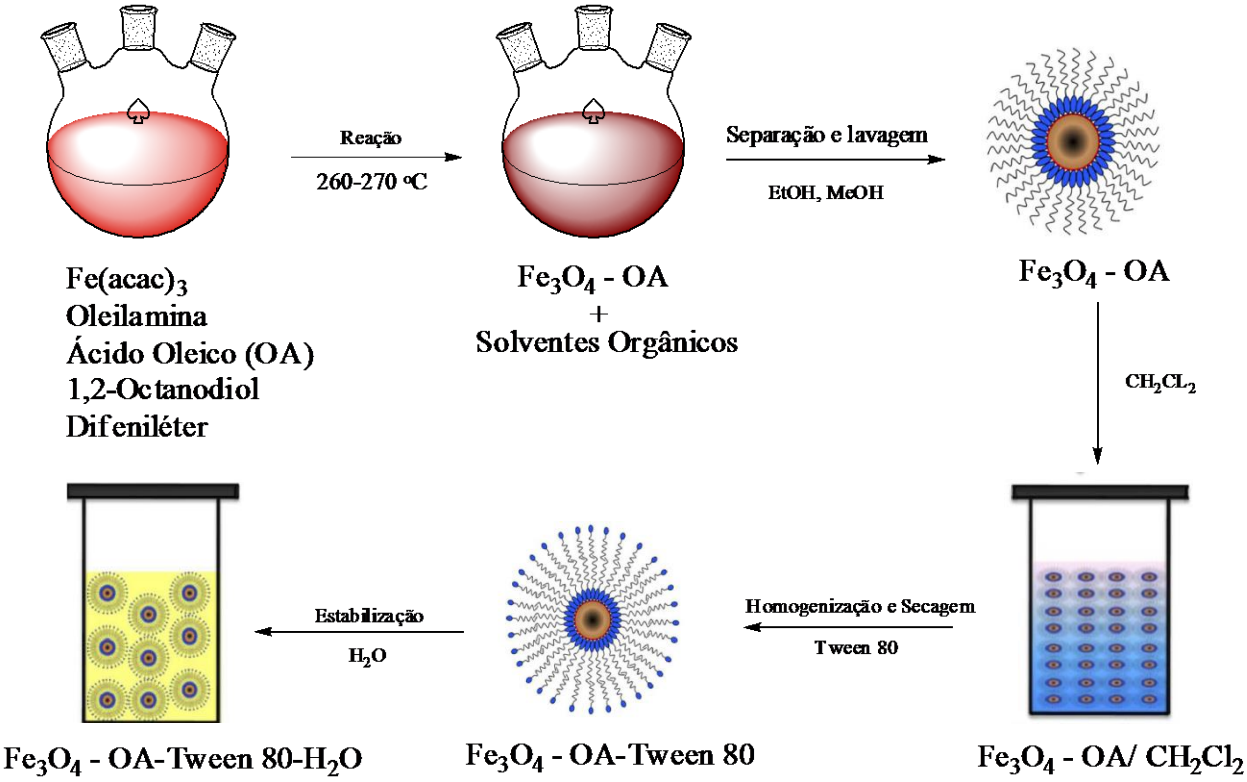
Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos na Central Analítica do IQUSP, em equipamento FTIR, modelo Bomem MB100 com faixa de operação entre 350-4000 cm^{-1}. As amostras líquidas foram misturadas com pastilhas de KBr.

3.2.6 Análise por RMN ^1H

Os espectros de RMN de próton foram obtidos em equipamento Bruker DPX300 operado a 300 MHz, na Central Analítica do IQUSP, em clorofórmio deuterado (Aldrich®) a 298K.

3.3 Síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

As nanopartículas foram sintetizadas por modificação do método da decomposição térmica[204,210,211] e reproduzidas no mínimo três vezes, sempre resultando partículas semelhantes às sintetizadas anteriormente para cada tamanho de nanopartícula (5,8 e 12 nm). Uma vez sintetizados os nanomateriais foram suspendidos em meio aquoso com Tween 80 (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5: Síntese de nanopartículas e estabilização em meio aquoso.

3.3.1 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (5 nm)

Num balão de três bocas o $Fe(acac)_3$ (Sigma Aldrich) (3 mmol, 1,059 g) foi dissolvido em 30 mL de difeniléter (Sigma Aldrich) previamente tratado com nitrogênio (Air Products) e misturado a temperatura ambiente com oleilamina (Sigma Aldrich) (6 mmol, 1,6049 g), ácido oleico (Sigma Aldrich) (6 mmol, 1,2019 g) e 1,2-octanodiol (Sigma Aldrich) (15 mmol, 2,190 g). A atmosfera era de nitrogênio, e a mistura foi feita sob agitação vigorosa, com ajuda de um ímã de 3 cm. Então, com um banho de silicone (Synth), aqueceu-se gradualmente em intervalos de 2°C/min até 200°C e levou-se à ebulição (260-270°C) em intervalos de 5°C/min, como foi mantido por duas horas (**Esquema 3.6**). Depois do esfriamento até temperatura ambiente, o sólido preto-amarronzado foi colocado num tubo plástico de 50 mL e separado com um imã por 30 min. O sólido foi redissolvido em 10 mL de CH_2Cl_2 (Sigma Aldrich) e foi precipitado com 25 mL de etanol (Synth) e 10mL de metanol (Synth), ambos solventes não tratados. Seguidamente foi separado em dois tubos de 50 mL e separado novamente com o

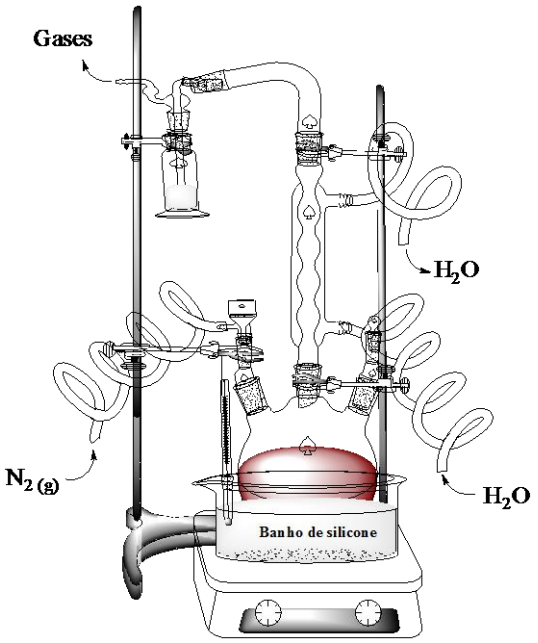
imã. O processo foi repetido por mais duas vezes até que a solução sobrenadante se mostrou incolor. Finalmente as NP foram secadas por vácuo e preparadas para a análise microscópica.

3.3.2 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (8 nm)

Num balão de três bocas o $Fe(acac)_3$ (Sigma Aldrich) (3 mmol, 1,059 g) foram dissolvidos em 30 mL de difeniléter (Sigma Aldrich) previamente tratado com nitrogênio (Air Products) e misturado a temperatura do ambiente com oleilamina (Sigma Aldrich) (15 mmol, 4,0123 g), ácido oleico (Sigma Aldrich) (15 mmol, 3,0048 g) e 1,2-octanodiol (Sigma Aldrich) (15 mmol, 2,190 g). A atmosfera era de nitrogênio, e a mistura foi feita sob agitação vigorosa, com ajuda de um ímã de 3 cm. Então, com um banho de silicone (Synth), aqueceu-se gradualmente em intervalos de 2°C/min até 200°C e levou-se à ebulição (260-270°C) em intervalos de 5°C/min, como foi mantido por duas horas (**Esquema 3.6**).

3.3.3 Síntese de nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 (12 nm)

Num balão de três bocas o $Fe(acac)_3$ (Sigma Aldrich) (3 mmol, 1,059 g) foi dissolvido em 30 mL de difeniléter (Sigma Aldrich) previamente tratado com nitrogênio (Air Products) e misturado a temperatura do ambiente com oleilamina (Sigma Aldrich) (24 mmol, 6,4197 g), ácido oleico (24 mmol, 4,8076 g) e 1,2-octanodiol (Sigma Aldrich) (15 mmol, 2,190 g. A atmosfera era de nitrogênio, e a mistura foi feita sob agitação vigorosa, com ajuda de um ímã de 3 cm. Então, com um banho de silicone (Synth), aqueceu-se gradualmente em intervalos de 2°C/min até 200°C e levou-se à ebulição (260-270°C) em intervalos de 5°C/min, como foi mantido por duas horas (**Esquema 3.6**).



Esquema 3.6: Sistema de síntese de reação das nanopartículas de magnetita.

3.3.4 Análise elementar

A análise composicional dos nanomateriais revestidos com ácido oleico no que se refere a carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi feita pela técnica de análise elementar (CHN) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), utilizando um analisador elementar da marca *Perkin-Elmer*, modelo 2400 CHN.

3.3.5 Espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS)

O conteúdo de ferro total nos nanomateriais foi determinado por absorção atômica de chama (FAAS) usando um espectrofotômetro Shimadzu AA-6300, com padrões de ferro a partir de um estoque de 1000 ppm (Sigma Aldrich), no comprimento de onda 248,3 nm. Realizado no laboratório da professora Dra. Liane Marcia Rossi do instituto de Química da USP.

3.3.6 Difração de raios X

Realizou-se a caracterização pelo método de difração em pó (DRX), para a determinação da estrutura cristalina do composto sintetizado (magnetita). Os difratogra-

mas de raios X foram obtidos por um difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex (do professor Dr. Flavio Maron Vichi do instituto de Química da USP), usando o método do pó nas seguintes condições experimentais: radiação Kα do cobre, λ = 1,5418 Å, operando em 30 kV, 15 mA de corrente e empregando um filtro de níquel. A amplitude de varredura foi de 2θ entre 5 e 40˚, a velocidade de varredura foi de 2˚ min^{-1} e o passo de leitura foi de 0,05˚.

3.3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CX II com filamento de tungstênio e tensão de aceleração de 200 kV, com o qual foram obtidas imagens com 120000 × de magnificação para todas as amostras produzidas. Na preparação das amostras para as análises TEM, dispersamos as nanopartículas, que estavam inicialmente em pó, em álcool isopropílico e apenas uma gota desta solução foi depositada em uma grade feita de cobre e recoberta com um fino filme de carbono. O tratamento da imagem e o histograma de distribuição foram feitos usando os softwares *ImageJ e Origin 8.0* respectivamente.

3.3.8 Suspensão das nanopartículas de magnetita em meio aquoso com Tween 80

Para o revestimento das NP com Tween 80 (Sigma Aldrich), num tubo de 15 mL, ~5,0 mg de sólido foi dissolvido em 0,5 mL de CH_2Cl_2 e homogeneizado com 1mL de Tween 80. O solvente\orgânico foi evaporado com ajuda de gás de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de HBS /Chelex (Hepes Buffered Saline; hepes 20 mM, NaCl 150 mM, Chelex 1 g/100 mL; pH 7,4) e agitou-se vigorosamente até formar uma solução.

3.3.9 Potencial Zeta

As medidas de potencial Zeta (ζ) das nanopartículas foram realizadas a 25°C empregando-se um equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 na Central Analítica do

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). As medições se fizeram para concentrações de 1 mM de magnetita em 0,2% de Tween 80. As medidas de potencial Zeta refletem o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão.

3.3.10 Raio hidrodinâmico

O raio hidrodinâmico (Rh) foi medido por dispersão de luz em um aparelho Malvern Zetasizer Nano ZS90, para dispersões de partículas em solução aquosa com Tween 80 com concentração de 1 mM e 0,2% de Tween 80. Cada amostra foi medida 10 vezes.

3.4 Síntese de transferrina fluorescente (Fl-Tf)

3.4.1 Preparação de membrana de diálise para purificação

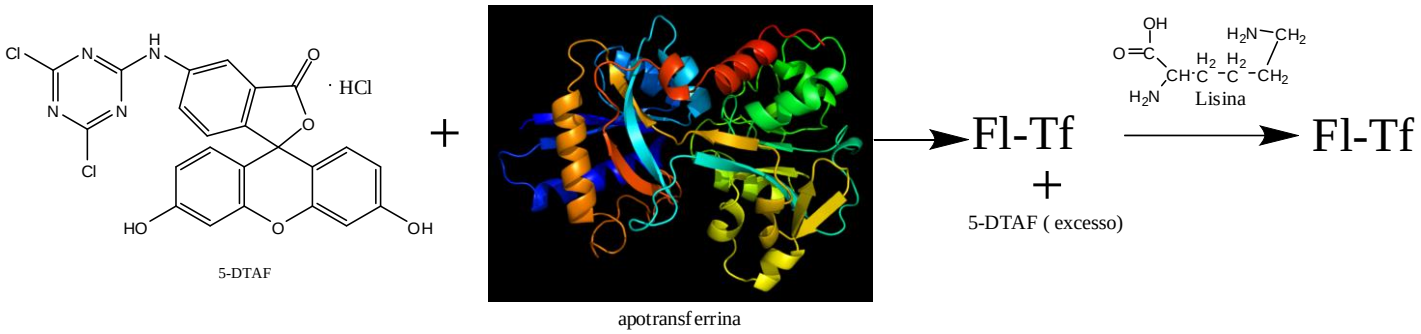
Se cortaram tubos de diálise (Fisherbrand), de tamanho de poro 6-8 kD, entre 15-20 cm, se transferiram a 1 litro de solução de acetato de sódio (Sigma Aldrich) 1% e se levou a ebulição por uma hora. Em seguida se transferiu a membrana a outro recipiente com 1 litro de EDTA (Sigma Aldrich) 10 mM basificado com 1% de carbonato de sódio (Cromoline) (2,92 g de EDTA, 10 g de carbonato de sódio), com agitação até ebulição por mais uma hora. Finalmente se transferiu a membrana a outro recipiente contendo 1 litro de água destilada. A membrana teve uma utilidade de até três meses depois de ser armazenada em água destilada com 0,5 mL de clorofórmio (Sigma Aldrich) e a 4°C[85].

3.4.2 Preparação da transferrina fluorescente a partir da apotransferrina

16,0 mg de apotransferrina (Sigma Aldrich) foram dissolvidos em 2 mL de tampão $NaHCO_3$ (Sigma Aldrich) 100 mM a pH 8,4 (0,084 g de NaHCO3 em 10 mL de água Milli-Q) e se adicionou 20 µL de 5-DTAF (5-(4,6-

diclorotriazinil)aminofluoresceína) (Sigma Aldrich) 10 mM (0,005g, de 5-DTAF em 1 mL de DMSO,Sigma Aldrich).

A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C com agitação suave e ausência de luz (**Esquema 3.7**). Para finalizar a reação adicionaram-se 20 µL de lisina (Sigma Aldrich) 0,5 M (0,047 g de L-lisina em 0,5 mL de tampão bicarbonato 100 mM a pH 8; 0,084 g de $NaHCO_3$ em 10 mL de água) e se transferiu à membrana e se manteve em diálise em tampão HBS a pH 7,4 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl) por 12 horas a 4°C[85].



Esquema 3.7: Reação da apotransferrina com o 5-DTAF para obter Fl-Tf

3.4.3 Preparação da transferrina fluorescente a partir de holotransferrina

A preparação da transferrina fluorescente a partir da holotransferrina seguiu em tudo o procedimento descrito anteriormente mais um tratamento de diálise final com tampão de citrato 37,5 mM a pH 5,0 (19,35 g em 2 L de água Milli-Q)[85].

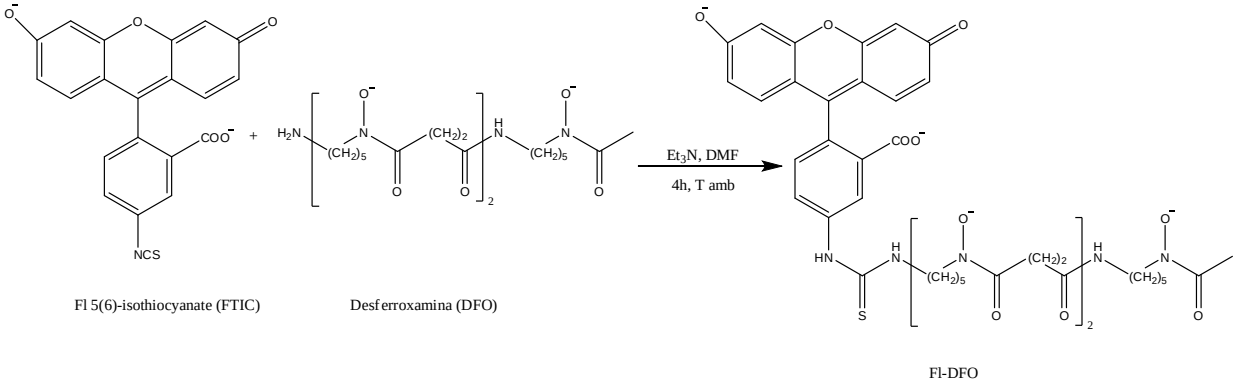
A concentração de transferrina marcada com 5-DTAF foi calculada através de uma curva de calibração com padrões de 5-DTAF e pelo método de fluorescência ($\lambda em/\lambda ex$ = 485 /520 nm), com ajuda do equipamento BMG Fluostar Optima.

3.5 Síntese de desferrioxamina fluorescente (Fl-DFO)

0,228 mmol (0,15 g) de DFO mesilato (Cristália) foi dissolvido em 5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida (DMF) com 0,26 mmol (0,027 g) de trietilamina (TEA) e a mistura foi agitada por 1 h. 0,274 mmol (0,13 g) de fluoresceína-5(6)-isotiocianato (FITC) foi dissolvido em 5 mL de DMF e adicionado gota a gota à mistura de DFO. A mistura

final foi agitada durante 4 horas a temperatura do ambiente em ausência de luz e em atmosfera de nitrogênio (**Esquema 3.8**)[76,93].

Depois de 4 horas de reação, se adicionou 10 mL de acetonitrila (ACN) para conseguir a precipitação do produto. O sólido obtido foi lavado duas vezes com ACN até que a parte líquida ficasse limpa da parte fluorescente. O sólido obtido teve uma aparência amarela fluorescente. O sólido foi decantado e seco por vácuo por 24 horas em ausência de luz.



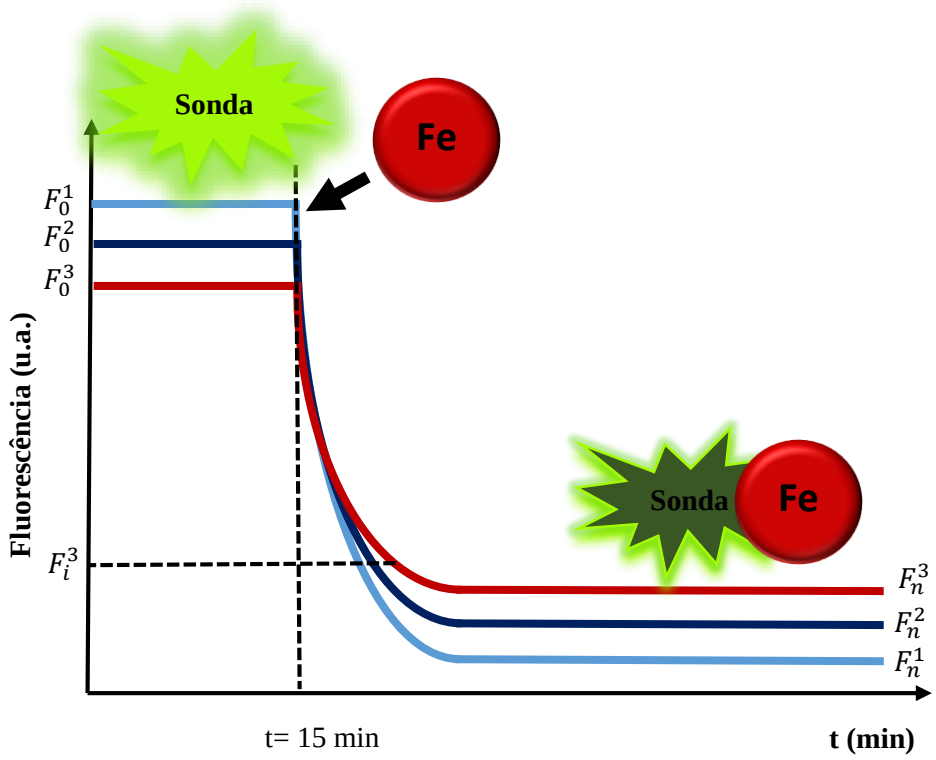
Esquema 3.8: Reação química para a obtenção da Fl-DFO.

3.6 Estudo da estabilidade dos compostos de ferro frente a quelantes fluorescentes

A estabilidade dos compostos de ferro (fármacos comerciais, derivados de ferroceno, nanopartículas de magnetita) foi determinada mediante o método de fluorescência, que consiste na medida de supressão de fluorescência devido à quelação da sonda fluorescente ao ferro liberado pelo composto de ferro (**Esquema 3.9**). Este procedimento foi feito usando o leitor de microplacas (96 poços) BMG Fluostar Optima, operando com incubação a 37ºC por 24 horas e λexc/λemis = 485/520 nm[212].

Os compostos de ferro foram inicialmente preparados em soluções de concentrações iniciais de 0 a 40 µM. O teste de estabilidade dos compostos de ferro foi feito usando 190 µL de solução de sonda fluorescente sobre 10 µL de composto de ferro para

cada uma das soluções. Cada ponto foi feito em oito replicatas, e o experimento foi repetido quatro vezes em dias diferentes Os resultados foram normalizados e são apresentados como pontos finais.



Esquema 3.9: Perfil de supressão de fluorescência da sonda fluorescente frente aos compostos de ferro, sendo: F_0^1, $F_0^{2,}$ F_0^3, fluorescência inicial, F_n^1, $F_n^{2,}$ F_n^3, fluorescência final e F_i^3, fluorescência num ponto arbitrário da curva 3.

Os testes de estabilidade pelo método fluorimétrico se fizeram com as sondas CAL, Fl-Tf e Fl-DFO, em diferentes meios fisiologicamente relevantes (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2: Condições de pH e temperatura para os testes de estabilidade dos compostos de ferro.

Sonda	Metalofármacos comerciais e derivados de ferroceno	Nanopartículas de magnetita
CAL	A, B, C *	A, B
Fl-Tf	A, B, C	A, B
Fl-DFO	--	A, B

*A = Tampão de plasma sanguíneo (HBS) (hepes, Sigma Aldrich, 20 mM, NaCl, Cromoline, 150 mM, pH 7,4, 37ºC)[213]

B = Tampão celular de hepatopâncreas (*Ucides*) (hepes 3,75 mM, NaCl 395 mM, KCl, Sigma Aldrich, 10 mM, $NaHCO_3$, Sigma Aldrich, 2,5 mM, NaH_2PO_4, Sigma Aldrich, 2,5 mM, glicose 1 mM, pH 7,8, 25ºC) [214]

C = Água do mar sintética (solução *Red Sea Salt*, NaCl 600 mM, tamponada a pH 8,3, 25ºC) [183]

3.7 Estudo de estabilidade dos fármacos comerciais frente a deferiprona e citrato

Durante um estágio-sanduíche no laboratório do Prof. Robert Hider (King's College, Inglaterra), estudamos a estabilidade dos fármacos comercias de ferro frente ao ligante endógeno citrato, e ao quelante deferiprona (DFP), que tem elevada afinidade por ferro (pK 37)[215], mediante espectrofotometria UV – Vis.

3.7.1 Estabilidade frente a DFP

Os fármacos comercias de administração via intravenosa foram preparados a 1 mM em tampão MOPS 25 mM, pH 7,0. Os fármacos comerciais de administração via oral foram preparados a 1 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 2,2. Em seguida se prepara uma solução estoque de DFP 1 mM em DMSO.

Nas cubetas se adiciona 100 µL de solução estoque de fármaco comercial, 400 µL de solução estoque de DFP e se completa a 2 mL com o tampão desejado, para obter

finalmente concentrações de 50 μM e 200 μM de fármaco e DFP respectivamente. As medidas de absorbância são feitas com ajuda de um equipamento HP 8453 –visible spectrophotometer a 460 nm, temperatura do ambiente (22°C), durante 72 horas. Os resultados são mostrados mediante uma curva ade absorbância/ tempo[216,217].

3.7.2 Estudo de estabilidade competitiva entre DFP e citrato

Nas mesmas condições de experimento mostrados no item anterior, se avalia a estabilidade dos fármacos de ferro frente à DFP em competição com o citrato. Para isso se prepara uma solução estoque de citrato 1mM em água MilliQ.

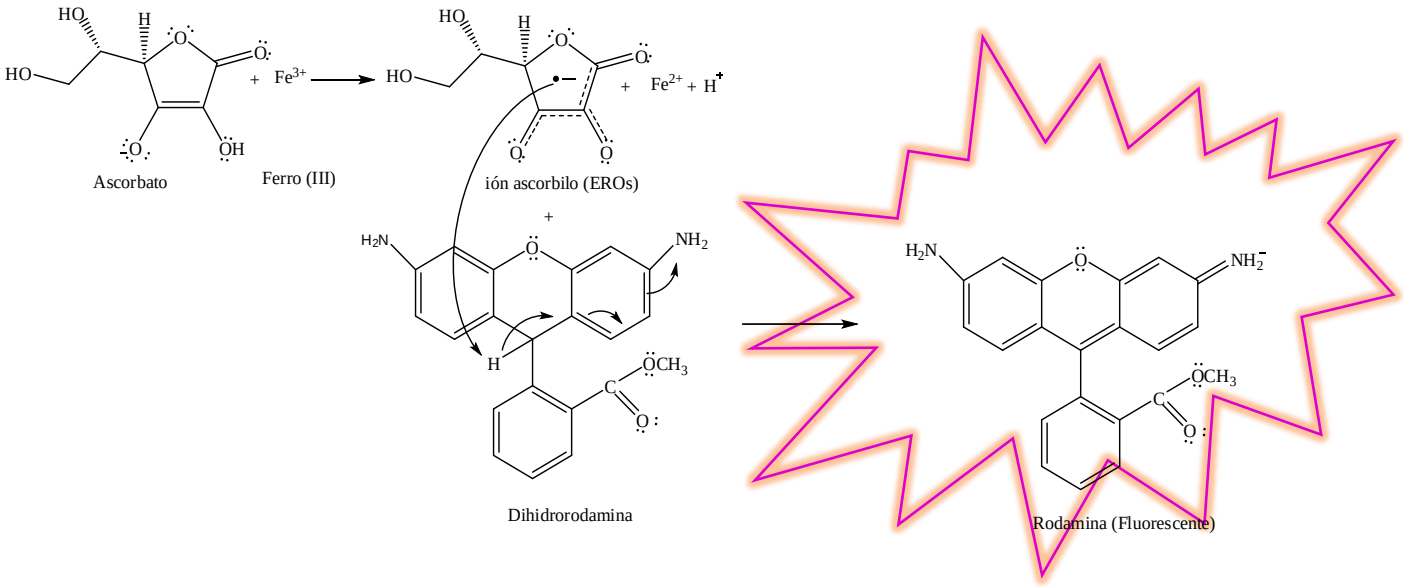
Nas cubetas se adiciona 100 μL de solução estoque de fármaco comercial, 400 μL da solução estoque de DFP, 400 μL de solução estoque de citrato, e se completa a 2 mL com o tampão desejado, para obter finalmente concentrações de 50 μM : 200 μM : 200 μM de fármaco:DFP:citrato respectivamente. As medidas de absorbância são feitas com ajuda de um equipamento HP 8453 –visible spectrophotometer a 460 nm, temperatura do ambiente (22°C), durante 72 horas. Os resultados são mostrados mediante uma curva ade absorbância/ tempo[51,217].

3.8 Determinação da capacidade de geração de ferro lábil redox-ativo dos compostos de ferro

A capacidade de oxidação dos compostos de ferro foi estudada pelo método da oxidação da DHR (dihidrorodamina) a RD (rodamina) em presença de ascorbato (**Esquema 3.10)**, usando o leitor de microplacas (96 poços) BMG Fluostar Optima, operando com incubação a 37ºC por 1 hora e λexc/λemis = 485/520 nm[212].

O caráter redox dos metalofármacos comerciais, compostos de ferroceno e nanopartículas de magnetita foram estudados à concentração de 40 μM (20 μL) frente ao meio fluorogênico (180 μL), que consiste numa solução de DHR (50 μM) e ascorbato (40 μM) em tampão de plasma sintético (HBS), de hepatopâncreas ou água do mar sintética, em microplacas de 96 poços. A intensidade de fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de dois minutos durante uma hora. A origem da atividade redox é confirmada como sendo devida ao ferro pela repetição do mesmo procedimento, mas

com a adição do quelante deferiprona (100 µM) ao meio fluorogênico. Os resultados são apresentados como inclinações (intensidade de fluorescência /tempo) e não como pontos finais, para minimizar erros[212]. As concentrações de ferro redox foram calculados com uma curva com o padrão Fe(NTA) (0→ 10 µM) [218,219].



Esquema 3.10: Reação de ascorbato com ferro para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO's) que oxida a DHR em rodamina fluorescente[213,220]

3.9 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina*

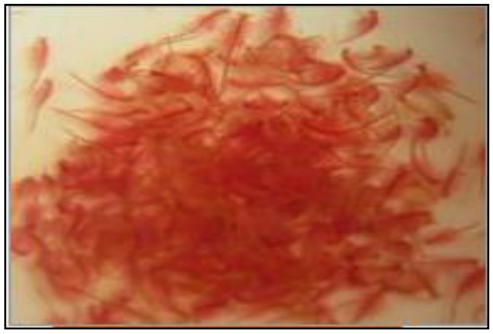
Os testes de toxicidade e determinação da dose letal para 50% da população (LC50) para as artêmias foram feitos com os fármacos comerciais e os derivados de ferroceno. Para este ensaio empregaram-se artêmias adultas com tempo de vida de seis meses aproximadamente, e artêmias no estágio 1 (a partir da eclosão, tempo de vida zero), de acordo com protocolos já descritos[194].

3.9.1 Toxicidade em artêmias adultas

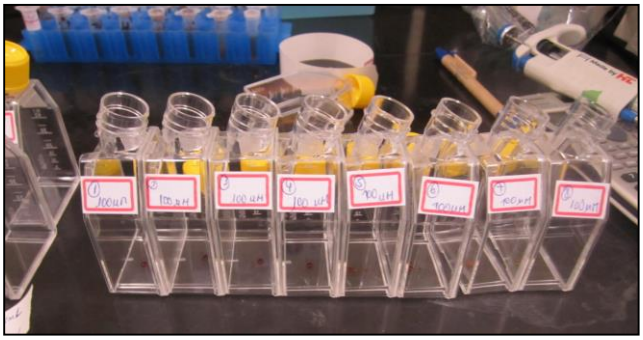
Machos de *Artemia salina* adultos foram obtidos diretamente de produtores comerciais de alimentos para peixes ornamentais. Os animais (400 indivíduos) foram acondicionados em uma placa de Petri para aclimatação no novo ambiente por 1 hora

(**Esquema 3.11**). A água do mar foi preparada com água destilada e sal marinho (Red Sea Salt) com 3,5% de salinidade, pH 8,3 e filtrada a vácuo com membrana de celulose de 0,22 nm (Millipore)[195].

Em frascos de 25 mL foram adicionados 5 mL de água do mar contendo 0, 10, 100 ou 1000 µM de fármaco. Em seguida, 10 artêmias foram transferidas para cada frasco e incubadas a 30°C, com ausência total de luz, por um período de 24h. A contagem de indivíduos vivos e mortos foi feita logo em seguida.



1.Seleção de *Artemias* macho



2. Preparação das soluções em médio salino.

3. Coleta das Artemias

4. Incubação por 24 hora a 30°C

Esquema 3.11: Tratamento de Artemia adulta para determinação de toxicidade frente aos compostos comerciais de ferro e derivados de ferroceno.

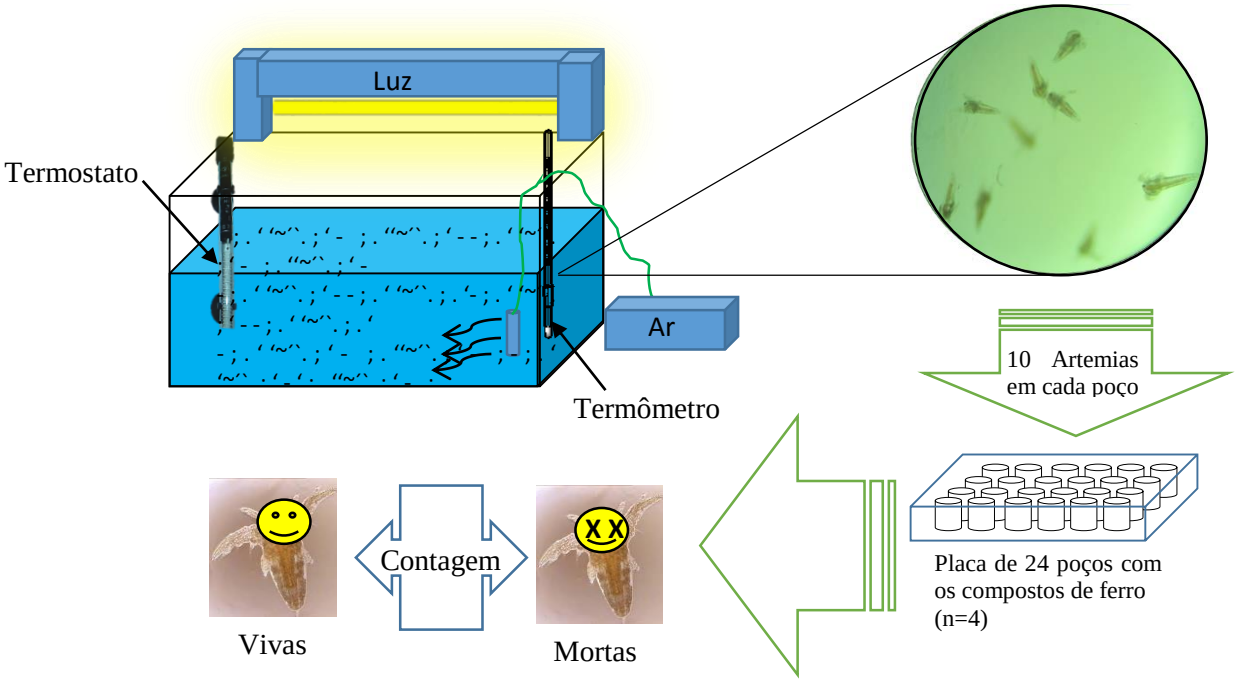
3.9.2 Toxicidade em artêmias de primeiro estágio

Artêmias de primeiro estágio são aquelas que ainda não têm o sistema digestivo formado, só as brânquias e olhos[194]. Inicialmente, foi feita a eclosão das artêmias a partir dos seus cistos. A eclosão das artêmias foi feita a partir de cistos (ovos) obtidos da empresa INVE (ARTEMIA High 5).

O procedimento foi feito segundo a literatura[194] com pequenas modificações, tendo em conta as diferenças em temperatura e tempo de eclosão dos animais (29-30^{0}C, 24h)[193], para obter uma eclosão mais homogênea possível, assim como a estabilidade dos crustáceos em estudo.

Para a eclosão foi montado um aquário (2 L) de vidro com temperatura a 29-30 ^{0}C (aquecedor para aquário, Vigo Ar, 2,5 W), iluminação normal (lâmpada fluorescente de 12 V, 13 W, 673 lumens) e bomba de ar (ACO-551) (**Esquema 3.12)**. A preparação da água foi similar ao descrito acima (salinidade 3,5% e pH 8,3). Finalmente se adicionou aproximadamente 0,2 g de cistos de artêmias ao sistema estabilizado e se deixou por 24 horas até conseguir a total eclosão.

Os fármacos comerciais e os derivados de ferroceno foram testados na faixa de concentração de 0 a 300 µM, em placas de 24 poços contendo 10 animais cada, por 24 horas ao abrigo de luz. Em seguida, foi feita a contagem dos animais vivos e mortos e foi determinada a LC50 com o uso do software Origin 8®. Os testes foram feitos por quadruplicada com quatro reproduções em dias diferentes. Estes testes foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Flávia Zanotto (IB-USP).



Esquema 3.12: Avaliação da toxicidade dos compostos de ferro comercias e derivados de ferroceno frente à *Artemia salina*, com concentrações de 0 → 300µM, salinidade 3,5 %, pH 8,4 por 24 horas.

3.9.3 Lipoperoxidação em *Artemia salina*

A lipoperoxidação induzida pelos compostos de ferroceno (os mais tóxicos) sobre a letalidade dos crustáceos foi estudado através do método colorimétrico de laranja de xilenol ou Fox modificado[221,222]. Utilizaram-se as seguintes soluções:

- $FeSO_4$ 1 mM (0,0278 g/100 mL de água MilliQ)
- H_2SO_4 0,25 M (2,54 g/97,46 mL de água MilliQ)
- Laranja de xilenol 1 mM (0,0761 g/100 mL água MilliQ)
- Solução estoque de hidroperóxido de cumeno (CHP) 5,5 M

Etapa 1:

Inicialmente, as artêmias foram retiradas em tubos eppendorf e congeladas rapidamente com a ajuda de gelo seco, logo foram pesadas e homogeneizadas mediante trituração em metanol (grau HPLC) 100 %, e resfriadas a 5^0C numa relação 1:9 (mas-

sa/volume). Os homogenatos foram centrifugados a 15000 rpm em centrífuga (Eppendorf 5424R) por 5 min, e o sobrenadante foi recuperado. Para a realização do ensaio, foram adicionados sequencialmente os seguintes reagentes em cada um dos poços de uma microplaca de 24 poços:

- 90 µL de $FeSO_4$ 1 mM
- 35 µL de H_2SO_4 0,25 M
- 35 µL de laranja de xilenol 1 mM
- 175 µL de água MilliQ
- 15 µL de amostra

A solução estoque de Fe^{2+} deve ser preparada imediatamente antes de seu uso. Os brancos de reagente foram preparados substituindo-se os extratos de artêmia por metanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h, sendo cobertas para evitar evaporação. As leituras das amostras e do branco de reagentes foram realizadas em leitora de microplacas a 580 nm. O valor do branco de reagentes foi subtraído do valor da amostra.

Etapa 2:

Para esta etapa, foi preparada uma solução de CHP através da pipetação de 45,3 µL da solução estoque de CHP a 1 mL de metanol 100%, obtendo-se assim uma solução de 250 mM. Alíquotas dessa solução foram diluídas com água MilliQ para se obter uma concentração final de 0,175 mM.

Alíquotas de 10 µL da solução de CHP 0,175 mM foram adicionadas aos poços da microplaca preparada na ETAPA 1, obtendo-se assim uma concentração final de 5 µM de CHP no ensaio. Aguardaram-se 15 min até a reação atingir equilíbrio e a absorbância a 580 nm foi registrada novamente. Os lipoperóxidos foram quantificados em equivalentes de CHP por grama de massa úmida da amostra, usando-se a **Equação 3.2**:

$$\frac{Equivalentes\ de\ CHP}{g\ peso\ úmido} = \left(\frac{A_{amostra}}{A_{amostra+CHP}}\right) \times \frac{5\ \mu molCHP\ \times\ 350}{10\ V}$$

(Equação 3.2)

Onde: V= volume de amostra usado e o fator 10 corrige a diluição feita durante a preparação do extrato metanólico (1:9 peso/volume).

Estes testes foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Flávia Zanotto (IBUSP).

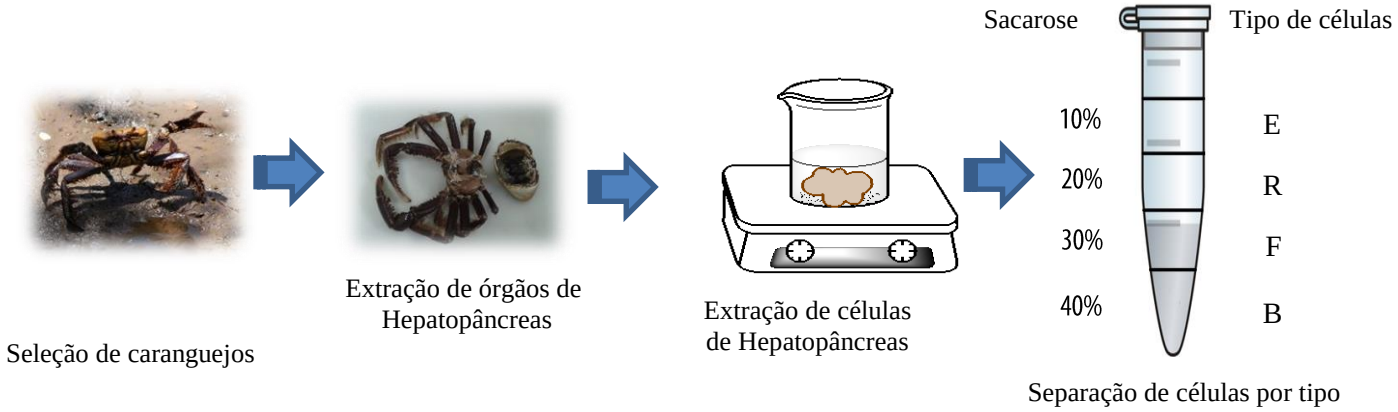
3.10 Transporte de ferro em células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus*

Os caranguejos *Ucides cordatus* (Ordem: Decapoda Família: Ocypodidae) foram coletados em Itanhaém, litoral de São Paulo, especificamente na Praia dos Pescadores, e trazidos para a USP onde foram aclimatados no viveiro do Instituto de Biociências (IB). Os animais foram acondicionados em tanques contendo água do mar, com cascalho, filtro de água, canos e tijolos para o esconderijo e a emersão dos animais, respectivamente. A água do mar utilizada para acondicionar os caranguejos foi preparada utilizando-se o sal "Red Sea Salt" (Red Sea) a uma salinidade final de 20 ‰ (medido com o refratômetro)[223]. Estes testes foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Flávia Zanotto (IBUSP) com auxílio da doutoranda Priscila Ortega (IBUSP).

3.10.1 Obtenções de células de hepatopâncreas

Depois da seleção de um caranguejo com maior atividade, o animal foi congelado por 20 min no freezer (-20°C) para uma maior facilidade de manipulação e extração do hepatopâncreas (**Esquema 3.13**). O hepatopâncreas é transferido para um béquer de 50 mL que contém 15 mL da solução de extração (NaCl 395 mM; KCl 10 mM; $NaHCO_3$ 2,5 mM; NaH_2PO_4 2,5 mM, Hepes 3,75 mM; glicose 1 mM, EDTA 0,9 mM). Segue-se agitação a 200 rpm usando uma barra magnética por 30 min. Em seguida, a solução foi filtrada num tubo de 15 mL com filtro de 30 µm e levada para centrifugação durante 10 min, a 1000 rpm a temperatura ambiente. O sedimento celular foi ressuspen-

so e armazenado. Os quatro tipos celulares E (*embryonic*: célula embrionária), R (*resorptive*, célula de absorção), F (*fibrillar*, célula fibrilar) e B (*blister*, célula de estocagem) foram separados utilizando-se um grandiente de sacarose descontínuo (2 mL) a 10%, 20%, 30%, e 40%, respectivamente[214,224].



Esquema 3.13: Separação de células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides Cordatus*

O tubo de gradientes de sacarose descontínuo que continha os quatro tipos celulares foi centrifugado durante 5 min, a 1000 rpm e a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram divididas por tipo em alíquotas de 2 mL em tubos de 15 mL e foram tratadas com 1 µL de CAL-AM 5 mM em dmso e 28 µL de probenecid 0,1 mM sendo depois centrifugadas por 1 hora a 200 rpm, e por 5 min a 1500 rpm, a temperatura ambiente. A parte sólida viscosa (células) foi decantada e tratada com 2 mL de solução de extração sem EDTA e 28 µL de probenecid 0,1 mM[214,223,224].

3.10.2 Transporte de ferro

Para a quantificação do transporte de ferro, 180 µL de suspensão das células (E, R, F e B) marcadas com CAL-AM foram transferidas para microplacas de 96 poços. Com ajuda do injetor automático do equipamento FLx800 Fluorescence Microplate Reader (BioTek), em t = 30 s foram adicionados 36 µL dos diferentes compostos de ferro com concentração inicial de 5 mM. O tempo total do teste foi de 90 s. O acompanhamento da supressão de fluorescência foi feito a λexc/λemis = 485/520 nm e os dados

foram analisados com os softwares GraphPad Prism 5 e Sigma stat 3.0. A quantificação do ferro intracelular foi feita com ajuda de uma curva de calibração de padrão de calceína 95,5 µM. O ensaio foi feito em duplicata com três repetições nas mesmas condições[225,226].

3.10.3 Viabilidade celular

Para a contagem das células, estas foram separadas em tipos nas mesmas condições de experimento descrito em **3.11.1**, em ausência de CAL-AM. A viabilidade celular foi testada usando o método de azul de Trypan. Uma alíquota de 200 µL de suspensão de células foi tratada com 5 µL de azul de Trypan, e uma sub-alíquota foi transferida para uma câmara de Neubauer. Depois disso, a viabilidade foi quantificada pela visualização das células marcadas (não viáveis) e as células translúcidas (viáveis) em quatro quadrantes, após 3 horas de experimento, sendo o resultado apresentado como porcentagem de células vivas em relação às células totais[225,226].

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do conteúdo de ferro dos metalofármacos comerciais de uso veterinário e humano

A severa deficiência de ferro em animais e humanos justifica a necessidade de suplementos de ferro que pode ser administrados via intravenosa[227–230] (VI) ou via oral[231–233] (VO), para poder repor a reserva de ferro. Os fármacos VI e VO têm sido usados por décadas para o tratamento de anemia ferropriva. Novos fármacos à base de ferro dextrano, ferro glicinato, ferro polimaltose ou ferro glucoheptonato são vendidos em muitos países e se tem uma frequente discussão sobre a segurança e eficácia desses compostos[234–238]. A indústria farmacêutica, com a demanda de fármacos de ferro para suprir sua deficiência, tem dado maior ênfase à produção em maior proporção desses compostos. Por outro lado, a fabricação de novos compostos carrega equivalentemente a mesma proporção de resíduos farmacêuticos, gerando uma maior preocupação quando estes se encontram livres no meio ambiente.

Primeiramente se realizaram determinações de conteúdo metálico nos metalo-fármacos de ferro, e se determinou a concentração total ferro, mediante o método de absorção atômica com chama (FAAS), usando padrões de ferro a partir de um estoque de ferro de 1000 ppm (Sigma Aldrich). Os valores determinados por FAAS (**Tabela 4.1**) conferem com os valores nominais da ficha técnica (bula) de cada fármaco de ferro.

Os valores de concentração em ferro determinados (**Tabela 4.1)** foram considerados como conteúdo de ferro total para o cálculo na preparação das soluções de trabalho dos metalofármacos.

Tabela 4.1: Determinação das concentrações de ferro dos metalofármacos comerciais de uso veterinário e humano.

Nº Amostra	Concentração Fe nas amostras (ppm, nominal)	Concentração Fe nas amostras (ppm, experimental)
F1: Glucoheptonato	10,00	10,50
F2: Dextrano	10,00	10,72
F3: Dextrano	10,00	10,53
F4: Dextrano	10,00	10,40
F5: Dextrano	10,00	10,26
F6: Dextrano	10,00	10,73
F7: Glicinato	10,00	10,47
F8: Polimaltose	10,00	10,38

Os compostos comerciais de ferro avaliados apresentam similar revestimento orgânico polissacarídeo segundo mostram os perfis de absorbância (**Figura 4.1 - 4.8**). A composição de cada fármaco vai se diferenciar dependendo do fabricante. Assim, para nosso objetivo é importante conhecer a ação do ferro dentro da sua estrutura complexa, quando adotam o papel de contaminante no meio aquático.

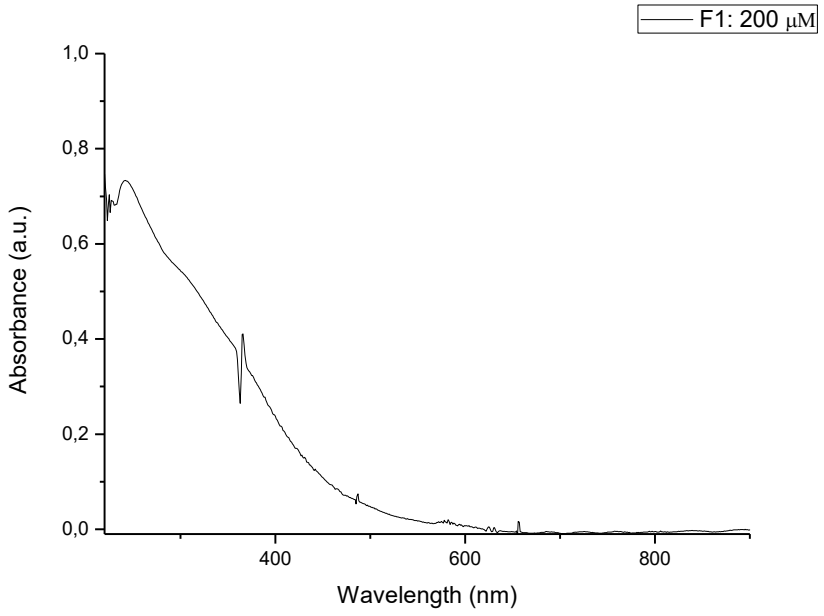


Figura 4.1: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F1), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

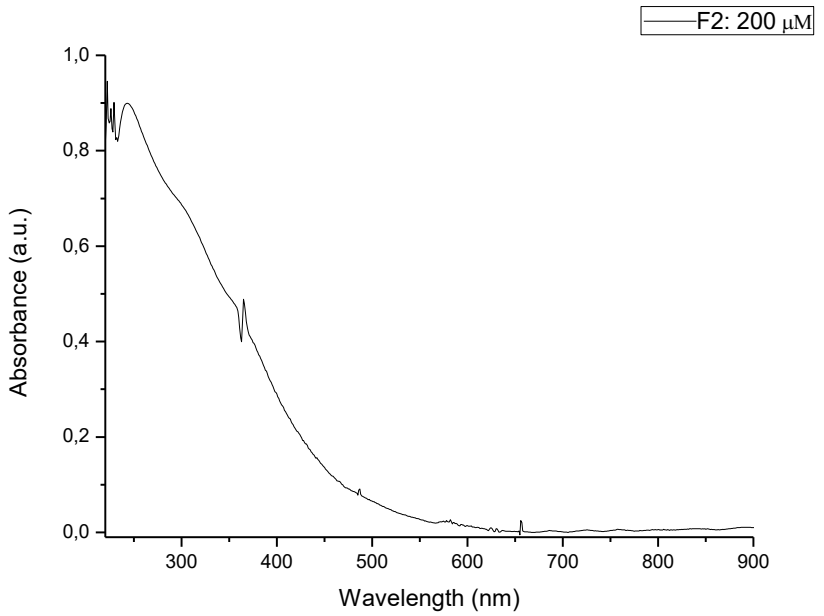


Figura 4.2: Perfil de absorbância (200 – 900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F2), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

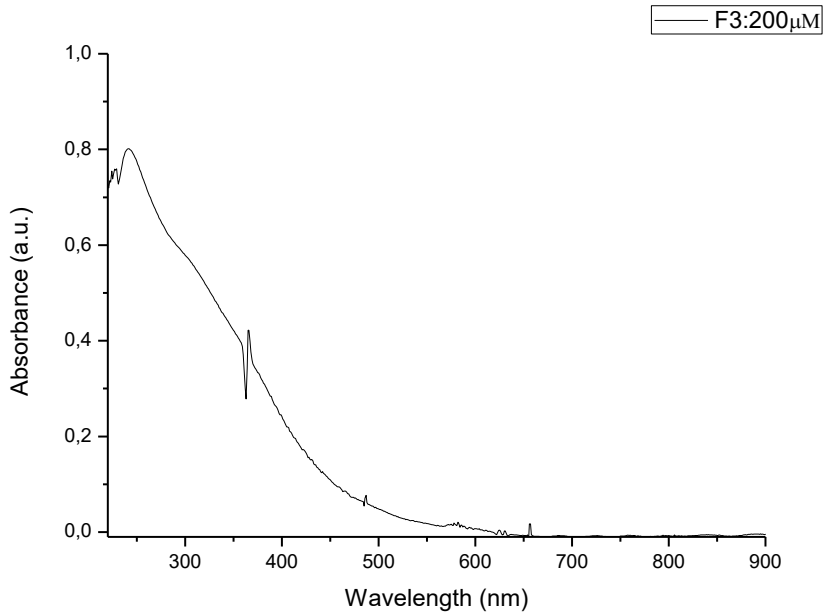


Figura 4.3: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F3), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

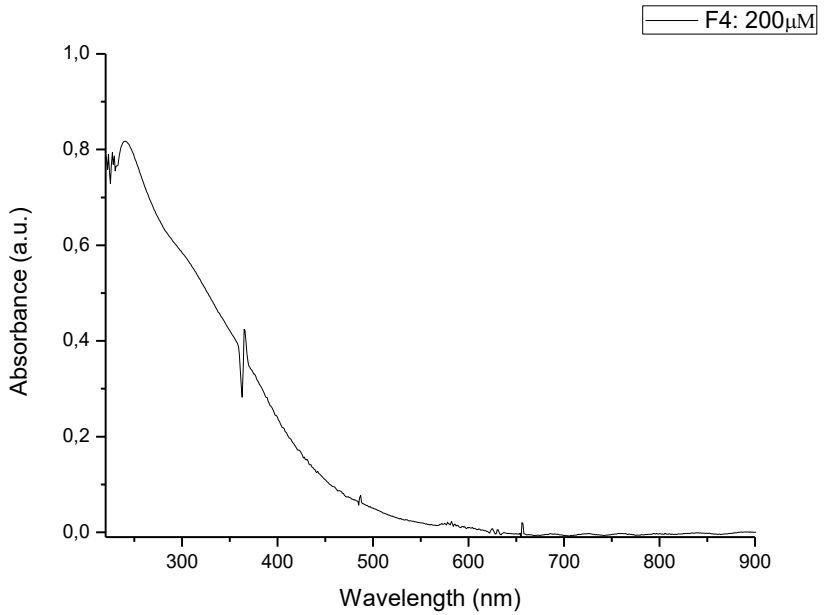


Figura 4.4: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F4), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

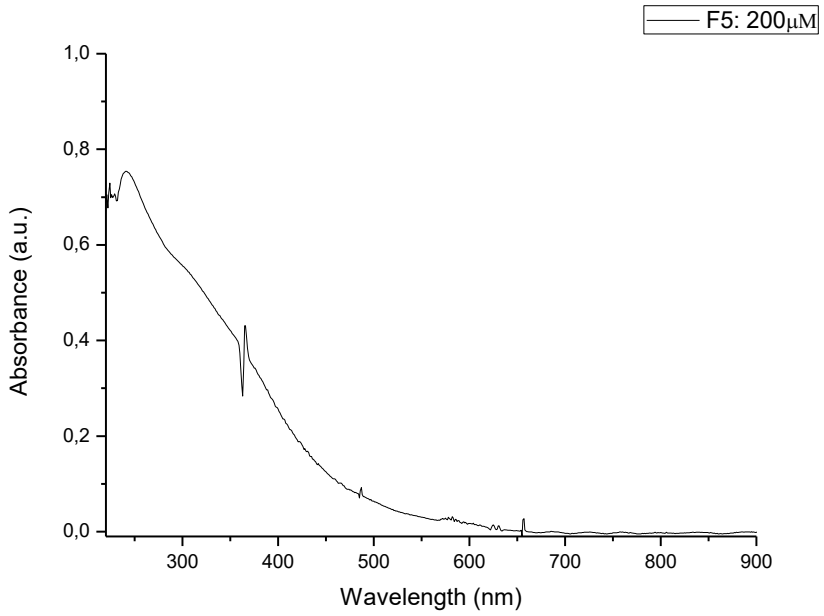


Figura 4.5: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F5), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

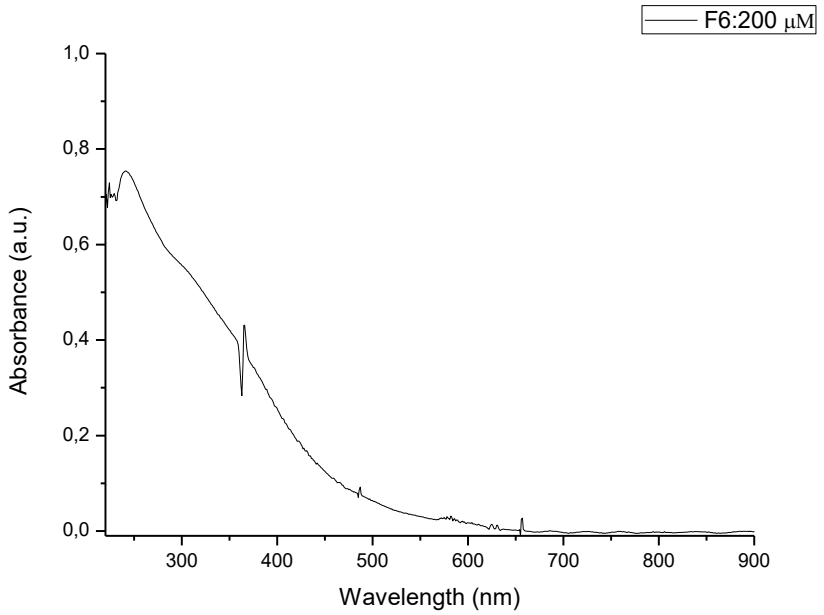


Figura 4.6: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F6), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

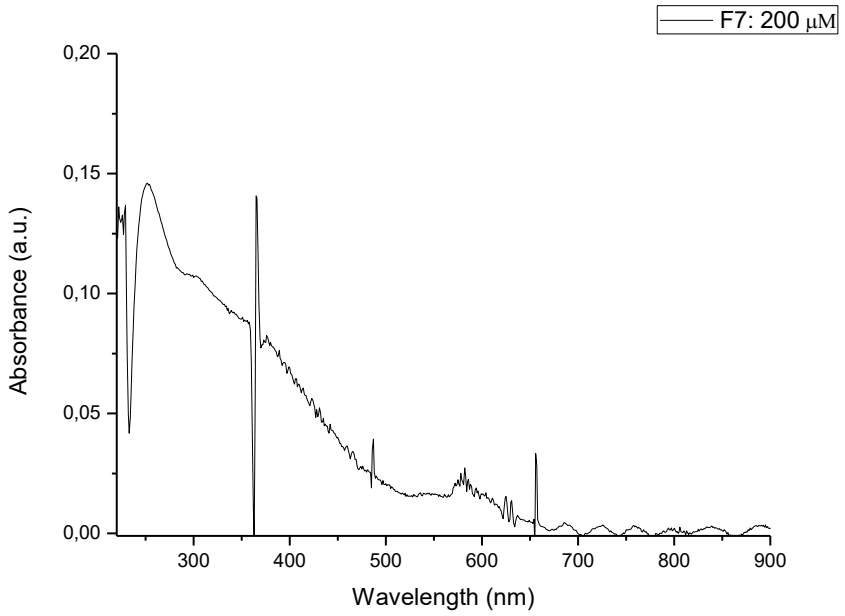


Figura 4.7: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F7), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

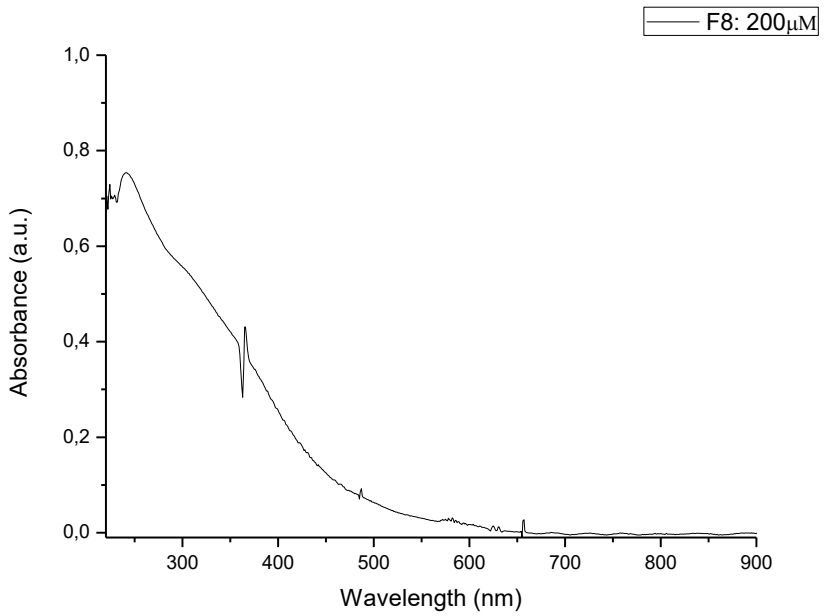


Figura 4.8: Perfil de absorbância (200 -900 nm) do complexo de Fe(III) - glucoheptonato (F8), para uma concetração de 200 µM em MOPS a pH 7,4, medidos a Tamb.

O Fe(III) mostra um estado de alto spin octaedricamente coordenado ao oxigênio e, portanto, mostra bandas de absorção características[239,240]. As **Figuras 4.1-4.8** mostram os espectros de absorção para as amostras após a diluição a concentração nominal equivalente a 200 μM, para facilitar a comparação espectral. As formas dos espectros são essencialmente as mesmas em todas as formulações de sacarídeo e ferro. Os espectros de absorção mostrados são característicos para complexos de Fe(III), d^5 octaédrico de alto spin. Em ~600 nm, se tem uma banda de transição d-d [241]. As bandas observadas na região de 370-390 nm são atribuídas à formação de um complexo de ferro e de polissacarídeo. A 250-370 nm, uma banda de alta intensidade resulta de transferências de carga oxo-metal que foram reportados para Fe(III) –sacarose a 370 nm. Assim a face compartilhada do octaedro de óxido de ferro, hematita, mostra uma banda acima de 500 nm. Os espectros para todas as formulações têm aspectos semelhantes, compatíveis com oxo-hidróxido férrico recoberto por uma camada de polissacarídeo .[242]

4.2 Caracterização de TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno

Derivados de ferroceno são grupos de compostos organometálicos à base de ferro[243]. Devido à absorção intestinal limitada de ferro iônico nos seres humanos, estes compostos de ferro lipofílicos se tornaram de interesse teórico como novos potenciais agentes no tratamento de anemia por ausência de ferro[244–246]. O TMH-Fc possui uma alta capacidade de gerar sobrecarga de ferro em animais e em hepatócitos cultivados, mimetizando sistemas de sobrecarga de ferro observados em pacientes com hemocromatose[244,245,247]. Os derivados de ferroceno tem sido considerados como promissores fármacos [248–250], não obstante o interesse em determinar a estabilidade frente a diferentes quelantes endógenos e exógenos, assim com a sua toxicidade, foram dois de nossos objetivos.

Os resultados de análise elementar (C, H) e absorção atômica são mostrados na **Tabela 4.2**. Esses resultados são coerentes com a mono e disubstituição do ferroceno com o 3,5,5-trimetilhexanoilo, de acordo com o **Esquema 3.1 e 3.3.**

Tabela 4.2. Análise elementar dos compostos TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno

	TMH-Ferroceno (%)		$(TMH)_2$-Ferroceno (%)	
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
%C	69,90	69,40	72,10	69,60
%H	7,97	7,96	9,01	9,41
%Fe	17,20	17,22	12,00	10,88

Apesar da diferença da %C encontrada no $(TMH)_2$-Ferroceno, a análise estrutural por RMN (**Tabela 4.2**) confirma a obtenção da estrutura desejada. Além disso, nossos resultados conferem com o relato inicial da obtenção desse material[205].

Os rendimentos obtidos são apresentados na **Tabela 4.3**, incluindo uma comparação com dados da literatura. Este rendimento foi calculado segundo a **Equação 3.1.**

Tabela 4.3: Rendimento das reações de síntese do TMH-ferroceno e $(TMH)_2$-ferroceno.

Composto	**% R_{ref}** [205]	**% R_{exp} (*m*)**
TMH-Ferroceno	74,70	59,31 *(1,56g)*
$(TMH)_2$-Ferroceno	72,90	53,60 *(1,34g)*

Os resultados obtidos na **Tabela 4.3**, guardam uma diferença em rendimento, pois na referência original (%R_{ref}) a purificação foi feita usando um equipamento de HPLC em fase reversa e em nosso experimento foi através de cromatografia em coluna aberta .

Testes qualitativos foram realizados para a determinação da solubilidade dos compostos organometálicos, nos solventes: água, metanol, acetona, clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono e tolueno. Observa-se que ambos os complexos são solúveis em todos os solventes, exceto a água.

Os espectros na região do infravermelho dos compostos sintetizados são apresentados nas **Figuras 4.9** e **4.10**.

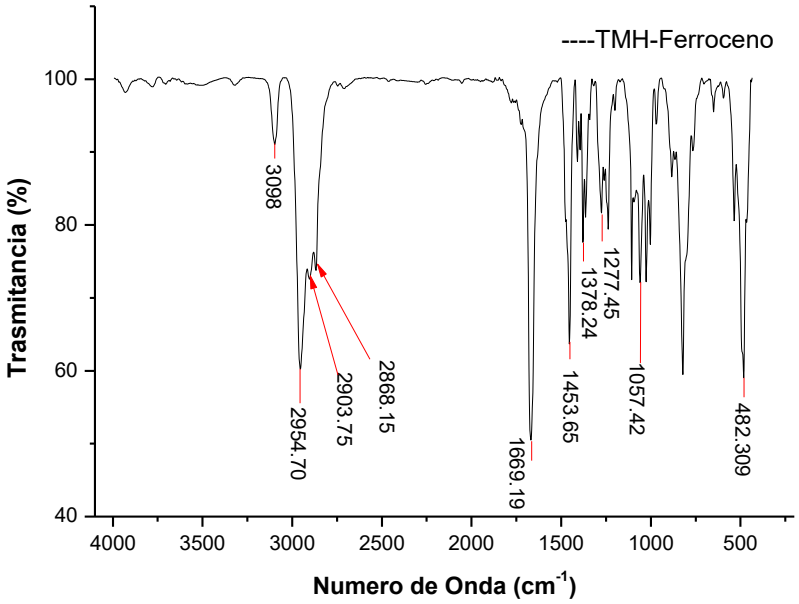


Figura 4.9: Espectro de infravermelho do TMH-ferroceno com os picos característicos.

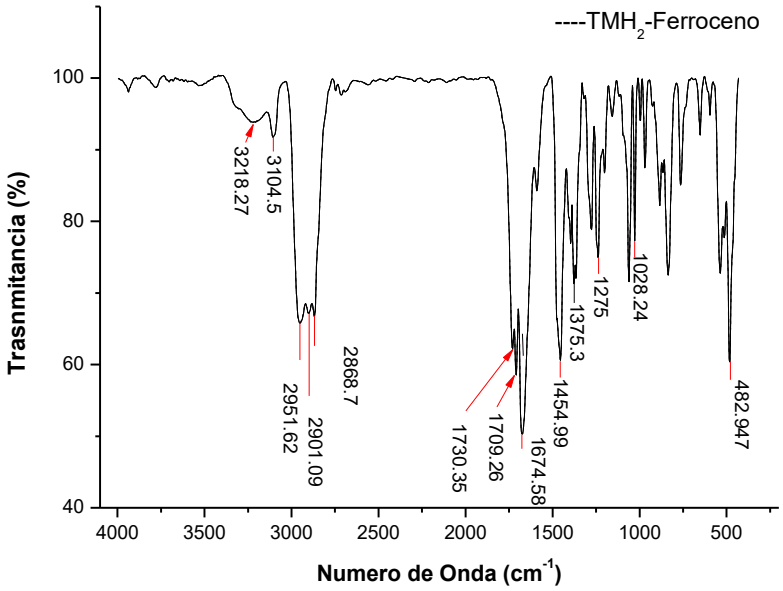


Figura 4.10: Espectro de infravermelho do $(TMH)_2$-ferroceno com os picos característicos.

Tabela 4.4. Bandas na região de infravermelho (cm^{-1}) do TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno.

Modo de vibração	TMH-Ferroceno	$(TMH)_2$-Ferroceno
$\nu(C=O)_{combinação}$	----	3218
$\nu(C-H)_{Fc}$	3098	3104
$\nu_{as}(CH_3)$	2955	2952
$\nu_{as}(CH_2)$	2904	2901
$\nu_s(CH_3)$	2868	2869
$\nu(C=O)$	1669	1730
		1709
		1675
$\delta s(CH_2)$	1454	1455
$\delta s(CH_3)_{butila}$	1378	1375
$\nu(C-C=O)$	1277	1275
$\nu(O-C-C)$	1028	1028
Fc (D5h)	482	482

A **Tabela 4.4** mostra as principais bandas no espectro FTIR dos compostos TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno:

TMH-Ferroceno: a banda estreita em 3098 cm^{-1} corresponde à vibração simétrica dos C-H do anel pentacarbonilo do ferroceno[251]. As bandas em 2954 cm^{-1} e 2868 cm^{-1} correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo CH_3 da cadeia alifática. As bandas em 2904 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico e deformação simétrica, respectivamente, do grupo CH_2 da cadeia alifática. Em 1669 cm^{-1} tem-se a vibração correspondente ao grupo carbonila (C=O), onde se observa um único pico característico. Em 1378 cm^{-1} se observa um pico de deformação simétrica correspondente CH_3 do grupo butila da cadeia final da parte alifática do composto. As bandas em 1277 e 1028 cm^{-1} correspondem às vibrações dos carbonos vizinhos ao grupo carbonila. A banda em 482 cm^{-1} é característica do ferroceno com conformação eclipsada[252].

(TMH)$_2$-Ferroceno: a banda larga em 3228 cm^{-1} corresponde a uma combinação do grupo C=O, correspondente às interações dos grupos C=O na estrutura[253] . A banda estreita em 3105 cm^{-1} corresponde à vibração simétrica dos grupos C-H do anel pentacarbonilo do ferroceno[251]. As bandas em 2952 cm^{-1} e 2869 cm^{-1} correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo CH_3 da cadeia alifática. As bandas em 2901 cm^{-1} e 1455 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico e deformação simétrica, respectivamente, do grupo CH_2 da cadeia alifática. As bandas em 1675, 1709, 1730 cm^{-1} correspondem às vibrações dos grupos carbonila (C=O), onde se observa uma superposição de picos, provavelmente devido a uma desordem da diferente conformação do anel do composto. Em 1375 cm^{-1} se observa um pico de deformação simétrica correspondente ao CH_3 do grupo butila das duas cadeias finais da parte alifática do composto. As bandas em 1275 e 1028 cm^{-1} correspondem às vibrações dos carbonos vizinhos ao grupo carbonila. A banda em 483 cm^{-1} é característica do ferroceno com conformação eclipsada[252].

Os espectros de RMN ^{1}H são apresentados nas **Figuras 4.11** e **4.12**, juntamente com as respectivas interpretações baseadas no *software* MestRe-C (http://mestrelab.com), usado para a interpretação dos espetros RMN^{1}H.

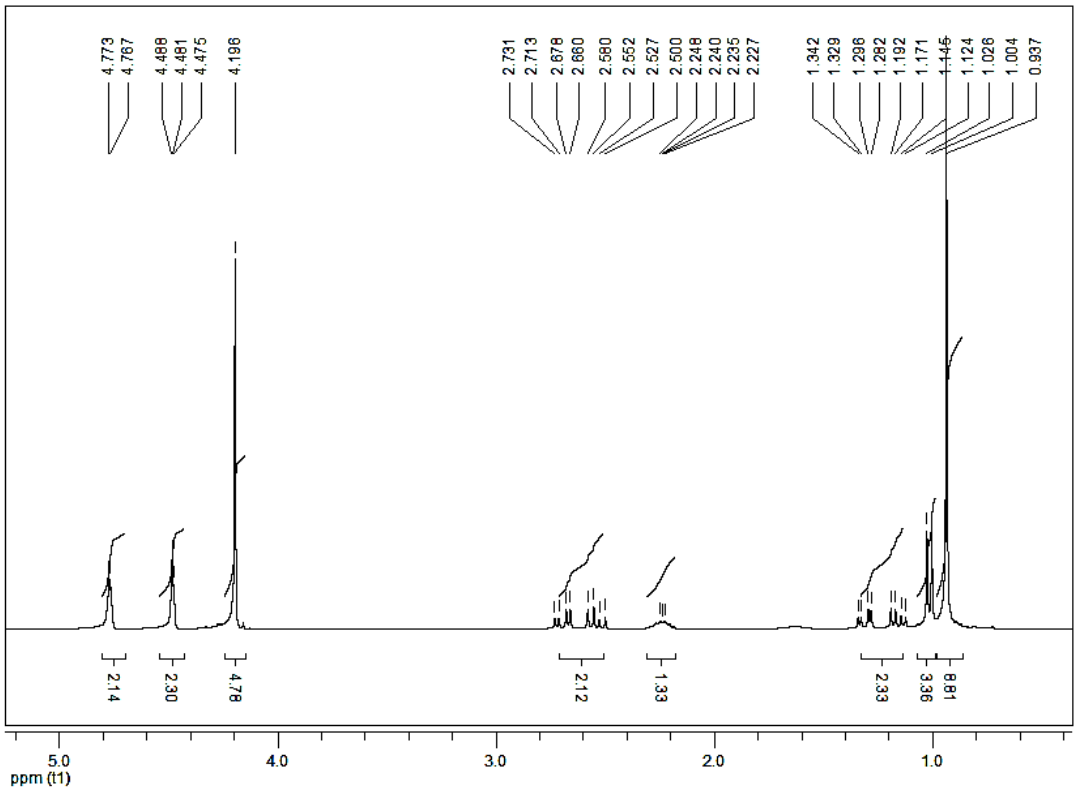


Figura 4.11. Transformada de Fourier para o espectro de RMN ^{1}H do composto TMH-Ferroceno

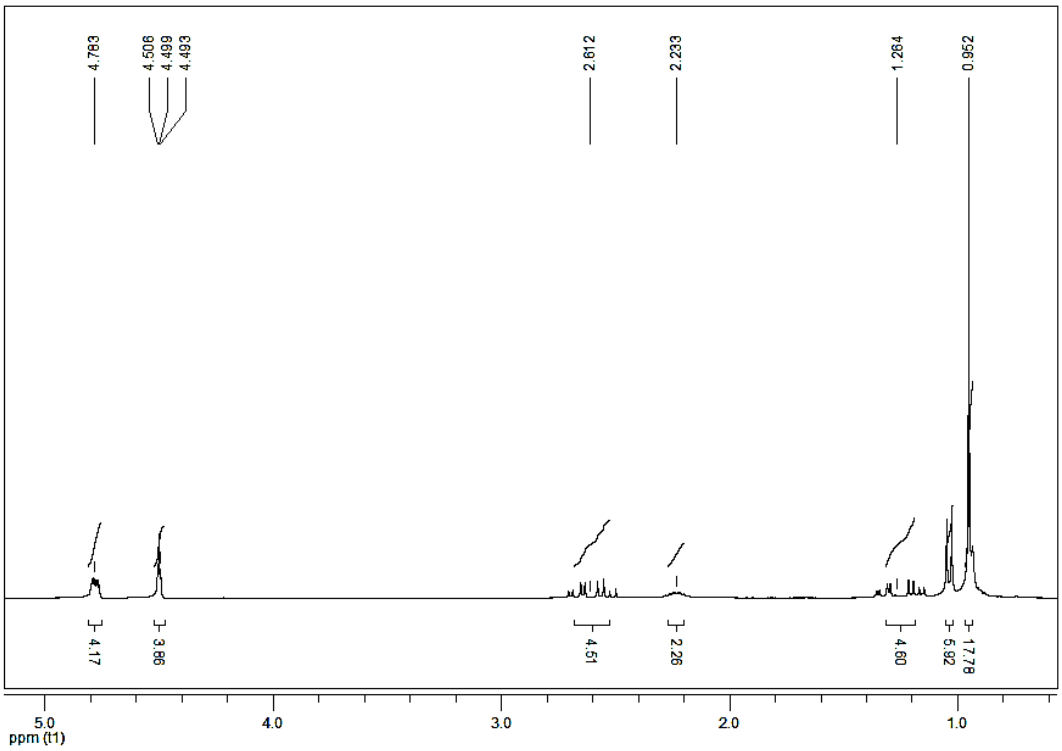


Figura 4.12. Transformada de Fourier para o espectro de RMN ^{1}H da amostra $(TMH)_2$-Ferroceno

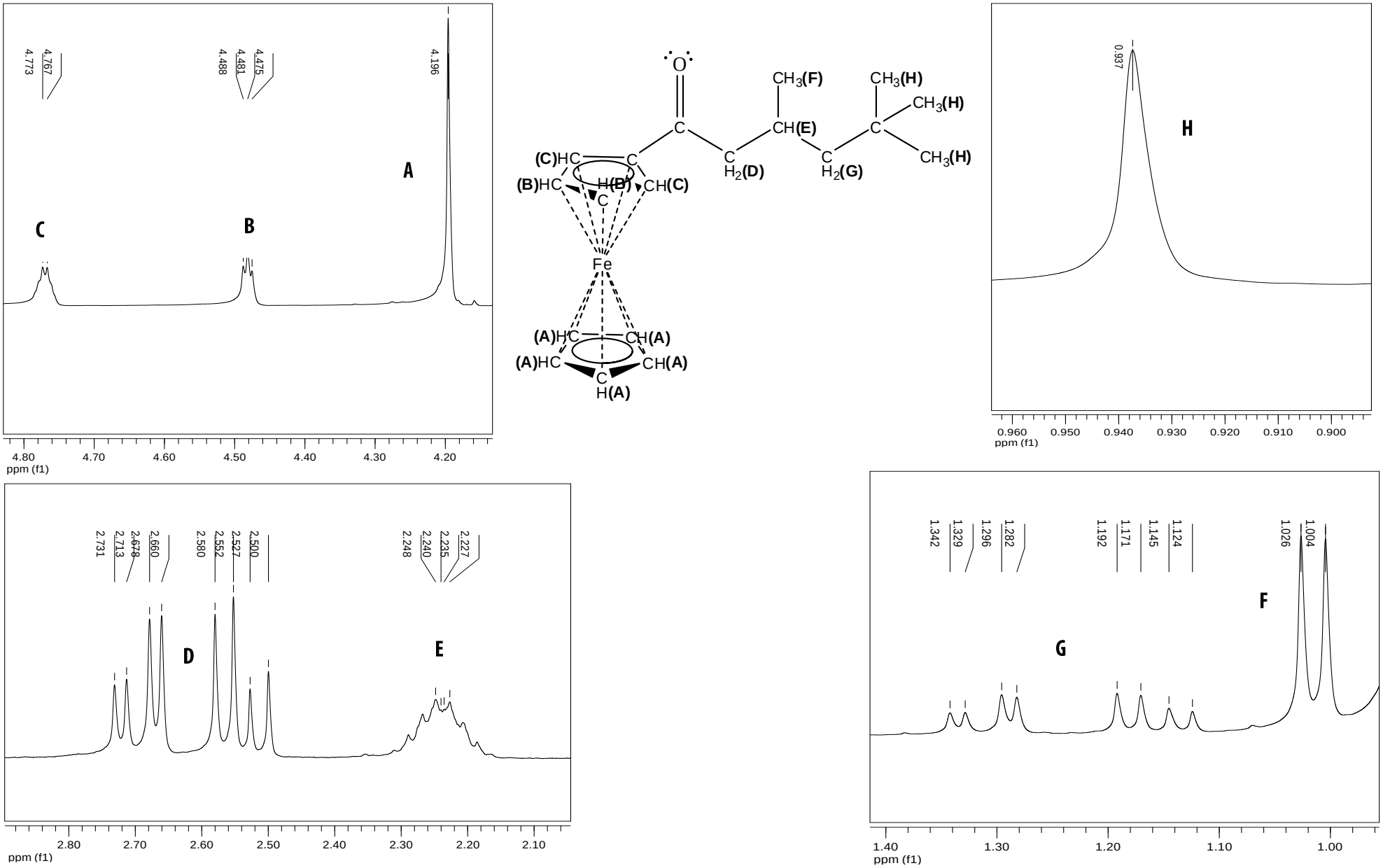


Figura 4.13. Interpretação do espectro de RMN ^{1}H do composto TMH-Ferroceno

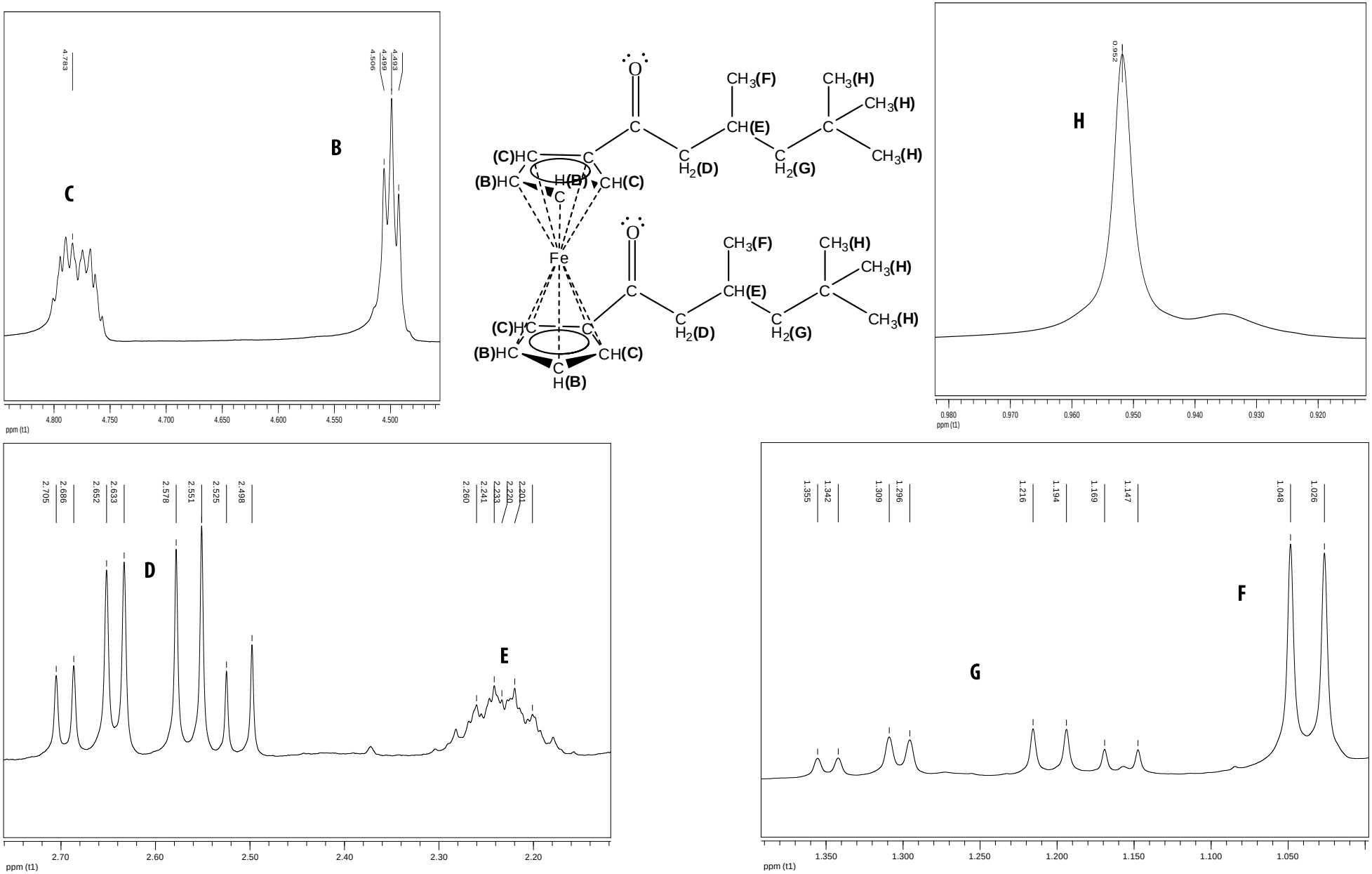


Figura 4.14. Interpretação do espectro de RMN ^{1}H do composto $(TMH)_2$-Ferroceno

Tabela 4.5: Tabela de deslocamento químico de hidrogênio para o TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno.

Tipo de hidrogênio	Deslocamento químico δ (ppm)	
	TMH-Ferroceno	**$(TMH)_2$-Ferroceno**
A	4,20 (s)	---
B	4,50-4,48(t)	4,49-4,51(t)
C	4,77(d)	4,78(m)
D	2,73-2,50(dd)	2,50-2,71(dd)
E	2,25-2,23(m)	2,20-2,26(m)
F	1,03-1,00(d)	1,03-1,05(d)
G	1,34-1,12(m)	1,36-1,15(m)
H	0,94(s)	0,95(s)

Obs**. s**: singleto, **d**: dubleto, **t**: tripleto, **m**: multipleto, **dd:** dubleto duplo

A partir das **Figuras 4.11** e **4.13** e da **Tabela 4.5**, observam-se cinco prótons (A) do anel ciclopentadienilo com deslocamento em 4,20 ppm, dois prótons (B) e dois prótons (C) do anel ciclopentadienilo com deslocamento entre 4,48-4,50 ppm e 4,77 ppm, respectivamente, dois prótons (D) com 2,50-2,73 ppm do grupo metileno o lado do grupo carbonila, três prótons (F) com 1,00-1,03 ppm do grupo metileno, um próton (E) com 2,23-2,25 ppm, dois prótons (G) em 1,12-1,34 ppm e nove prótons (H) em 0,94 ppm do grupo butilo do final da cadeia alifática do composto[253,254].

A partir das **Figuras 4.12** e **4.14** e da **Tabela 4.5**, observam-se quatro prótons (B) e quatro prótons (C) dos anéis ciclopentadienilo com deslocamento entre 4,49-4,51 ppm e 4,78 ppm, respectivamente, quatro prótons (D) com 2,50-2,71 ppm dos grupo metileno ao lado do grupo carbonila, seis prótons (F) com 1,03-1,05 ppm do grupo metileno, dois prótons (E) com 2,20-2,26 ppm, quatro prótons (G) em 1,15-1,36 ppm e dezoito prótons (H) em 0,95 ppm dos grupo butilos do final das cadeias alifáticas do composto[253,254].

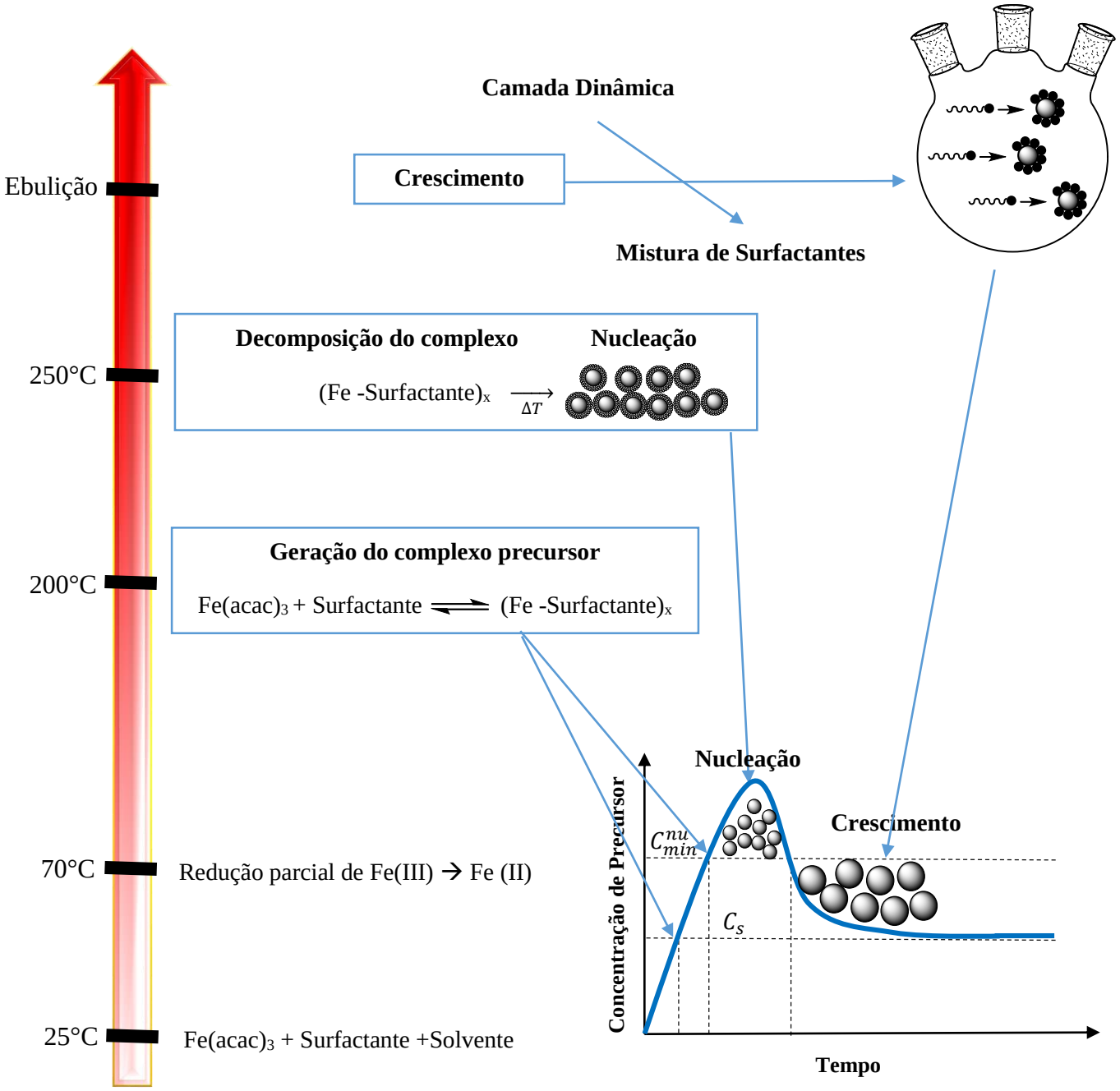
4.3 Descrição e caracterização das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

Com todos os dados obtidos, pode se describir a reação para a síntese de nanopartículas de magnetita preparada a partir de $Fe(acac)_3$. Todos os reagentes (precursor de Fe, surfactantes e solventes) são misturados à temperatura ambiente e a cor da mistura de reação foi vermelha. Quando atingem 70°C, a cor da mistura de reação vira de vermelho para o preto, devido à redução parcial de Fe(III) a Fe(II) pelo 1,2-octanodiol[255,256].

Mais tarde, próximo de 200°C, tem lugar a reação de inter troca entre o ligante acetilacetonato e o surfactante com a maior capacidade de coordenação de ferro para gerar o complexo precursor dos núcleos. A estrutura deste complexo é semelhante a um complexo Fe-surfactante que pode ser polinuclear[257]. Normalmente, um ácido carboxílico (ácido oleico) pode ser usado para recobrir o núcleo da nanopartícula, mas na sua ausência a oleilamina ou o diol podem assumir esse papel [258]. Esta reação de permutação não é totalmente favorecida e a cinética é lenta, portanto, um passo em que se estabiliza a temperatura é necessário. A produção de espécies precursoras se incrementa ao aumentar a quantidade de surfactante, precursor, a capacidade de coordenação do ligante com maior afinidade ao ferro e a temperatura de estabilização[257].

A temperatura de estabilização não deve exceder a temperatura na qual ocorre a nucleação para que não se sobreponham em tempo, a nucleação e crescimento. Este fato reflete-se numa ampla distribuição de tamanho ou numa distribuição bimodal[259].

A temperatura deve-se manter um mínimo de tempo (duas horas) até que a taxa de geração das espécies precursoras seja nula. Uma vez geradas as partículas de precursor, a temperatura eleva-se até a temperatura de ebulição do solvente (éter difenílico, T > 260°C). O aumento de temperatura deve ser lento e o aumento provoca a decomposição das espécies precursoras, resultando em núcleos de magnetita. A estrutura do núcleo de magnetita é como um partícula pequena, do tamanho de várias células unitárias que se encontra rodeado por moléculas do surfactante[260,261].



Esquema 4.1: Descrição da reação utilizando o $Fe(acac)_3$ como precursor[255–257,259–261]. Quando um tipo de complexo, designado como o precursor atinge o seu mínimo concentração de nucleação (C_{min}^{nu}), os núcleos aparecem e crescem. Isso faz com que a concentração de soluto comece a diminuir, por conseguinte, a concentração do soluto cai de novo abaixo do nível mínimo para a nucleação mas deve se manter por cima da concentração de saturação (C_s), então só o crecimento pode acontecer[256].

O processo de nucleação é instantâneo e é geralmente detectado por pequenas crepitações no interior do recipiente de reação correspondentes à decomposição do complexo de Fe-ácido oleico[262].

Em seguida, os surfactantes ao redor dos núcleos atuam como uma camada dinâmica superficial na qual estão-se adsorvendo e dissolvendo íons de Fe continuamente. A taxa de crescimento e, por conseguinte, o tamanho final e forma das nanopartículas é dada pela composição desta camada dinâmica de surfactantes[263]. Esta composição de camada dinâmica é dada pela mistura inicial de surfactantes na reação, estando normalmente em excesso em relação ao ferro. O crescimento será tanto maior quanto mais flexível essa camada, isto é, quando se aumentar a proporção de ligantes com menos capacidade de coordenar os átomos de Fe[263]. O processo de crescimento ocorre nos primeiros minutos de refluxo. Durante o tempo restante ocorrem vários processos, tais como a maturação de Ostwald, em que a distribuição do tamanho é reduzida, e a recristalização que melhora a ordem cristalina[264].

Neste tipo de síntese, o precursor de ferro de natureza orgânica irá dar origem às nanopartículas de magnetita a altas temperaturas, através de uma espécie intermediária que é a que finalmente se decompõe para produzir nanopartículas[257].

O solvente em que a reação tem lugar deve ter elevada temperatura de ebulição para permitir a decomposição térmica das espécies precursoras a alta temperatura (**Esquema 4.1**)[211]. O fato de que as altas temperaturas são atingidas faz com que as partículas sejam muito cristalinas, porque os átomos têm energia suficiente para se ordenar dentro da nanopartícula. Os solventes utilizados são geralmente os éteres de cadeia longa (éter difenílico, éter dibenzilico, éter de octila), hidrocarbonetos alifáticos (docosano, eicosano, tetracosano) ou com uma ligação dupla (1-octadeceno, esqualeno). O solvente serve como um meio de dispersão para as partículas, e são as porções carboxílicas dos surfactantes que se orientam em direção ao centro da nanopartícula[265].

Surfactantes desempenham vários papéis importantes como a formação de espécies precursoras dos núcleos de magnetita que podem ser, a redução da energia de superfície das partículas, por conseguinte a diminuição do diâmetro, o controle do crescimento das partículas, contribuindo para formar uma camada dinâmica em torno dos

núcleos, em que as moléculas são adsorvidas e dessorvidas da superfície e a estabilização final das partículas no meio orgânico[266]. A parte polar se liga à superfície das partículas, permanecendo a cadeia apolar orientada ao exterior, servindo assim de barreira estérica que evita o fenômeno de agregação (blindando as interações dipolares e de Van der Waals que existem entre as partículas)[267].

A caracterização da magnetita revestida com ácido oleico foi suficiente para determinar a composição, como o tamanho antes e depois da suspensão com o Tween 80, que cumpre com a finalidade de nosso trabalho.

A análise composicional de nossas amostras de nanopartículas revestidas com ácido oleico no que se refere a carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi feita pela técnica de análise elementar (CHN) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), utilizando um analisador elementar da marca *Perkin-Elmer*, modelo 2400 CHN. Através desta análise pudemos estimar a massa orgânica que recobre a partícula.

A percentagem em massa encontrada para N (%N), para as três sínteses foram de 0,08%, (5 nm) 0,12% (8 nm) e 0,18% (12 nm), com baixa precisão (~ 0,2 %), de onde concluímos que a lavagem foi muito eficiente, restando apenas traços da oleilamina. Com isso, consideramos que todo o oxigênio presente na amostra se deve à magnetita e ao recobrimento orgânico. Este pode ser calculado utilizando as quantidades de C e H, obtidas desta análise e considerando a fórmula molecular do ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$).

Normalizamos então as porcentagens em massa obtidas para C (%C) e (%H) da análise CHN, dividindo-as pelas respectivas massas atômicas (M = 12,001 e 1,008). Obtivemos portanto a relação entre o número de átomos de hidrogênio (n_H) e o número de átomos de carbono (n_C) para verificar se a relação entre ambos corresponde à proporção observada no ácido oleico e, assim, ter uma idéia da composição da camada orgânica (**Tabela 4.6**).

Tabela 4.6: Porcentagem de massa orgânica (%C, %H) do envoltório da magnetita, para os três tamanhos produzidos. n_H/n_C representa a relação molar de hidrogênio e carbono.

Amostra	%C	%H	n_c	n_H/n_C
5 nm	9,20	1,72	0,445	2,25
8 nm	12,01	2,20	0,459	2,17
12 nm	13,57	2,44	0,463	2,16

Para as três amostras a lavagem de material orgânico durante a síntese das partículas foi feita com sucesso, mas os nossos resultados mostram um possivel conteúdo de resíduos de material orgânico, diferente ao ácido oleico, dado que a relação de n_H/n_C para ele deveria ser de 1,89. Essa diferença pode ser devido a traços de oleilamina, acetilacetonato do precursor e/ou seus derivados. De fato, é esperado que apenas uma monocamada de ácido oleico recubra as nanopartículas, já que este não possui uma cadeia molecular linear como ocorre, por exemplo, com o ácido aminodecanóico, que tem uma cadeia linear e forma uma bicamada[268]. Por melhor que seja o processo de lavagem sempre haverá uma quantidade orgânica referente a esta monocamada na superfície da partícula e que só pode ser removida por reações químicas ou pela desnaturação do ácido oleico com o aumento de temperatura.

A concentração de ferro (Fe) na magnetita foi determinada utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Shimadzu AA-6300), no comprimento de onda 248,3 nm, no laboratório da professora Dra. Liane Marcia Rossi do Instituto de Química da USP. Esta análise nos forneceu as percentagens, em massa, do íon ferro presente nas amostras.

Novamente, normalizamo-las dividindo pelas respectivas massas atômicas, para o Fe. Devido à fórmula molecular da magnetita (Fe_3O_4), assumimos que para cada três átomos de ferro temos quatro átomos de oxigênio. Portanto, pudemos calcular a percentagem de O em massa devido à magnetita, que somada à percentagem do ferro nos dá a quantidade percentual de massa do óxido nas nanopartículas (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7: Valores em porcentagem da massa (% Fe) e de magnetita, assumindo a composição Fe_3O_4. A % massa orgânica é obtida por diferença.

Amostra	% Fe	% Magnetita	% massa org
5 nm	62,38	85,28	14,72
8 nm	60,56	83,57	16,43
12 nm	57,77	79,79	20,21

Da **Tabela 4.6 e 4.7** pudemos calcular as percentagens de magnetita e de material orgânico por duas técnicas diferentes (CHN e FAAS) que forneceram resultados bastante próximos entre si. A massa orgânica (ácido oleico) calculada por CNH ou massa de oxido calculada com FAAS apresenta valores próximos à massa orgânica calculados a partir da diferença da quantidade de oxido de ferro calculado por FAAS ou ao oxido pela diferença da quantidade de massa orgânica calculada por CNH (5nm, erro 2,47%, 8 nm, erro 0,46%, 12 nm, erro 2,20%). Então foi viável calcular o conteúdo de oxido de ferro por FAAS e pela diferença da massa orgânica calculada por CNH. Este é um resultado muito importante e será utilizado nas preparações das soluções.

A caracterização para a determinação da estrutura cristalina da magnetita se realizou pelo método de difração em pó (DRX). Os difratogramas de raios X foram obtidos por um difratômetro da marca Rigaku, modelo Miniflex (do professor Dr. Flavio M, Vichi do instituto de Química da USP), usando o método do pó nas seguintes condições experimentais: radiação Kα do cobre, λ = 1,5418 Å, operando em 30 kV, 15 mA de corrente e empregando um filtro de níquel. A amplitude de varredura foi de 2θ entre 5 e 40˚, a velocidade de varredura foi de 2˚ min^{-1} e o passo de leitura foi de 0,05˚.

Os dados foram tratados pelo software do equipamento, que confirmou a estrutura da magnetita, apresentando os seguintes difratogramas para cada formulação estudada (**Figuras 4.15 a 4.17**). Na amostra de magnetita estão presentes picos referentes aos planos hkl (220), (311), (511) e (440) em 2Θ = 30,4º; 35,8º; 57,2º e 63º respectivamente. O tamanho do cristal, que pode dar uma ideia do tamanho da partícula obtida, é apresentado na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8. Tamanho dos cristais de magnetita obtidos com as diferentes formulações.

Formulação	Tamanho (nm)
Síntese 5 nm	4,78
Síntese 8 nm	7.68
Síntese 12 nm	10,89

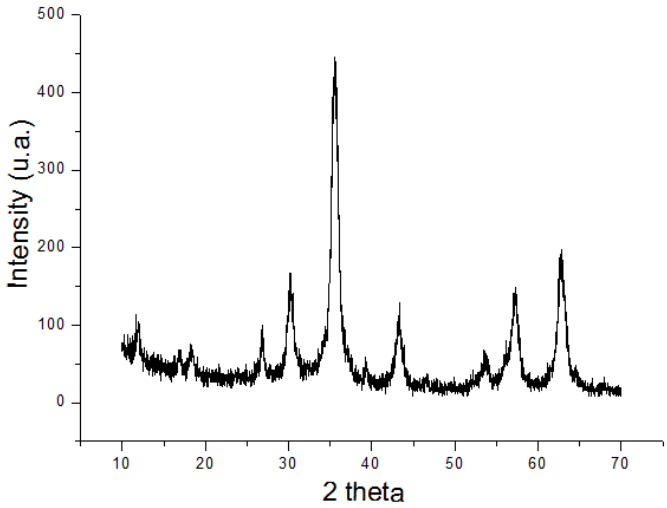


Figura 4.15. Difratograma da magnetita 5 nm

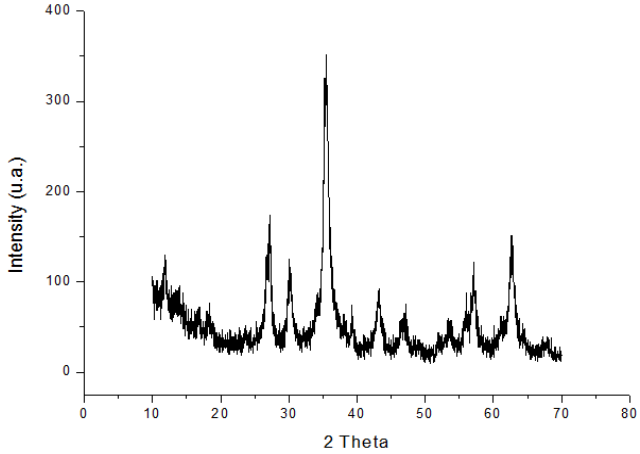


Figura 4.16. Difratograma da magnetita 8 nm

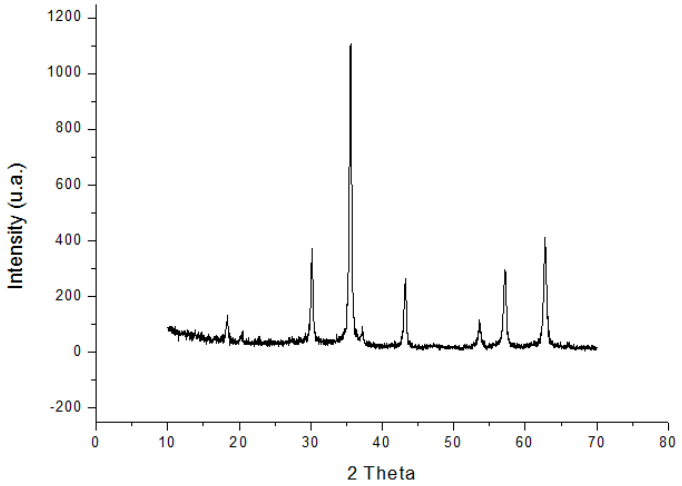


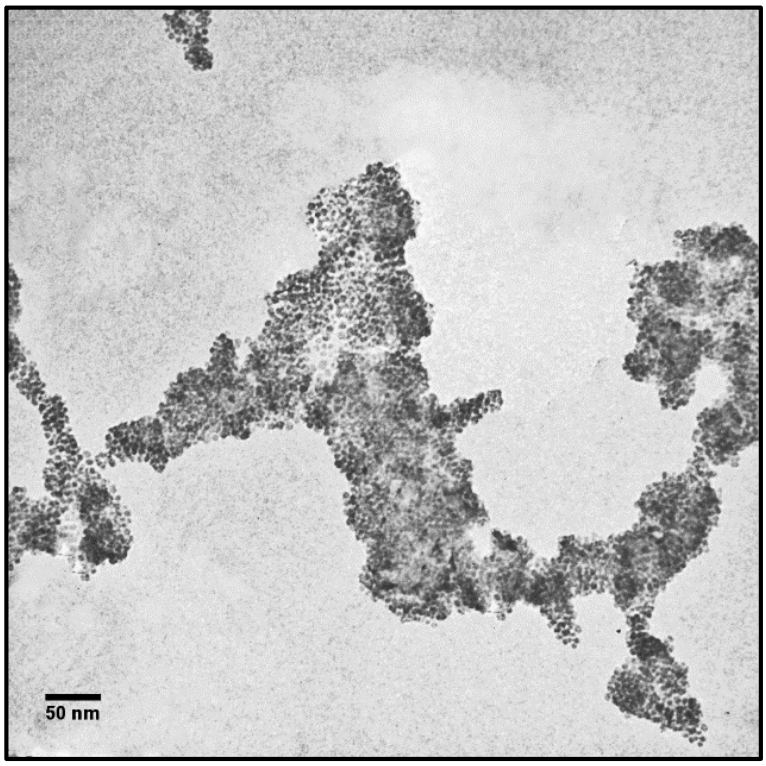
Figura 4.17. Difratograma da magnetita 12 nm

Os diferentes tamanhos médios de cristalito (**Tabela 4.8**), que indicam o tamanho da nanopartículas segundo a equação de Scherrer[269], são devidos ao grau de nucleação e crescimento que apresenta a partícula durante a síntese. A velocidade de crescimento e a nucleação estão em função da concentração do soluto. O soluto pode ser qualquer complexo em solução, o qual será o resultado da hidrólise e condensação do precursor ($Fe(acac)_3$). Se as magnitudes da rapidez da nucleação e crescimento forem invertidas, a nucleação deve ser feita num tempo curto, para manter um tamanho de partícula controlado[270].

As medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CX II com filamento de tungstênio e tensão de aceleração de 200 kV, com o qual foram obtidas imagens em 120000× de magnificação para todas as amostras produzidas. Na preparação das amostras para as análises TEM, dispersamos as nanopartículas, que estavam inicialmente em pó, em álcool isopropílico e apenas uma gota desta solução foi depositada em uma grade feita de cobre e recoberta com um fino filme de carbono. As imagens das três amostras de magnetita revestidas com ácido oleico se mostram nas **Figura 4.18 - 4.20.**

Podemos ver que as três amostras são constituídas por nanopartículas com formas quase-esféricas e morfologia homogênea, não apresentando uma estrutura do tipo núcleo (cristalina) – superfície (amorfa) identificável[271]. Também não foi observada a formação de aglomerados[272,273] , mostrando a eficiência do recobrimento em evitar tal formação.

Utilizando o programa de análises de imagens *ImageJ*, avaliamos o diâmetro das partículas aproximando-as de esféricas. Foram analisados os diâmetros de centenas de partículas de ao menos duas regiões distintas de todas as amostras para garantir uma boa análise estatística dos sistemas, possibilitando, assim a construção, com ajuda do programa Origin 8.0®, de um histograma de diâmetros médios (D) e sua dispersão (σ), que para as amostras de magnetita, são apresentados na **Figura 4.18**, até **Figura 4.20** com os respectivos ajustes com distribuição log-normal[274].



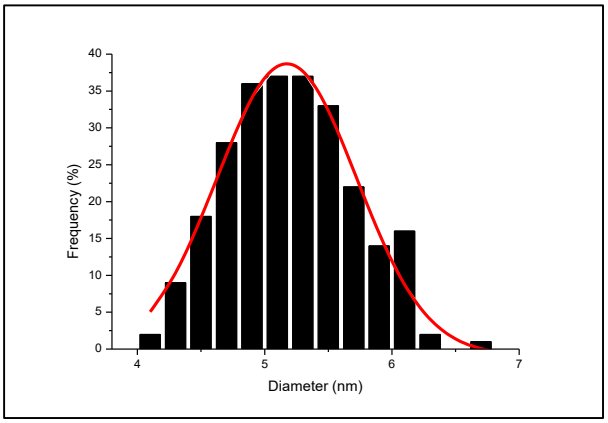
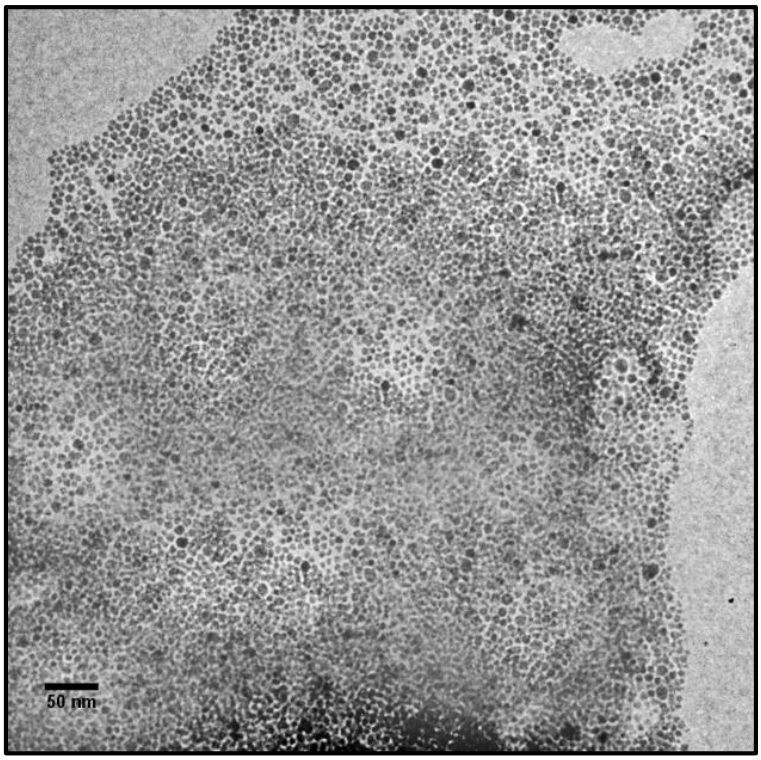


Figura 4.18: Imagem de microscopia eletrônica transmissão (TEM) e histograma de diâmetros das nanopartículas de magnetita de 5,17 nm (σ = 0,55) a um aumento de 120000×.



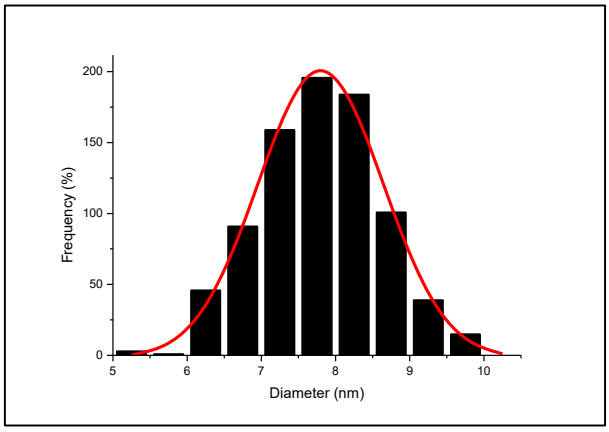
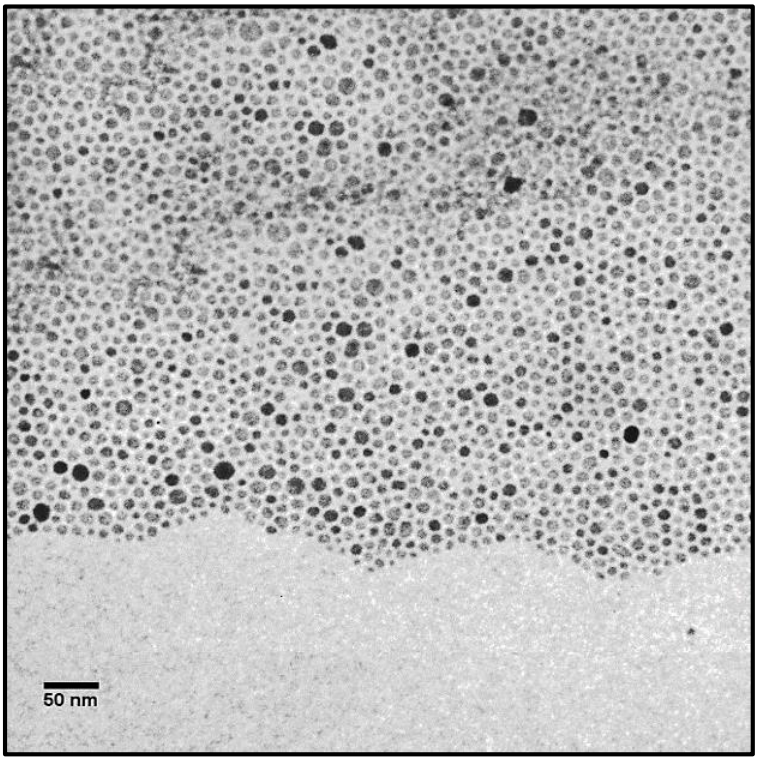


Figura 4.19: Imagem de microscopia eletrônica transmissão (MET) e histograma de diâmetros das nanopartículas de magnetita de 7,80 nm (σ = 0,84) a um aumento de 120000×.



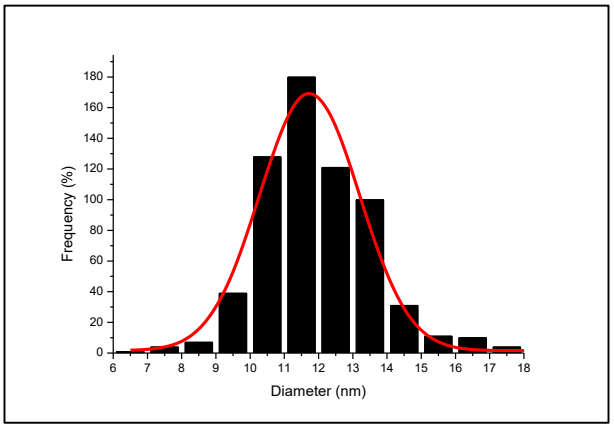
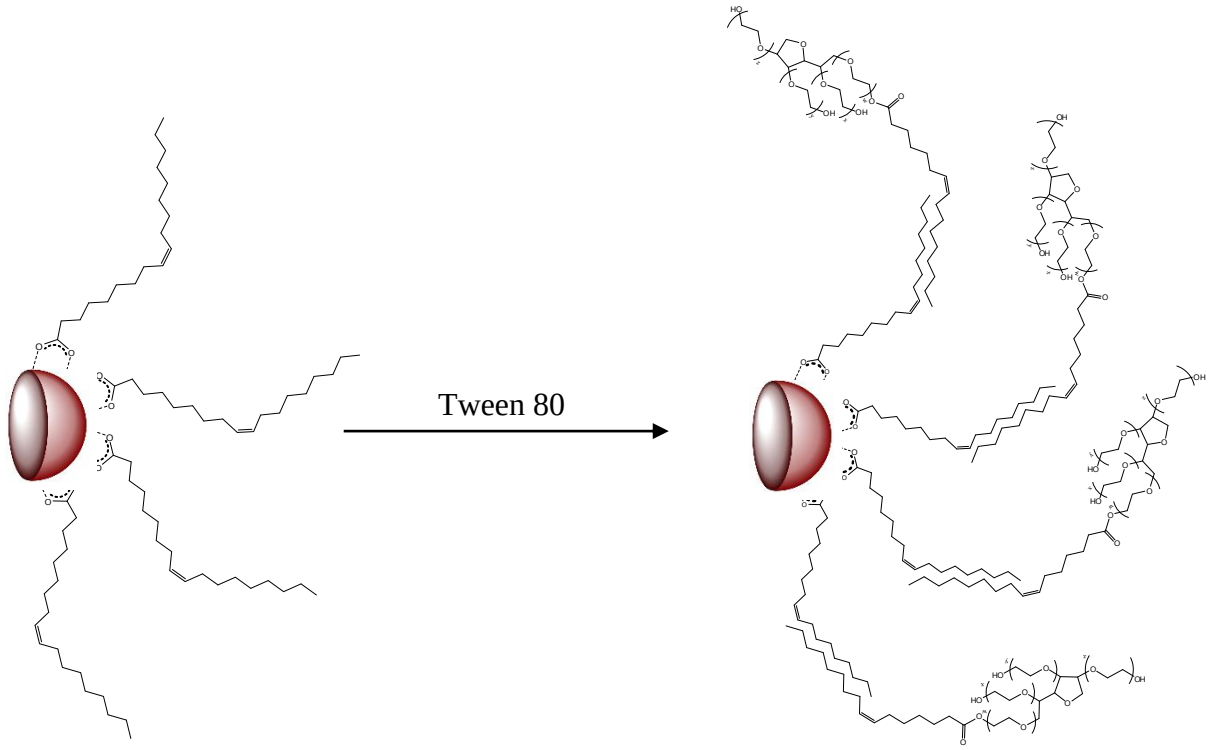


Figura 4.20: Imagem de microscopia eletrônica transmissão (MET) e histograma de diâmetros das nanopartículas de magnetita de 11,73 nm (σ = 1,45) a um aumento de 120000×.

A magnetita revestida por ácido oleico foi suspensa em Tween 80. A parte lipofílica do ácido oleico da magnetita interage com a fração afim da cadeia oleilílica do

Tween 80 (18 carbonos), deixando a parte hidrofílica na camada exterior[275,276] (**Esquema 4.2**).



Fe_3O_4-OA[277] Fe_3O_4-OA-Tween 80

Esquema 4.2: Suspensão da magnetita revestida de ácido oleico com o Tween 80.

Depois da suspensão em Tween 80 foi determinada o tamanho das nanopartículas em solução a pH 7,0 e o potencial Z.

As medidas de potencial Zeta (ζ) das nanopartículas foram realizadas a 25°C empregando-se um equipamento Malvern Zetasizer Nano SZ 90. As medidas de potencial Zeta refletem o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão[278]. O potencial Zeta é medido aplicando-se um campo elétrico através da dispersão. As partículas que possuem um potencial Zeta migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional ao valor de seu potencial. Esta velocidade é medida usando a técnica Laser Doppler Anemometry[279].

Os potenciais Zeta das nanopartículas, depois do revestimento ou suspensão com o surfactante Tween 80, foram sempre negativos, como é apresentado na **Tabela 4.9**, indicando que mesmo em pH 7,0 a carga residual das cadeias do surfactante era negativa (**Anexo 9.1-9.3).** A concentração do revestimento da nanopartícula do ácido oleico (**Tabela 4.6 e 4.8**), em relação crescente com o tamanho, pode exercer uma densidade de maior carga superficial devido às maiores concentrações de surfactante[263]. Ou seja, a nanopartícula de menor tamanho tem menor quantidade de ácido oleico, porém precisa de menos surfactante para ser suspensa ou estabilizada, adotando assim menor carga superficial. O aumento da nanopartícula cresce com o aumento necessário de ácido oleico para poder-se estabilizar em meio orgânico, por conseguinte, esse aumento é progressivo com a quantidade necessária de surfactante estabilizante (Tween 80) em meio aquoso, incrementando a carga superficial, estabilidade, tamanho e sua distribuição (**Tabela 4.10**). O Rh aumenta conforme o tamanho de nanopartícula, dado que o Tween 80 estabelece uma nova camada (cerca de 2 – 4 nm) sobre o acido oleico. Nos **Anexo 9.4-9.6** se mostram os perfis de distribuição de tamanho do Rh das nanopartículas, nos quais é possível verificar que ocorre uma faixa de tamanhos de partículas maiores, devido à formação de bolhas promovida pelo Tween80 durante a medição.

Tabela 4.9: Potencial Zeta das nanopartículas depois da suspensão com Tween-80 a pH 7,0, 25°C

Amostra	Potencial Zeta (mV)
5 nm	-12,56 ± 3,28
8 nm	-19,33 ± 4,71
12 nm	-20,9 ± 5,17

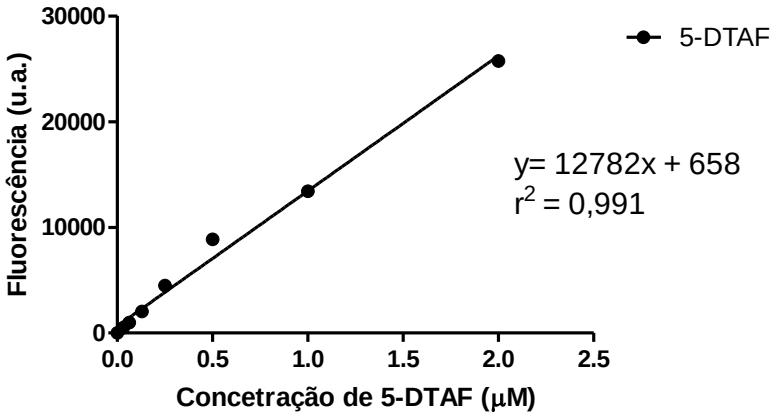
Tabela 4.10: Raio hidrodinâmico das nanopartículas depois da suspensão com Tween-80, pH 7,0, 25°C.

Amostra	Raio hidrodinâmico (nm)
5 nm	9,3 ± 2,2
8 nm	11,1 ± 2,0
12 nm	14,2 ±1.3

4.4 Quantificação de fluorescência da transferrina fluorescente (Fl-Tf)

A transferrina fluorescente (FlTf) foi sintetizada a partir da apotransferrina ou holotransferrina numa síntese em meio básico com o 5-DTAF[152]. A grande massa molecular da transferrina 76-81 kD[280] foi aproveitada para a purificação por diálise[152,183]. E em seguida se calculou a quantidade da parte fluorescente pelo método de fluorescência. Todos os testes com a Fl-Tf foram com o produto para o qual se obteve maior rendimento de fluorescência. A concentração de transferrina marcada com 5-DTAF foi calculada através de uma curva de calibração com padrões de 5-DTAF (λexc/λem = 485 / 520 nm)[91].

Os valores das fluorescências de ambas proteínas marcadas foram de 17600 (apo) e 17000 (holo) em unidades arbitrárias de fluorescência. Os valores foram substituídos na curva de calibração (**Figura 4.21**) para finalmente obter um rendimento de 88% (apo) e 85% (holo) de marcação fluorescente. A concentração de parte proteica (apotransferrina /holotransferrina) foi determinada a partir da massa inicial da proteína. **Figura 4. 21** :Curva de calibração 5-DTAF para determinar a concentração de marcador fluorescente da apo- e holo- transferrina.



4.5 Quantificação da marcação de fluorescência da desferrioxamina fluorescente (Fl-DFO)

O DFO exibe uma conformação estendida, enquanto uma configuração completamente contraída é adotada em torno de um íon de metal uma vez que os seis átomos de oxigênio dos grupos hidroxamato são ligados em seis vértices de um octaedro que inclui um íon metálico no seu centro[76].

DFO tem uma constante muito elevada complexação (log K) de 30,7[76] para íons Fe(III) em comparação com Fe(II) (7,2), Ni(II) (10,9), Cu(II) (14,1), Zn(II) (10,1) e Al(III) (23,1). Ele pode ser um receptor altamente eficaz e seletivo para íons Fe(III)[281]. Daí decorre a importância da síntese do Fl-DFO para tentar avaliar a capacidade de ligação do ferro da magnetita por supressão de fluorescência, uma vez que a DFO liga qualquer ferro lábil produzido pela nanopartícula, apresentando supressão de fluorescência devido à formação do complexo [Fe(Fl-DFO)] numa proporção 1:1[218].

O composto preparado Fl-DFO segundo o procedimento descrito no **item 3.6,** teve uma fração de fluoresceína (Fl) determinada por quantificação de fluorescência e outra de DFO por titulação fluorimétrica.

Na determinação da fração fluorescente se usou um estoque de FITC 1 mM e foi preparada uma curva de calibração (**Figura 4.22).** Para a preparação da amostra se assumiu que o sólido obtido (Fl-DFO; MM = 950,06 g/mol) estaria na relação 1:1 fluoresceína: DFO. Pesou-se 0,0011 g de amostra e se diluiu em HBS, para uma concentração final de 1 mM, e em seguida se diluiu a 2 µM em 5 mL de HBS.

Finalmente, segundo a nossa curva de calibração com FITC (**Figura 4.22)** a concentração da parte fluorescente foi 0,1938 µM que equivaleria a 9,69% de Fl da massa total da amostra preparada de Fl-DFO.

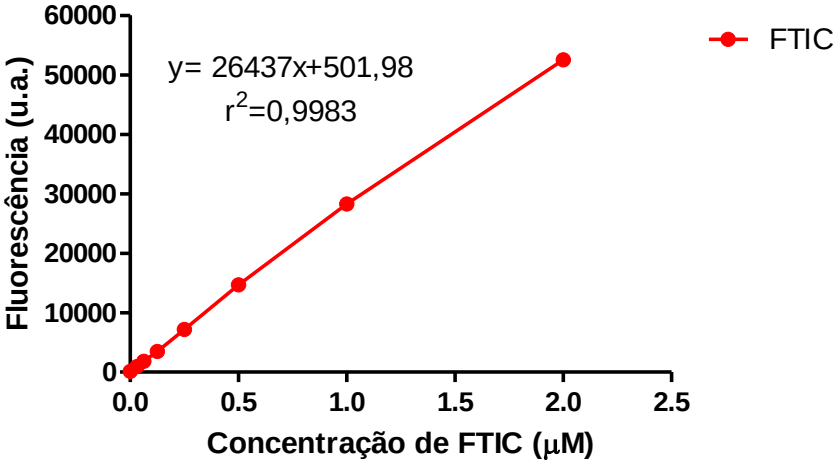


Figura 4.22 :Curva de calibração FITC para determinar a parte fluorescente da Fl-DFO.

A proporção da marcação fluorescente do DFO precisaria ser determinada (assumindo que, durante a síntese de Fl-DFO, nem toda molécula de DFO foi marcada). Então, uma solução 2 µM (em termos de fluorescência) de Fl-DFO foi titulada com FAS (**Figura 4.23**). A fluorescência é constantemente suprimida até que se satura de ferro toda a Fl-DFO. Portanto, nessa curva, quando se atinge a supressão máxima de fluorescência, a concentração de Fl-DFO é igual à de ferro (já que a estequiometria é 1:1).

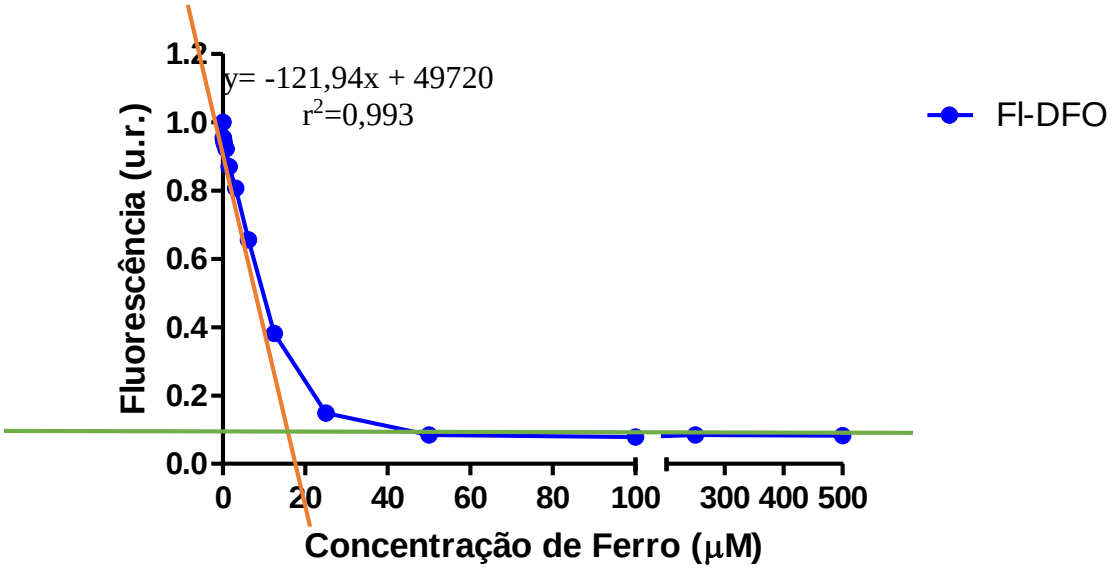


Figura 4.23: Titulação de complexação do Fl-DFO com o ferro. r.u = unidades relativas de fluorescência.

Na **Figura 4.23**, é muito importante perceber que o ferro está reagindo tanto com DFO marcado com fluoresceína (Fl-DFO) como com DFO não marcado. A supressão máxima é encontrada quando [Fe] = 18,7 μM nessa figura (valor obtido pela extrapolação do segmento linear). Nessa situação, *todas* as moléculas de DFO (marcadas ou não) foram saturadas com o metal. Então, calculando-se a proporção de DFO/Fl se tem:

$$\frac{[DFO]}{[Fl]} = \frac{18{,}7\mu M}{1{,}9\ \mu M} = 9{,}84 \sim 10$$

Do resultado se pode concluir que a sonda tem uma porcentagem de 10% de marcação de fluorescência.

4.6 Estudo da estabilidade dos compostos de ferro frente a quelantes endógenos e exógenos

A estabilidade dos compostos de ferro foi avaliada usando a sonda fluorescente calceína, aproveitado sua semelhança com o EDTA, e a afinidade pelo ferro (pK ~33,8)[92] em meio aquoso. Estes testes foram realizados em diferentes condições fisiológicas (soro sanguíneo, meio de cultura de artêmias e meio de cultura de hepatopâncreas de caranguejo) considerando os limites de ligação em relação ao pH (**Figura 4.24**). A quelação de ferro com calceína tem uma relação 1:1 (**Esquema 4.3**), com uma maior afinidade pelo Fe(III) através dos átomos de oxigênio da calceína, segundo a teoria ácido duro e base mole de Pearson. O ferro se se liga à calceína num arranjo octaédrico dando origem ao complexo estável de $HCALFe^{III}$ [92].

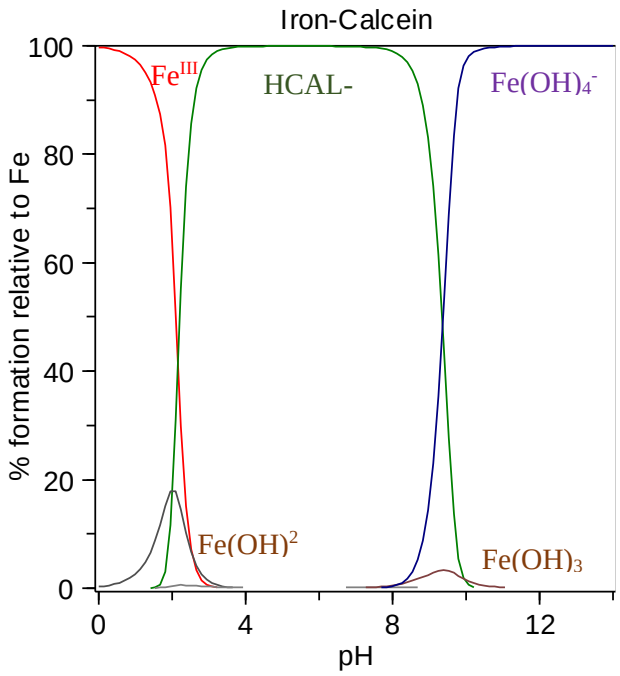
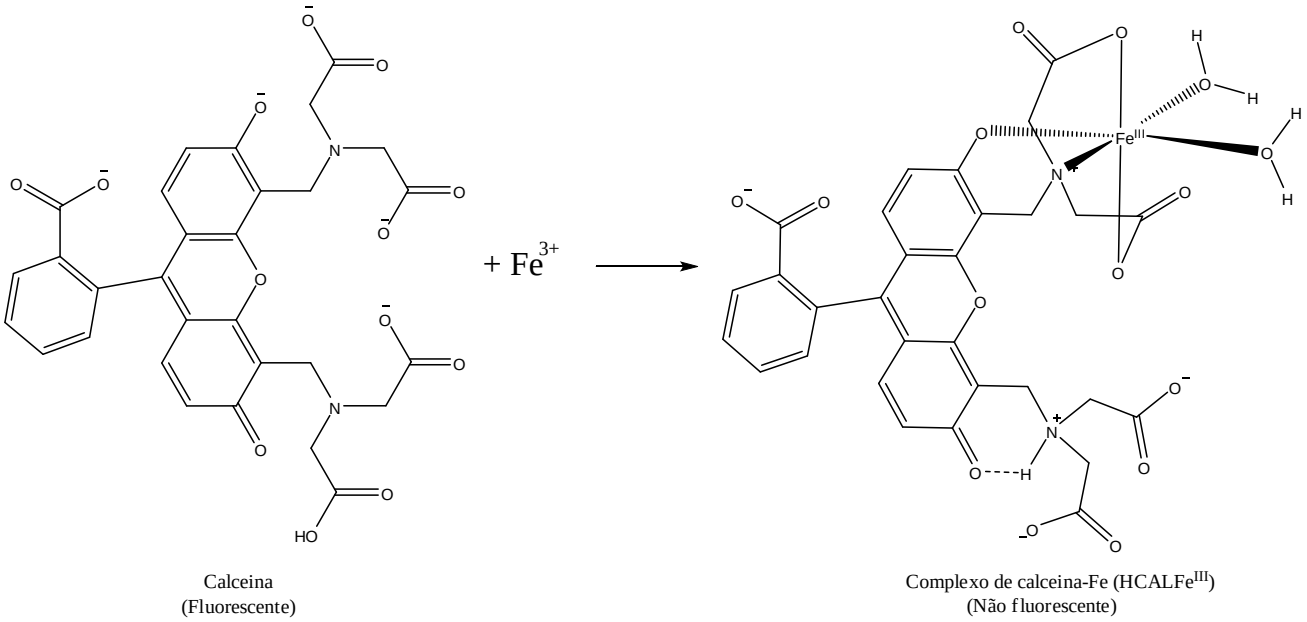
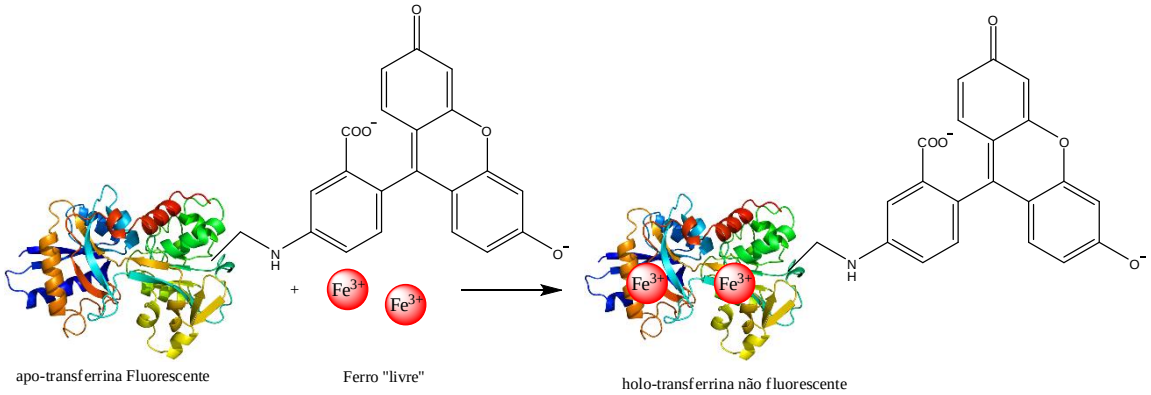


Figura 4.24: Especiação de Fe-calceína em solução aquosa. O gráfico foi produzido com ajuda do software Hyperquad Simulation and Speciation (HySS)[217], utilizando as constantes de formação de espécies de hidróxido de ferro[51], calceína-ferro[92,282,283], com os seguintes valores logarítmicos: -2.56 $[FeOH]^{2+}$,-6.20 $[Fe(OH)_2]^{+}$,-15.1 $Fe(OH)_3$, -21.88 $[Fe(OH)_4]^{-}$, -2.84 $[Fe_2(OH)_2]^{4+}$, -6.05 $[Fe_3(OH)_4]^{5+}$, 11,64 HCAL, 9,88 H_2CAL, 6,19 H_3CALFe, 4,58 H_4CALFe, 3,53 H_5CALFe, 2,74 H_6CALFe, 33,80 HCALFe, 24,00 CALFe[212].



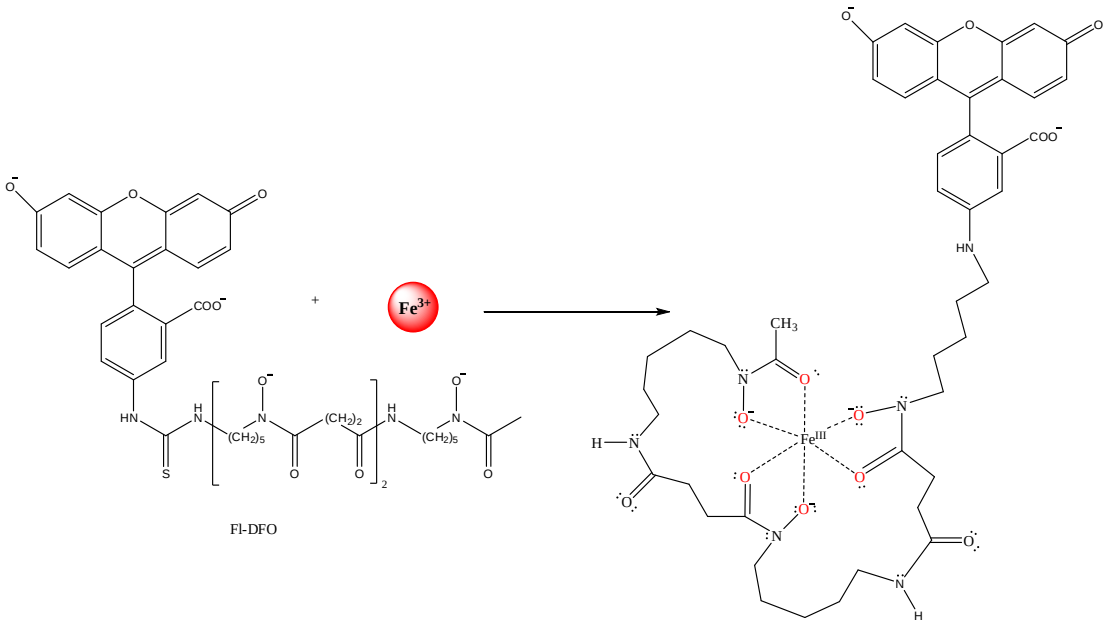
Esquema 4.3: Reação de complexação com supressão de fluorescência da calceína por ferro[92].

A transferrina é uma proteína de transporte e carrega o ferro no plasma e no líquido extracelular para suprir as necessidades teciduais. A transferrina pode ligar dois átomos de íon férrico na sua estrutura (**Esquema 4.4**). É usada nos nossos ensaios de estabilidade de compostos de ferro, pela afinidade termodinâmica (pK ~23)[76] como um modelo mais de quelante de fluido sanguíneo, sendo para isso marcada com uma sonda fluorescente para determinar o nível de ligação dos compostos de ferro nos diferentes meios fisiológicos estudados.



Esquema 4.4: Reação de supressão de fluorescência da Fl-aTf quando se liga a dois átomos de íon férrico.

Como já visto, a desferroxamina (DFO) forma complexos predominantemente com os íons trivalentes de ferro (**Esquema 4.5**). É também utilizada nos nossos testes como um modelo quelante de grande afinidade (pK ~30,7) [76].



Esquema 4.5: Reação de complexação com supressão de fluorescência do Fl-DFO com ferro.

A importância do estudo com as diferentes sondas neste trabalho teve como princípio fundamental avaliar a estabilidade de distintos metalofármacos de ferro (fármacos comerciais e possíveis candidatos a fármacos) nos distintos meios fisiologicamente relevantes. Nos estudos a seguir, calceína, transferrina fluorescente e deferiprona foram utilizadas para avaliar a estabilidade dos metalofármacos comerciais. Calceína e transferrina fluorescente foram usadas para estudar os derivados de ferroceno. Finalmente, calceína, transferrina fluorescente e desferrioxamina fluorescente foram usadas para as nanopartículas de magnetita.

4.6.1 Estudo da estabilidade dos fármacos comerciais.

Calceína, desferrioxamina e transferrina são fortes quelantes de ferro(III), por conseguinte, eles são úteis como modelos de ligação de alta afinidade dos substratos biológicos no ambiente[91]. Além disso, a fluorescência da calceína e dos derivados fluorescentes da desferrioxamina e da transferrina é estequiometricamente suprimida pelo ferro, tornando estas moléculas úteis para a detecção do metal em concentrações muito baixas, por meio de ensaios de equilíbrio competitivo. O conceito subjacente é, quanto

maior for a estabilidade do metalofármacos à base de ferro, pouco ferro lábil estará disponível para ligação com essas sondas, e, consequentemente, menor será a supressão da fluorescência das mesmas. Por meio de uma curva de calibração com ferro "livre", como FAS, é possível quantificar a quantidade de ferro liberado pelos metalofármacos de ferro e, em seguida, estimar suas estabilidades[91]. Uma vez emitida para o meio ambiente, metalofármacos de ferro podem ser absorvidos como moléculas intactas (que se dissociam dentro do organismo), ou eles podem dissociar-se, tornando assim os produtos de hidrólise responsáveis por uma série de efeitos biológicos[183]. Os estudos de estabilidade foram realizados condições fisiológicas, de soro sanguíneo (HBS) e animais (crustáceos: *Artemia salina* e *Ucides cordatus*).

Metalofármacos de ferro com revestimento polimérico e com uma concentração máxima $[Fe]_{total}$ = 2 µM exibiram grande estabilidade frente à calceína e Fl-Tf nos diferentes meios, pois não foram capazes de promover supressão da fluorescência significativa de qualquer sonda mediante reação com estes compostos (**Figura 4.25 e 4.26**). De fato, o ferro lábil resultante da dissociação destas moléculas foi detectado apenas em concentrações mais elevadas de droga (**Tabela 4.11 e 4.12**) e só em meio fisiológico a pH 7,4 , atingindo algo em torno de 2% de ferro total[152]. Em meio marinho não foi possível a detecção a detecção de ferro lábil (dados não mostrados). Nosso resultados indicam que baixos níveis de emissões dessas drogas não induziriam altos níveis de ferro lábil em amostras ambientais.

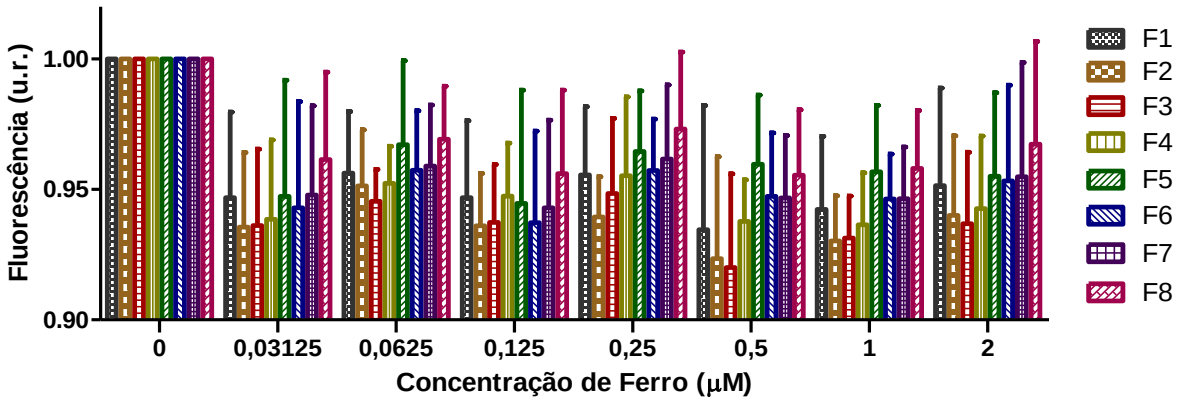


Figura 4.25: Estabilidade dos fármacos comerciais (0 → 2 µM) frente à calceína 2 µM em tampão HBS, para um tempo de 24 h com n=8. Os resultados não mostram diferenças significativas segundo os testes de ANOVA para um nível de confiança de 95%.

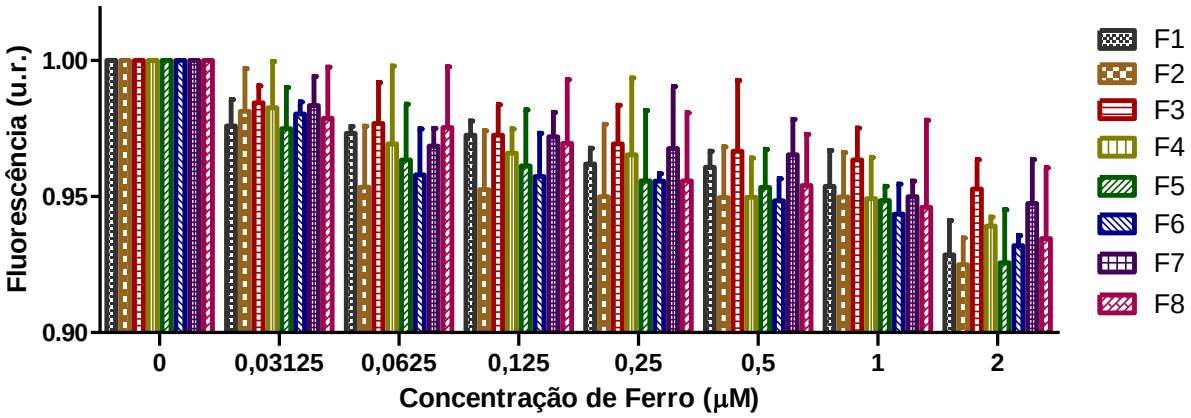


Figura 4.26: Estabilidade dos fármacos comerciais (0 → 2 μM) frente apotransferrina 2 μM em tampão HBS, para um tempo de 24 h com n=8. Os resultados não mostram diferenças significativas segundo os testes de ANOVA para um nível de confiança de 95%.

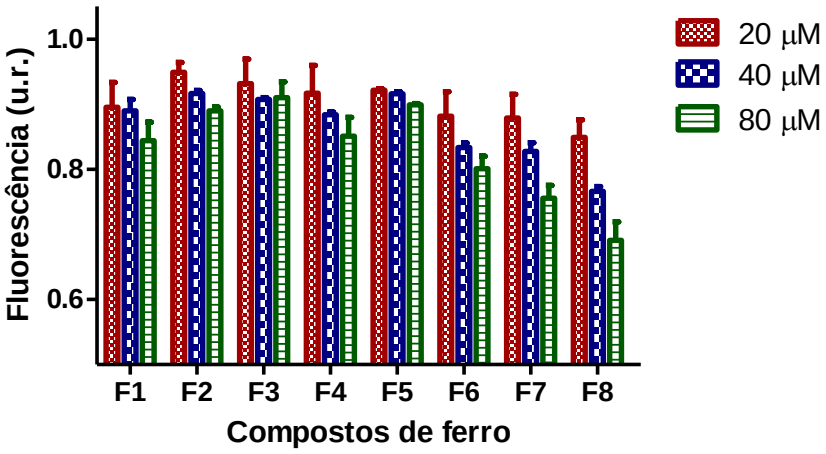


Figura 4.27: Perfil de supressão de fluorescência devido aos fármacos comerciais a concentrações de 20, 40 μM e 80, a pH 7,4 frente à calceína 2 μM em tampão HBS, para n=8.

Tabela 4.11: Concentrações de ferro lábil (μM) a partir dos fármacos comerciais a pH 7,4 (HBS) frente à calceína 2 μM. Resultados se mostram como (média ± desvio padrão), para n=8.

Fármacos	$[Fe]_{total}$ = 20 μM	$[Fe]_{total}$ = 40 μM	$[Fe]_{total}$ = 80 μM
F1	0,37±0,07	0,38±0,03	0,47±0,06
F2	0,27±0,03	0,33±0,01	0,38±0,01
F3	0,31±0,07	0,35±0,01	0,35±0,04
F4	0,33±0,08	0,39±0,01	0,45±0,05
F5	0,33±0,01	0,34±0,01	0,37±0,01
F6	0,40±0,07	0,49±0,01	0,55±0,04
F7	0,40±0,07	0,50±0,02	0,63±0,04
F8	0,46±0,05	0,61±0,01	0,75±0,05

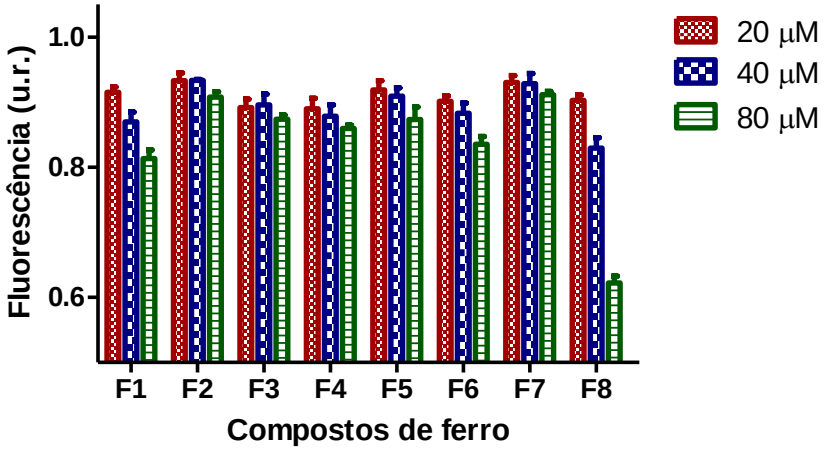


Figura 4.28: Estabilidade dos fármacos comerciais frente à Fl-Tf, 2 μM em tampão HBS. (n=8).

Tabela 4.12: Concentrações de ferro lábil (μM) a partir dos fármacos comerciais a pH 7,4 (HBS) frente à Fl-Tf 2 μM. Resultados se mostram como (média ± desvio padrão), para n =8.

Fármacos	$[Fe]_{total}$ = 20 μM	$[Fe]_{total}$ = 40 μM	$[Fe]_{total}$ = 80 μM
F1	0,32±0,04	0,53±0,07	0,79±0,06
F2	0,24±0,05	0,24±0,01	0,36±0,04
F3	0,43±0,06	0,41±0,08	0,51±0,04
F4	0,44±0,07	0,49±0,08	0,58±0,05
F5	0,30±0,07	0,35±0,06	0,51±0,05
F6	0,38±0,04	0,47±0,07	0,69±0,04
F7	0,25±0,05	0,26±0,07	0,34±0,04
F8	0,38±0,04	0,72±0,08	1,68±0,05

A pH 7,4 o ferro é captado pela calceína ou apotransferrina[91], depois de uma competição com o invólucro orgânico de cada fármaco de ferro. O ferro imobilizado, dentro de núcleo hidróxido férrico[284] se encontra recoberto de dextrano, glucoheptonato/dextrano, glicinato/dextrano ou polimaltose, e estes vão determinar a estabilidade de cada composto[285].

Frente à calceína e a condições de pH 7,4, os fármacos de administração intravenosa guardam a seguinte relação de estabilidade (**Figura 4.27**):

Ferro-dextrano ≈ Ferro-glucoheptonato ≥ Ferro-glicinato > Ferro-polimaltose

Por outro lado frente à transferrina fluorescente em condições de pH 7,4, a seguinte ordem de estabilidade é observada (**Figura 4.28**):

Ferro-dextrano ≥ Ferro-glicinato> Ferro-glucoheptonato > Ferro-polimaltose

Em ambos os testes *in vitro* os complexos de ferro dextrano apresentam maior estabilidade (**Tabela 4.11 e 4.12**), e pelo contrário o ferro polimaltose mostra menor estabilidade, ou seja, maior quantidade de ferro lábil disponível. Essa diferença poderia

ser explicada devido a que os fármacos de administração via intravenosa (VI) (ferro-dextrano), devem ter menor disponibilidade de ferro, pois esses entraram em contato direto com a corrente sanguínea, podendo gerar uma sobrecarga de ferro, assim um consequente dano a nível sistêmico. Em contraparte os metalofármacos de via oral (VO) por não apresentar disponibilidade imediata com a corrente sanguínea, disponibilizam ferro com maior facilidade (ferro-polimaltose)[233,286].

Os metalofármacos de ferro, segundo a via de administração podem apresentar diferenças de estabilidade frente a quelantes com maior afinidade pelo ferro. Mais ainda esses poderiam mostrar diferenças de estabilidade em diferentes condições fisiológicas, como a de soro sanguíneo (pH 7,4) ou suco gástrico (pH 2,2).

Partindo do mencionado acima os metalofármacos foram avaliados frente à deferiprona (DFP), considerando as condições nas quais são absorvidos no corpo, tendo em conta que a DFP é um fármaco comercial de via oral, muito usual em terapia de quelação de ferro por sua alta afinidade (pK = 37)[215] . Adicionalmente os fármacos de IV foram avaliados com uma mistura competitiva de quelantes citrato-deferiprona, tendo em conta que o citrato está presente na corrente sangüínea, podendo formar complexos de citrato férrico[287,288].

As **Figuras 4.29 e 4.30** mostram os perfis de estabilidade de 72 horas, onde o aumento da inclinação das curvas mostra a ligação do ferro disponível dos fármacos IV, que é ligado à DFP em condições de pH 7,4 (MOPS), com concentrações de ferro disponível (**Tabela 4.13**) de em torno de 11,0-14,4 % da concentração total de ferro no fármaco. Por outro lado, os fármacos de VO apresentaram nas mesmas condições de pH, disponibilidade de ferro em 35% frente à DFP, que confere com a via de administração, e a menor estabilidade como antes mencionado[233,286]. Adicionalmente, os fármacos de VO apresentaram similar perfil de quelação (**Figura 4.31**), e possuem ferro disponível numa faixa de 38-40 %, em condições fisiológicas de suco gástrico (pH 2,2), mostrando uma maior disponibilidade de ferro devido às condições ácidas do meio, frente à DFP.

Tabela 4.13: Estabilidade dos fármacos (200 µM) frente à DFP (pH 2,2 ou 7,4) ou DFP-Cit (pH 7,4). Concentração (µM) e porcentagem de ferro quelado.

Fármaco	DFP (pH 2,2)	DFP (pH 7,4)	DFP-Cit (pH 7,4)
F1	*	26,23±0,03 (13,1%)	33,38±0,01 (16,7%)
F2	*	26,67±0,02 (13,3%)	32,08±0,01 (16,0%)
F3	*	24,10±0,01 (12,1%)	35,71±0,03 (17,9%)
F4	*	21,89±0,03 (11,0%)	29,36±0,01 (14,7%)
F5	*	26,23±0,01 (13,1%)	32,40±0,02 (16,2%)
F6	*	29,13±0,02 (14,5%)	24,78±0,01 (12,4%)
F7	77,20±0,03 (38,6%)	70,80±0,03 (35,4%)	44,69±0,03 (22,3%)
F8	79,81±0,02 (39,8%)	70,63±0,01 (35,2%)	49,70±0,01 (24,8%)

* Os fármacos não foram testados nestas condições pois são de absorção intravenosa.

A presença do citrato em competição com a deferiprona produz diferentes comportamentos, conforme o recobrimento polimérico dos metalofármacos [289]. A **Tabela 4.13,** mostra que os compostos de VI em condições de pH 7,4, de maneira geral, apresentam um incremento na disponibilidade de ferro frente à DFP em presença de citrato. Nestes fármacos (pH 7,4), o citrato pode promover a liberação de ferro até cerca de 3%, pois o citrato pode se ligar com o ferro e formar complexos de estruturas diméricas ou oligoméricas (mas não monoméricas). Assim, o citrato poderia auxiliar a mobilizar o ferro para ligar com a DFP[289,290]. Já os fármacos de VO apresentaram uma diminuição de ligação com a DFP em presença de citrato a pH 7,4 numa faixa de 10-13% de ferro total. O citrato é frequentemente usado para revestir nanoparticulas de óxido de ferro, estabilizando-as, com boa estabilidade em condições fisiológicas humanas [291], e podem até suportar altos níveis de salinidade[292]. Então, o citrato pode demonstrar ser um fator protetor análogo aos fármacos de via oral, indisponibilizando ferro para a DFP. No entanto, podem acontecer outros processos estabilizadores ainda não estudados, nestas condições.

Nos fármacos VO, a diminuição de pH (7,4 a 2,2) favorece a disponibilização de ferro para se ligar à DFP[293,294], pela desestabilização da camada polimérica que envolve o complexo de hidróxido de ferro-glicinato (F7) e hidróxido de ferro-polimaltose (F8).

Os fármacos de ferro estão formados por núcleos polinucleares de hidróxidos de ferro envolvido por ligações não covalentes com o dextrano resultando frequentemente numa massa molecular de cerca de 50 kD ou mais[295]. Esses complexos são estáveis e não liberam facilmente ferro iônico em condições fisiológicas[183]. Os núcleos dos complexos de ferro são similares à estrutura da ferritina. Devido a essa similaridade, o Fe(III) do complexo pode ser absorvido por processo de absorção ativa, via troca competitiva com outras proteínas ligantes em fluido gastrointestinal ou plasma sanguíneo[293].

Fármacos via intravenosa e via oral se diferenciam pela estabilidade e formulação; os de via parenteral são mais estáveis e não deveriam liberar ferro com facilidade para evitar a toxicidade indesejada por oxirredução do ferro, e assim evitar o dano oxidativo[293]. Os fármacos de VI pelo geral são revestidos por dextrano, os quais são de maior estabilidade, por outro lado os fármacos de VO apresentam revestimentos de glicinato ou polimaltose de menor afinidade pelo núcleo hidroxo-férrico, assim menor estabilidade, que pode aumentar a absorção de ferro.

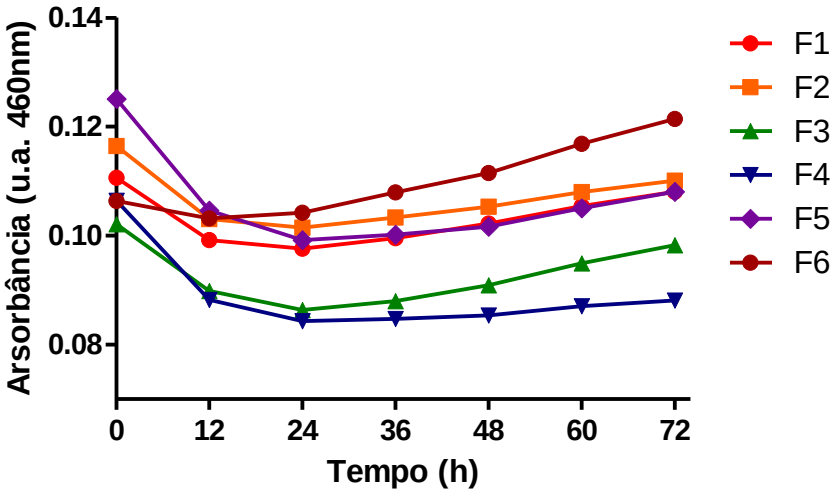


Figura 4.29:Disponibilidade de ferro dos fármacos via intravenosa por formação de Fe-DFP a pH 7,4 (MOPS), por 72 horas, (n=3).

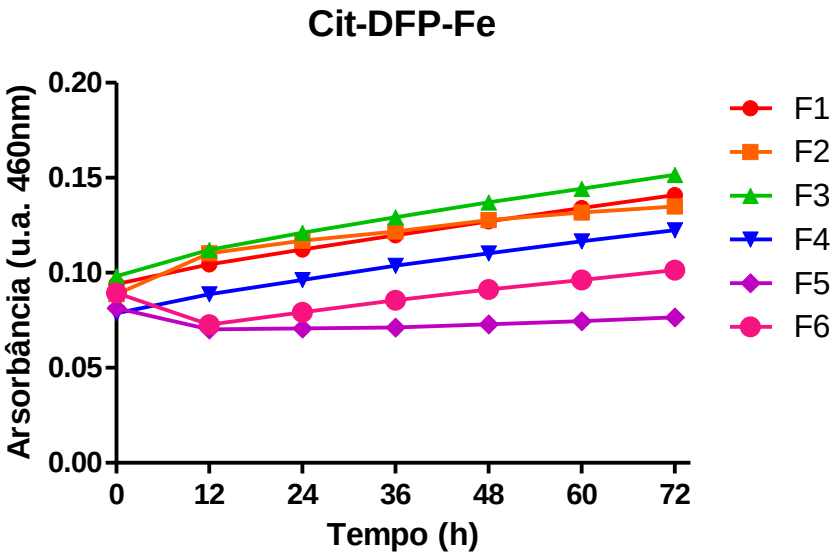


Figura 4.30: Disponibilidade de ferro dos fármacos via intravenosa por formação de Fe-DFP em precença de citrato a pH 7,4 (MOPS), por 72 horas, (n=3).

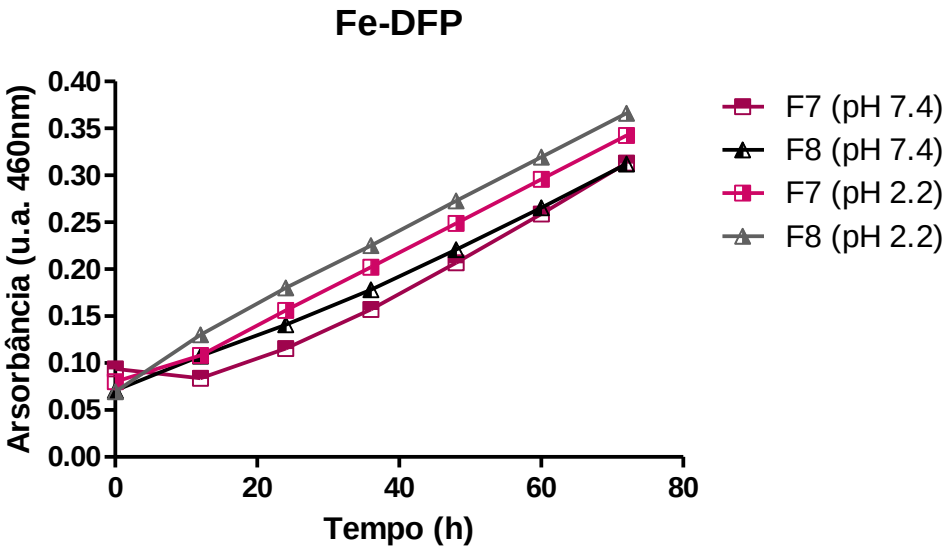


Figura 4.31: Disponibilidade de ferro dos fármacos via oral por formação de Fe-DFP a pH 2,2 (fosfato), por 72 horas, (n=3).

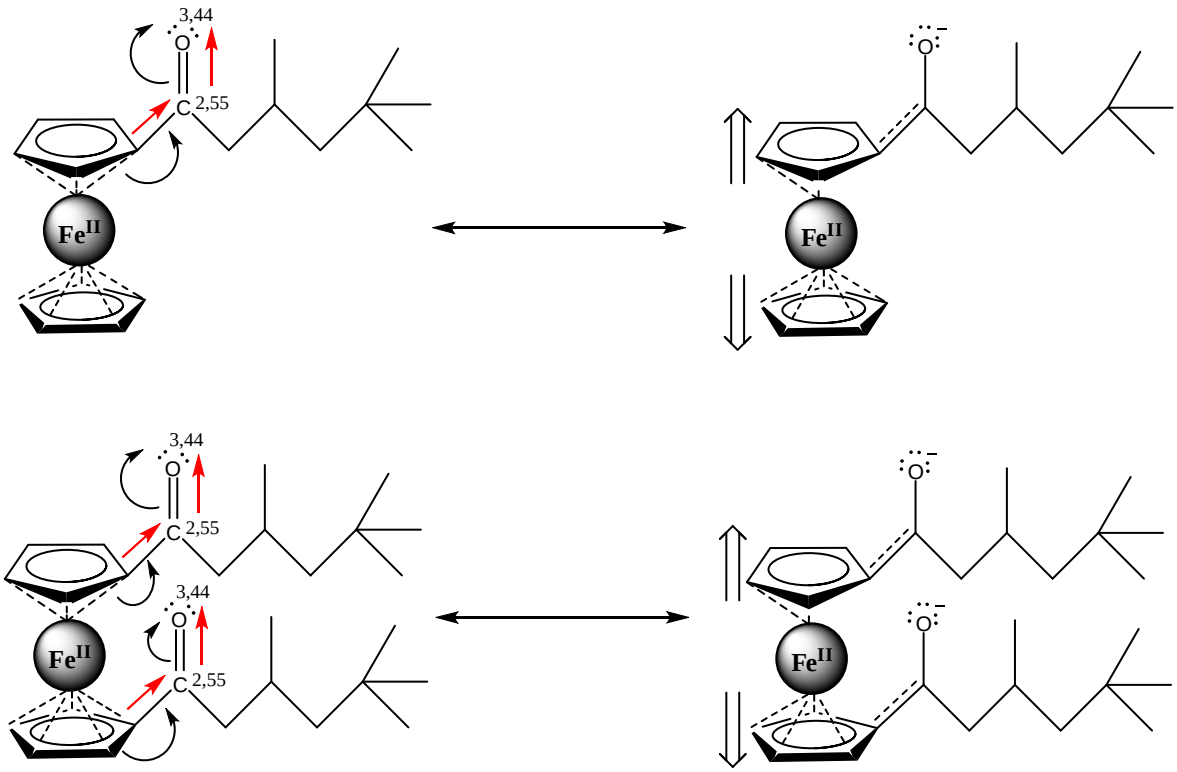
4.6.2 Estudo da estabilidade dos derivados de ferroceno

Os derivados de ferroceno (Fc) representam um grupo interessante de drogas com propriedades antitumorais potenciais. Um esforço substancial é feito a fim de encontrar uma alternativa para a cisplatina e seus derivados, os fármacos anticancerígenos mais amplamente utilizado hoje em quimioterapia, devido aos seus efeitos secundários graves e o aumento do número de tumores resistentes à cisplatina[296].

Derivados de ferroceno, compostos com dois ligantes de ciclopentadienilo complexados com um átomo de ferro, representam um grupo promissor de candidatos a fármacos anticancerígenos, que mostram boa lipofilicidade (facilitando o transporte de membrana) e uma enorme variedade de possíveis derivados. Esses derivados estavam entre os primeiros compostos organometálicos com propriedades antiproliferativa[297,298]. Numerosos derivados do ferroceno foram explorados como potenciais fármacos antitumorais, incluindo sais de ferroceno[296], ferrocifens (ferroceno acoplado com tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio em células de câncer de mama aprovado pelo FDA)[243], conjugados de ferroceno com intercaladores de DNA, etc[299]. Ferroquina, um análogo da cloroquina contendo ferroceno, foi até estudos de fase II de ensaios clínicos como um antimalárico[300]. No entanto, para o nosso conhecimento não há nenhum derivado de ferroceno atualmente aprovado como um agente quimioterapêutico para o tratamento do câncer, provavelmente devido à sua fraca solubilidade e à instabilidade hidrolítica sob condições fisiológicas. Derivados de ferroceno como são o TMH-Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno, usados como carregadores de ferro em ratos, podem mimetizar sistemas vivos de hemacoromatose[205,244], apresentam alta disponibilidade de ferro frente à transferrina e calceína em meio mimético de soro sanguíneo, além de ferro com capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil[183], podendo ser usado como fármaco para repor ferro em sistemas localizados, aproveitando as propriedades lipossolúveis que apresentam[154]. Por outro lado, a última década testemunhou interesse de pesquisa renovado em compostos organometálicos anticancerígenos[301,302]. Com tantos derivados do ferroceno possíveis disponíveis, seria útil ter em mãos uma ferramenta rápida e simples para analisar seu efeito sobre as células cancerosas, especialmente a absorção dos compostos pelas células, concentração de compostos que penetram nas células, sua localização aproximada (o que poderia ajudar a elucidar o possível mecanismo de ação).

Assim, parâmetros como capacidade de gerar estresse oxidativo (mostrado mais adiante) e estabilidade frente a quelantes de ferro de diferentes naturezas deveria ser parte dos testes de aprovação, para ser introduzido como novo fármaco comercial. Além disso, o acompanhamento do seu destino no meio ambiente quanto estes candidatos a fármacos comerciais são descartados em sua forma ativa também seria importante.

Os derivados de ferroceno, candidatos a possíveis fármacos comerciais, apresentaram menos estabilidade frente a modelos de quelantes de alta afinidade por ferro no tampão HBS (pH 7,4). A estequiometria de ligação das sondas (ligante: ferro) é de 1:1 (calceína) ou 1:2 (Fl-Tf), por conseguinte 2 μM de cada sonda pode detectar até 2 μM com calceína ou 4 μM com Fl-Tf de ferro quelável (**Tabela 4.13 e 4.14**). Na maior concentração de ferro (2 μM), sais de ferro são virtualmente completamente quelados, como esperado. O metaloceno original é muito estável, no entanto ambos os seus derivados de TMH mostram ~ 40-50% de decomposição contra as sondas (**Figuras 4.32 e 4.33**). Já em concentrações maiores (20-80 μM), o ferroceno ainda mantém a sua estabilidade, por outro lado os seus derivados conseguem até saturar as diferentes sondas (**Tabela 4.16 e 4.17**). Nestes compostos, a desativação das ligações organometálicas pelos grupos carbonila do radical 3,5,5-trimetilhexanoíla explica a sua relativa falta de estabilidade e liberação do metal no sanduíche de ciclopentadienilo (**Esquema 4.4**)[202]. Esta diminuição da estabilidade dos derivados TMH concorda com os dados de espectrometria de infravermelho, onde ambos TMH-Fc e $(TMH)_2$-Fc exibem uma faixa que se estende de Fe-C_5 em 482 cm^{-1}, enquanto que na Fc desta banda ocorre a 460 cm^{-1}, indicando uma ligação enfraquecida nos derivados TMH. Estes experimentos foram repetidos para concentrações de Fc mais elevadas (até 80 μM), e a tendência relativa de estabilidade não foi alterada (**Figura 4.34 e 4.35**). Por outro lado, os derivados de Fc não apresentaram nenhuma quantidade detectável de ferro lábil na água do mar artificial (pH 8,3) e meio celular marinho (pH 7,8) com qualquer uma das sondas para o Fe (dados não mostrados).



Esquema 4.4: Efeito indutivo e ressonante desfavorável, devido ao grupo C=O do TMH, dos derivados de ferroceno: acima, TMH-Fc e abaixo $(TMH)_2$-Fc[202,303].

Uma vez que a salinidade da água do mar artificial, ou de tampão para *Ucides*, é maior do que a do tampão HBS (~ 0,6 M ou ~0,4 M contra 0,15 M de NaCl, respectivamente), o aumento da quantidade de íons Cl^- pode competir eficientemente com as sondas fluorescentes para a coordenação do metal, e embora o cloreto forme complexos fracos com Fe(III) (log*K* = 1,06 para $[FeCl_2]^+$ [304]), a sua concentração é de 200 a 300 vezes maior, portanto, quaisquer vestígios de ferro liberados das ferrocenos pode não ser acessível para as sondas. A transferrina fluorescente liga mais ferro mesmo na forma de salinidade elevada, já que o metal está acomodado numa dobra da proteína com pouca exposição ao solvente[305] de uma forma cineticamente inerte.

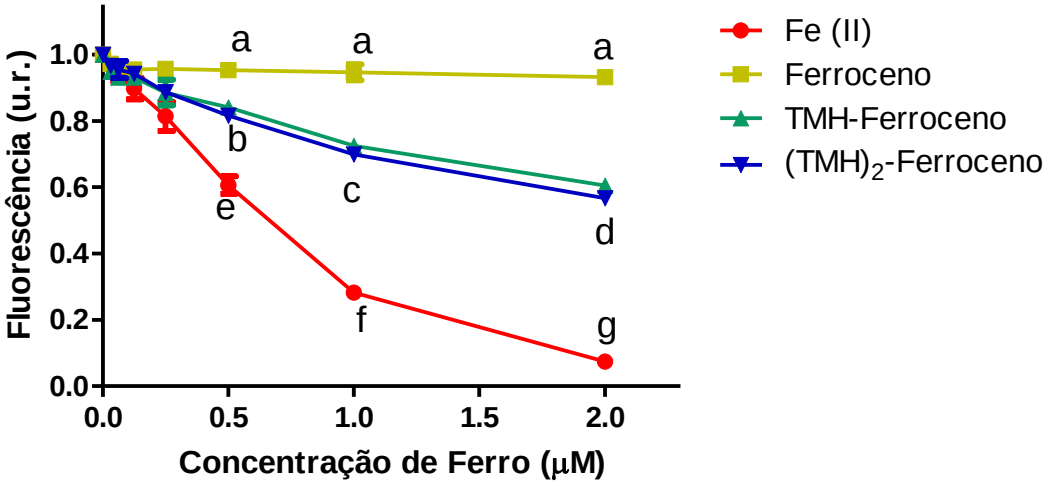


Figura 4.32: Estabilidade dos derivados de ferroceno (0 → 2 µM) frente à Calceína 2µM. As letras representam a diferença estatística significativa (ANOVA), P < 0,05, n =8.

Tabela 4.14: Concentração de ferro (µM) quelável frente à calceína 2µM, dos derivados de ferroceno.

Conc. (µM)	Fe(II)	Ferroceno	TMH-Ferroceno	$(TMH)_2$-Ferroceno
0,03125	0,03 ± 0,07	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,02
0,0625	0,05 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,05
0,125	0,12 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,08 ± 0,04
0,25	0,24 ± 0,08	0,06 ± 0,03	0,16 ± 0,07	0,16 ± 0,02
0,5	0,50 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,01
1	0,98 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,39 ± 0,01	0,43 ± 0,02
2	1,91 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,94 ± 0,01	1,01 ± 0,04

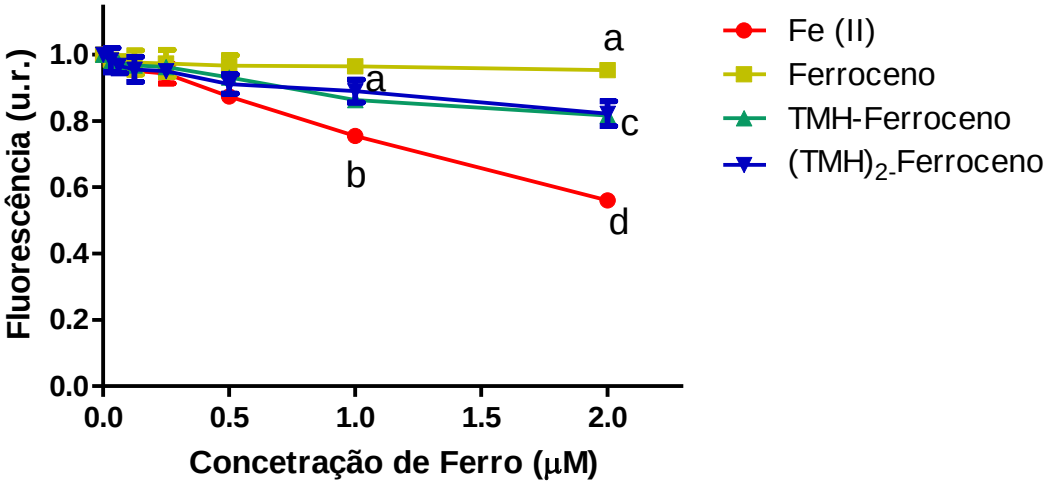


Figura 4.33. Estabilidade dos derivados de ferroceno (0 → 2 µM) frente à transferrina fluorescente 2µM. As letras representam a diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, n =8.

Tabela 4.15: Concentração de ferro (µM) quelável frente à Fl-Tf 2µM, dos derivados de ferroceno.

Conc. nominal de Fe (µM)	Fe(II)	Ferroceno	TMH-Ferroceno	$(TMH)_2$-Ferroceno
0,03125	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,03 ± 0,08	0,00 ± 0,02
0,0625	0,07 ± 0,05	0,02 ± 0,08	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,05
0,125	0,15 ± 0,04	0,04 ± 0,17	0,08 ± 0,10	0,13 ± 0,04
0,25	0,20 ± 0,14	0,05 ± 0,19	0,10 ± 0,07	0,16 ± 0,02
0,5	0,51 ± 0,10	0,08 ± 0,15	0,24 ± 0,03	0,34 ± 0,01
1	1,00 ± 0,10	0,09 ± 0,09	0,56 ± 0,06	0,44 ± 0,02
2	1,75 ± 0,10	0,14 ± 0,09	0,78 ± 0,09	0,75 ± 0,04

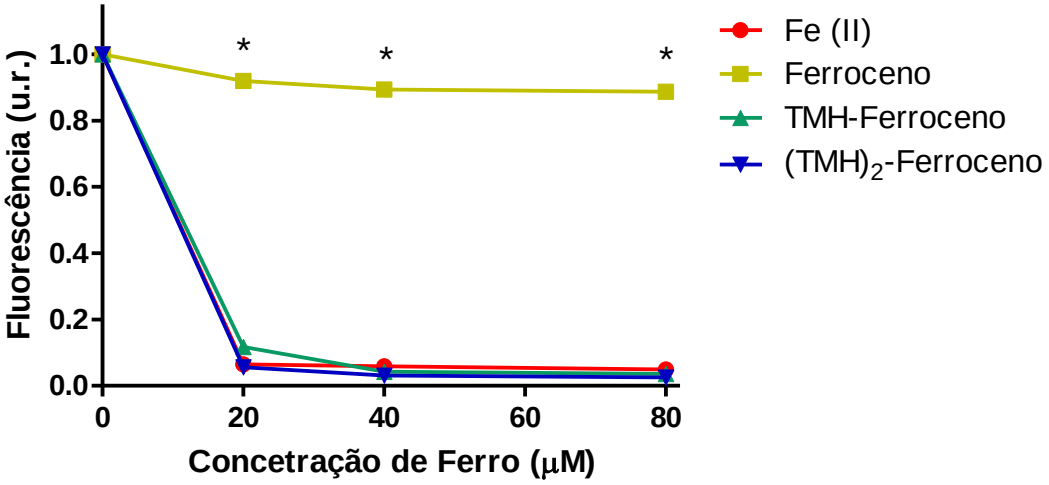


Figura 4.34. Estabilidade dos derivados de ferroceno (0 → 80 µM) frente à calceína 2 µM em tampão HBS. Os asteriscos representam a diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, n =8.

Tabela 4.16: Concentração de ferro (µM) quelável frente à calceína 2 µM, em HBS, dos derivados de ferroceno.

Conc. de ferro total (µM)	Fe(II)	Ferroceno	TMH-Ferroceno	$(TMH)_2$-Ferroceno
20	2,00 ± 0,11	0,11 ± 0,01	1,98 ± 0,02	2,00 ± 0,01
40	2,00 ± 0,01	0,17 ± 0,01	2,00 ± 0,01	2,00 ± 0,01
80	2,00 ± 0,01	0,18 ± 0,05	2,00 ± 0,15	2,00 ± 0,15

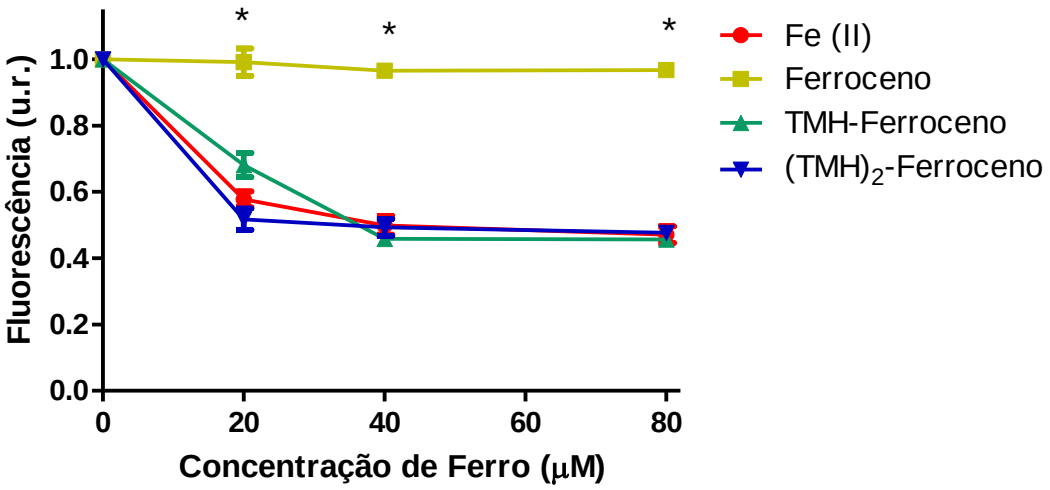


Figura 4.35: Estabilidade dos derivados de ferroceno (0 → 80 µM) frente à Fl-Tf 2 µM em tampão HBS. Os asteriscos representam a diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, n =8.

Tabela 4.17: Concentração de ferro (µM) quelável frente à Fl-Tf 2µM, em HBS, dos derivados de ferroceno.

Conc de ferro total (µM)	Fe(II)	Ferroceno	TMH-Ferroceno	$(TMH)_2$-Ferroceno
20	1,90 ± 0,11	0,03 ± 0,02	1,41 ± 0,19	2,0 ± 0,15
40	2,0 ± 0,15	0,09 ± 0,03	2,0 ± 0,15	2,0 ± 0,15
80	2,0 ± 0,15	0,08 ± 0,04	2,0 ± 0,15	2,0 ± 0,15

4.6.3 Estudo da estabilidade das nanopartículas de magnetita

As nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) têm sido amplamente estudadas nos últimos anos, devido às suas propriedades magnéticas, químicas e ópticas [306–309]. Muitos métodos para sua síntese tem sido pesquisados. Um deles, eficaz para produzir nanopartículas monodispersas com tamanhos controláveis, é a decomposição térmica de precursores em solventes orgânicos a temperaturas elevadas[203,310]. Neste trabalho, as nanopartículas foram estabilizadas por revestimentos hidrofóbicos de ácido oleico, e suspendidas em meio aquoso a través do revestimento hidrofílico com Tween 80.

Em aplicações biomédicas, as nanopartículas têm que ser hidrofílicas e ter uma estabilidade adequada em meio biológico. Para aplicações avançadas com nanopartículas, como diagnósticos *in vivo* e terapia , é necessária a minimização da absorção pelo sistema reticuloendotelial (RES) para aumentar o tempo de circulação da nanopartícula no sangue, acarretando elevado potencial diagnóstico e eficiência terapêutica[311]. Além disso, a superfície da nanopartícula deve possuir grupos funcionais para conjugação de ligantes de direcionamento ou agentes terapêuticos. Estratégias de modificação para o revestimento de nanopartículas hidrofóbicas com polímeros hidrofílicos incluem troca de ligantes[312], encapsulamento de micelas[313], e ligação covalente[314,315]. Particularmente, o Tween 80 têm sido o foco nesta pesquisa como material de revestimento eficaz para as nanopartículas[316–318], devido à sua capacidade de resistir à incrustação de proteínas e proporcionar impedimento estérico e assim prevenir a agregação das nanopartículas [275,319,320]. Apesar dos avanços de diferentes métodos de sínteses, o desafio ainda permanece, pois é necessário uma melhora do controle de tamanho, da dispersão e da estabilidade com revestimento polimérico de nanopartículas em meios biológicos relevantes.

Aqui apresentamos um estudo de estabilidade de nanopartículas de tamanhos controlados em dois meios fisiológicos relevantes, de soro sanguíneo e celular marinho, com a preocupação de avaliar um possível impacto no ambiente, assumindo uma liberação indesejada desses materiais como resíduo sólido no ambiente marinho.

Nossos resultados indicam que, independentemente do tamanho, as nanopartículas na faixa de 5-12 nm apresentam grande estabilidade frente a diferentes quelantes fluorescentes (CAL, Fl-Tf e Fl-DFO) em meio fisiológico neutro pH 7,4 e celular marinho pH 7,8 com maior salinidade (**Figura 4.36**). Isto pode ter acontecido devido a que o ferro não é facilmente disponível a partir do núcleo mineral e/ou por baixo da camada exterior de ácido oleico.

A magnetita é um ferrimagneto com uma estrutura de espinélio cúbico invertido, com uma fórmula química muitas vezes descrita como $[8Fe^{3+}]_A[8Fe^{3+}, 8Fe^{2+}]_BO_{32}$. Esta fórmula indica que os locais tetraédricos denotados por A são ocupados por íons férricos, enquanto locais octaédricos denotados por B contém um número igual de íons férrico e ferroso, porém frequentemente este óxido apresenta uma estrutura não estequiométrica[321]. Aquela estrutura complexa revestida com ácido oleico, entra em competição

com as diferentes sondas. No meio marinho de células, o aumento de salinidade pode atenuar a ligação de sonda pelo ferro, por competição com os íons cloreto, adotando um ambiente inerte de ligação[183].

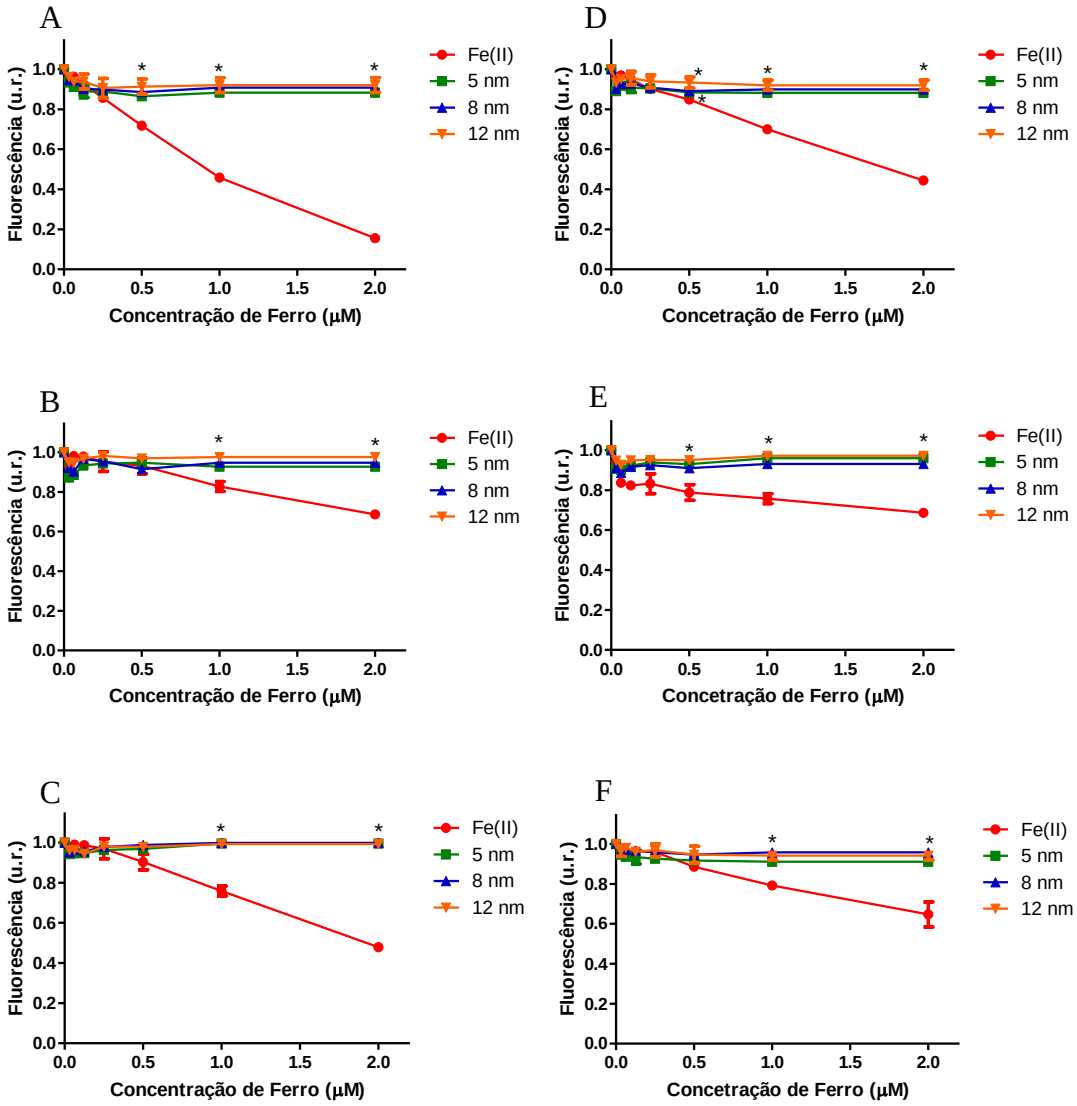


Figura 4.36: Estabilidade das NPs, em meio tamponado de HBS pH 7,4 e 25°C frente a (A) calceína, (B) Fl-Tf e (C) Fl-DFO, e em meio *Ucides* pH 7,8 e 25°C frente a (D) calceína, (E) Fl-Tf e (F) Fl-DFO. Os asteriscos representam a diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, n =4.

4.7 Estudo da capacidade de geração de ferro lábil dos compostos de ferro

Em fluidos biológicos, formas lábeis de ferro podem participar no ciclo de auto-oxidação de ligantes endógenos, tais como o ascorbato, o que leva ao desenvolvimento de uma variedade de espécies de oxigênio reativas, indicando que, mesmo "antioxidantes" podem se comportar como pró-oxidantes, dependendo sua proporção em relação com íons metálicos redox-ativos. A formação destas espécies reativas é convenientemente medida como a taxa de conversão da sonda dihidrorodamina (não fluorescente) à sua forma oxidada rodamina (fluorescente)[213]. De acordo com os ensaios de estabilidade a pH 7,4, verificou-se que os metalofármacos de ferro revestidos com polímero de uso comercial não apresentavam sinais mensuráveis de ferro redox-ativo (os valores foram inferiores ao limite de detecção de 0,4 µM[213]). Em condições marinhas os fármacos comerciais mostraram semelhante resultados de atividade redox. Estudos anteriores de fato mostram que apenas 0,8% do total de ferro em formulações semelhantes é redox-ativo[152]. O ferro dos derivados de Fc, foram capazes de gerar EROs, através da auto-oxidação do ascorbato em meio tamponado de HBS (pH 7,4), sendo o Fc menos ativo que os seus derivados TMH **(Tabela 4.18).**

Tabela 4.18: Concentrações e porcentagem do ferro redox nos compostos de ferroceno, em HBS (pH 7,4), concentrações de 40 µM de ferro total (média ± desvio padrão).

Composto de ferro	Ferro redox (µM)	Ferro redox (%)
Ferroceno	1,20 ± 0,17	3,0
TMH-Ferroceno	3,80 ± 0,17	9,5
$(TMH)_2$-Ferroceno	3,26 ± 0,15	8,2

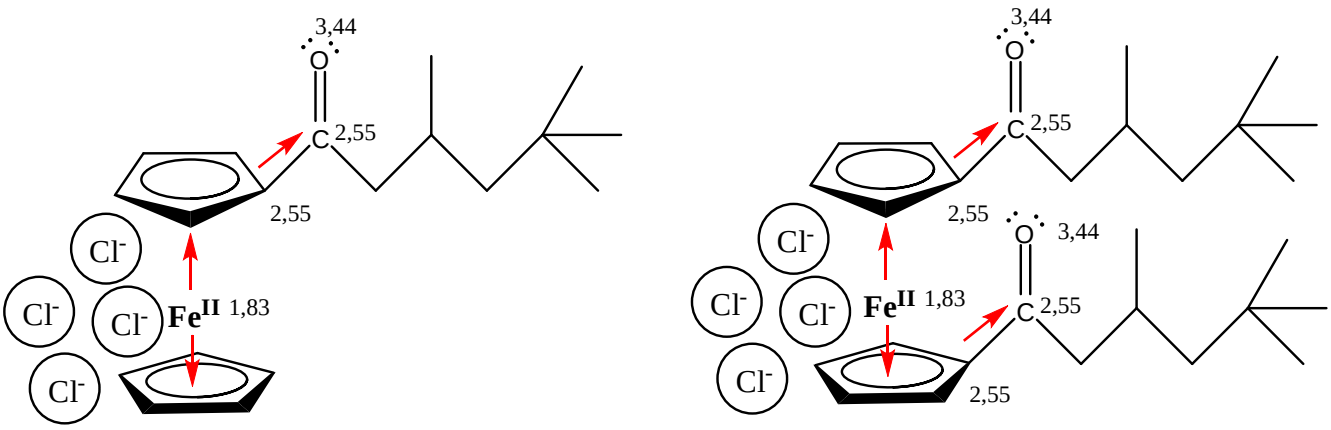
Os resultados obtidos estão de acordo com a elevada quantidade de ferro lábil disponível a partir da dissociação dos derivados TMH (**Figura 4.34 e 4.35**). O Fe(II) do Fc pode se oxidar com maior facilidade a Fe(III)[322]. Os grupos C=O dos TMHs podem reduzir a densidade eletrônica, por efeito indutivo (**Esquema 4.5**), enfraquecendo a ligação Fe(II)-ciclopentadienilo e diminuindo o potencial de redução [303], deste modo o Fe(II) estará mais propenso a ser oxidado para Fe(III) e assim reagir com maior eficiên-

cia com o ascorbato (presente no método de determinação de ferro lábil) produzindo maior quantidade de EROs .

Mas em meio marinho a atividade redox dos compostos de ferroceno se vê afetada pela salinidade e/ou pH (**Tabela 4.19**). Isso se deve possivelmente ao fato de que a salinidade acelera o processo de transferência eletrônica, ou que os íons cloreto em excesso compitam com o ligante ciclopentadienilo e desestabilizem ainda mais os organometálicos[183].

Tabela 4.19: Concentrações e porcentagem do ferro redox nos compostos de ferroceno, em meio marinho, para concentrações de 40 µM de ferro total (média ± desvio padrão).

Composto de ferro	Ferro redox (µM)	Ferro redox (%)
Ferroceno	5,53 ± 0,38	13,8
TMH-Ferroceno	16,10 ± 0,97	40,3
(TMH)$_2$-Ferroceno	34,14 ± 0,74	85,4



Esquema 4.5: O grupo carbonila do TMH retira densidade de carga do anel Cp, aumentando a capacidade de oxidação do Fc.

Os complexos organometálicos baseados em íons essenciais com atividade redox, são em geral relativamente estáveis, mas podem causar estresse oxidativo. Depen-

dendo do estudo biológico desejado, o controle desta propriedade pode ser ajustado a fim de desenvolver novos derivados de Fc com potencial atividade biológica[323].

A magnetita Fe_3O_4 (Fe^{2+}, Fe^{3+}) pode ser oxidada para formar a maghemita (γ-Fe_3O_4) (Fe^{3+}, Fe^{3+}), ou seja, a totalidade do Fe(II) da magnetita pode ser oxidada[324]. A transferência eletrônica pode promover a formação de EROs a partir do íon ascorbato[325], oxidando a DHR para a rodamina fluorescente (e detectável). A atividade redox das nanopartículas não teve mudança significativa com o aumento da salinidade e pH (tampão HBS, pH 7,4 e *Ucides*, pH 7,8). Por outro lado, o tamanho da nanopartícula, teve um efeito significativo na atividade redox, com as NP de 5 nm apresentando maior atividade em relação às NP maiores (**Tabela 4.20**). O incremento de área superficial está relacionado com a diminuição do tamanho de partícula[270], sendo assim, a principal causa da maior interação com os íons ascorbato e consequente formação de EROs.

As nanopartículas de magnetita são estruturas muito estáveis, e graças às propriedades magnéticas, tem aplicações no âmbito clínico como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética[326] ou em tratamentos para produzir morte de células cancerosas por hipertermia[327]. Não obstante, a atividade redox em sistemas biológicos pode ser um fator pouco favorável para essas aplicações[325].

Tabela 4.20: Concentrações e porcentagem do ferro redox nas NP-ácido oleico-Tween 80, em diferentes meios, para concentrações de 40 µM de ferro total (media ± desvio padrão). (n = 8 e $^{(a)(b)(c)}P<0,05$)

NPs	**Ferro Redox (µM)**			
Fe_3O_4	**HBS**	**%**	**Ucides**	**%**
5 nm	$7,16 \pm 0,39^{(a)}$	17,9	$6,66 \pm 0,23^{(a)}$	16,7
8 nm	$6,15 \pm 0,56^{(b)}$	15,4	$5,71 \pm 0,48^{(b)}$	14,3
12 nm	$5,77 \pm 0,36^{(b)}$	14,4	$5,63 \pm 0,15^{(b)}$	14,1

4.8 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina* para os metalofármacos comerciais e derivados de ferroceno.

4.8.1 Toxicidade em artêmias adultas

Neste teste se determinou a mortalidade em concentrações de finais de ferro de 0, 10, 100 e 1000 µM, em frascos de 40 mL com um volume de 10mL, tendo como controle (mortalidade zero) diferentes meios (água, HBS, Tween 80). O controle de Fe(II) (FAS) apresentou 40% de letalidade apenas a 1000 µM (**Figura 4.37)**.

Para os fármacos comerciais se obteve 10% de mortalidade para 10, 100 e 1000 µM de concentração. Resultados similares foram obtidos para os compostos mono- e dissubstituídos de ferroceno, mas para o ferroceno se obteve uma letalidade de 40% (10 µM), 90% (100 µM) e 100% (1000 µM).

A determinação dos mecanismos de toxicidade em artêmias adultas é complicada devido à complexidade do crustáceo que, conforme passam as horas, mudam de carapaça, alterando assim as condições do experimento[328].

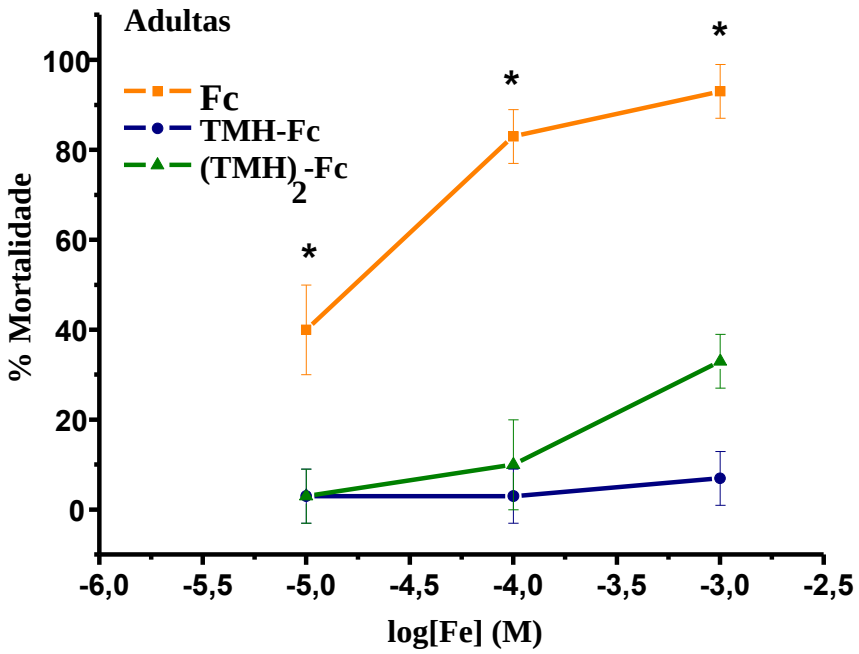


Figura 4.37: Curva dose-resposta para artêmias adultas tratadas com derivados de ferroceno, para n =4, com diferenças estatísticas (*, P <0,05).

4.8.2 Toxicidades em artêmias de primeiro estágio

O ensaio de toxicidade em artêmias de primeiro estágio é mais homogêneo devido ao baixo grau de desenvolvimento que os animais apresentam, tendo formados apenas os olhos e brânquias[328]. Os testes com o Fe(II) foram omitidos dado que em meio salino com pH 8,3 esse sal precipita imediatamente em forma de hidróxido de ferro(III) (sólido marrom). Os fármacos comerciais não apresentaram letalidade em diferentes concentrações na faixa de concentrações até 300 µM. Para os compostos Ferroceno e $(TMH)_2$-Ferroceno, concentrações até 200 µM não suscitaram letalidade, e apenas ~ 2,5% de letalidade a partir de 200 µM, resultado que se repete até a concentração de 300 µM com pouca reprodutibilidade. Já o composto TMH-Ferroceno apresenta um perfil de toxicidade como se mostra na **Figura 4.38**.

A partir desses dados, calculou-se a LC50 do composto TMH-Fc com o software Origin® versão 8.0 (**Figura 4.38**), obtendo-se o valor de 76,7 ±1,8 µM.

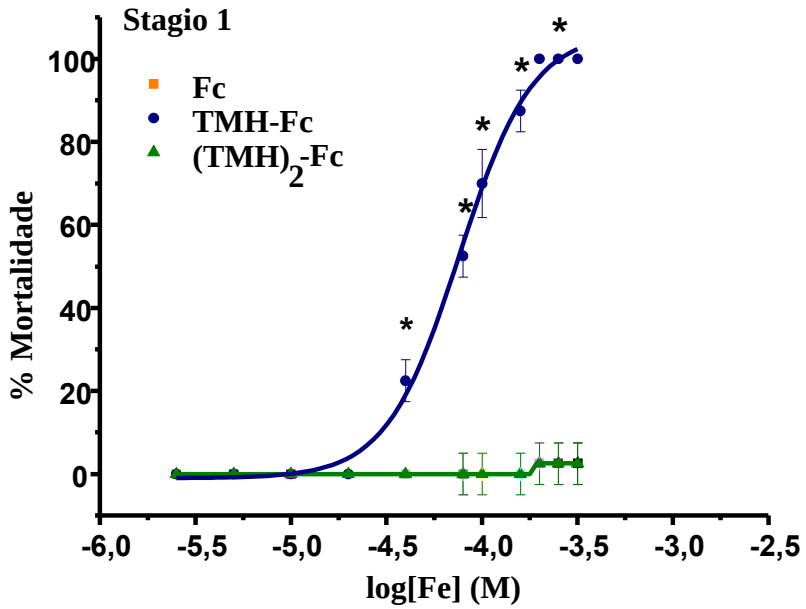


Figura 4.38: Curva dose-resposta para artêmias em estágio 1 tratadas com derivados de ferroceno, com LC50 = (76,7 ± 1,8) µM, para n =4, com diferenças estatísticas (*, P <0,05).

4.8.3 Lipoperoxidação em *Artemia salina*

Estudos anteriores da absorção do TMH-Ferroceno mostram a retenção deste composto em ratos até 47,8% para uma dose de 5 mg por dia durante 7-10 dias, sendo que os outros dois compostos apresentam retenções menores ($(TMH)_2$-Ferroceno: 6,33%; ferroceno: 27,4%), devido a que o TMH-ferroceno não é metabolizado na mucosa intestinal mas sim no fígado, independentemente da rota de absorção (oral e intravenosa)[205].

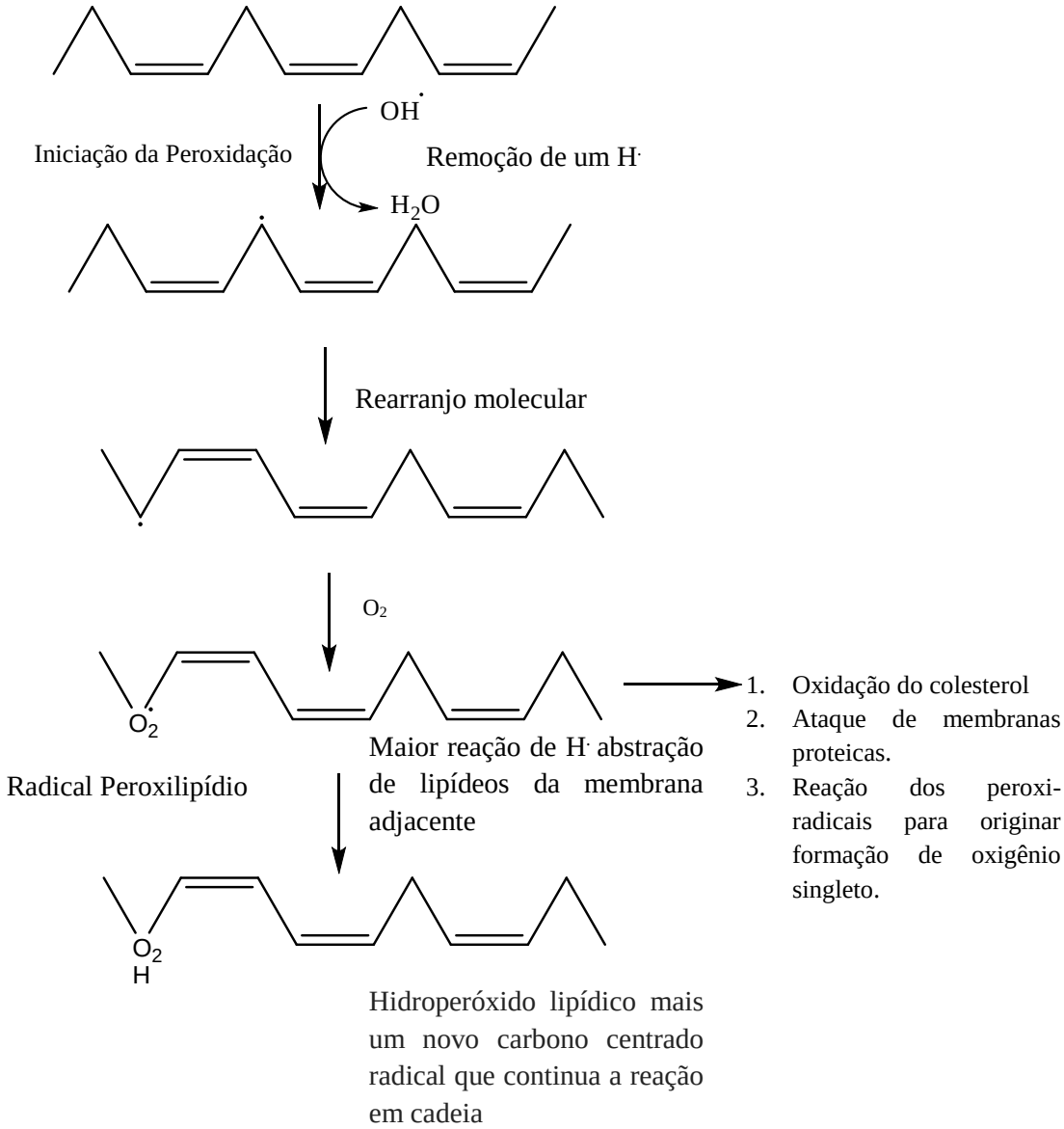
Em artêmias, é factível avaliar o efeito da absorção do TMH-ferroceno sobre indicadores de estresse oxidativo como a peroxidação lipídica causada pelo ferro (**Esquema 4.6**).

$$RFe(II) + O_2 \rightleftharpoons (RFe(II)\text{---}O_2 \longleftrightarrow RFe(III)\text{---}O_2^{\bar{\cdot}}\ ) \rightleftharpoons RFe(III) + O_2^{\bar{\cdot}}$$

$$O_2^{\bar{\cdot}} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

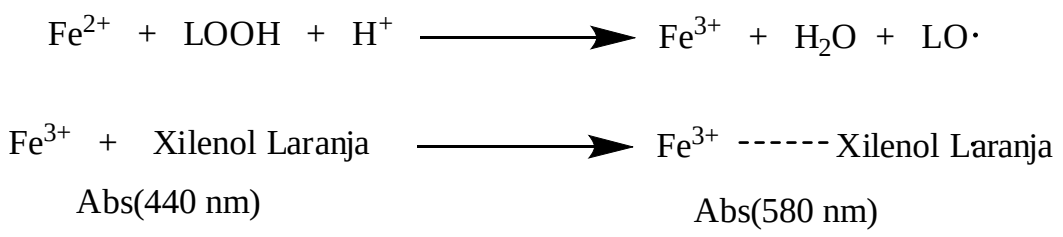
$$RFe\ (II) + H_2O_2 \longrightarrow RFe(III) + OH^- + OH^{\cdot}$$

R= $Cp_2(TMH)$



Esquema 4.6: Mecanismo de lipoperoxidação no tecido epitelial de *Artemia salina* frente aos TMH derivados[54].

A metodologia de quantificação dos peroxilipídeos (LOOH) está baseada na oxidação de Fe(II) por LOOH em meio ácido em presença de laranja de xilenol (**Esquema 4.7**). A reação é usada para medidas de lipídeos peroxidados de amostras homogêneas. Esta metodologia é uma modificação do métodos já descritos[222,329].



Esquema 4.7: Reação de complexação do Fe(III) com Xilenol, a partir da oxidação do Fe(II) e lipídeo peroxidado[221].

Antes de iniciar o experimento com os homogenatos de artêmias, tivemos o interesse em determinar possíveis artefatos no método causado pelos íons Fe(II). Mediu-se a absorbância a 580 nm de um branco contendo apenas xilenol e Fe(II) em médio ácido. Os resultados de absorção foram muito baixos ($0,100 < A < 0,109$), mesmo após 60 minutos de incubação. Ou seja, Fe(II) não forma complexo colorido com xilenol, nem o meio ácido isoladamente e o xilenol provocam a oxidação do Fe(II). Apenas na presença do homogenato (e, portanto, de LOOH), ocorrerá a oxidação do ferro(II) e a formação do complexo colorido com xilenol.

Os resultados de lipoperoxidação, expressos em equivalentes de CHP por grama de tecido, são apresentados na **Figura 4.39**. Observou-se que apenas as artêmias tratadas com 80 µM de TMH-Fc apresentaram um sinal diferente dos controles (3,5 Eq-CHP), o que poderia mostrar a maior absorção e retenção do TMH-Fc seguido por reações de peroxidação lipídica catalisada pelo excesso de ferro dentro do crustáceo. Interessantemente, essa concentração que induz o maior resultado de lipoperoxidação é muito próxima da LC50 obtida anteriormente (77 µM; **Figura 4.38**). Os resultados para o ferroceno e $(TMH)_2$-ferroceno não são significativos em relação ao controle sem adição de ferro.

Para concentrações onde a letalidade foi 0 % e 100 %, não se detectou sinal de absorbância a 580 nm. Já com o aumento da concentração do TMH-Ferroceno de 20 a 80 µM se observou um incremento na oxidação lipídica.

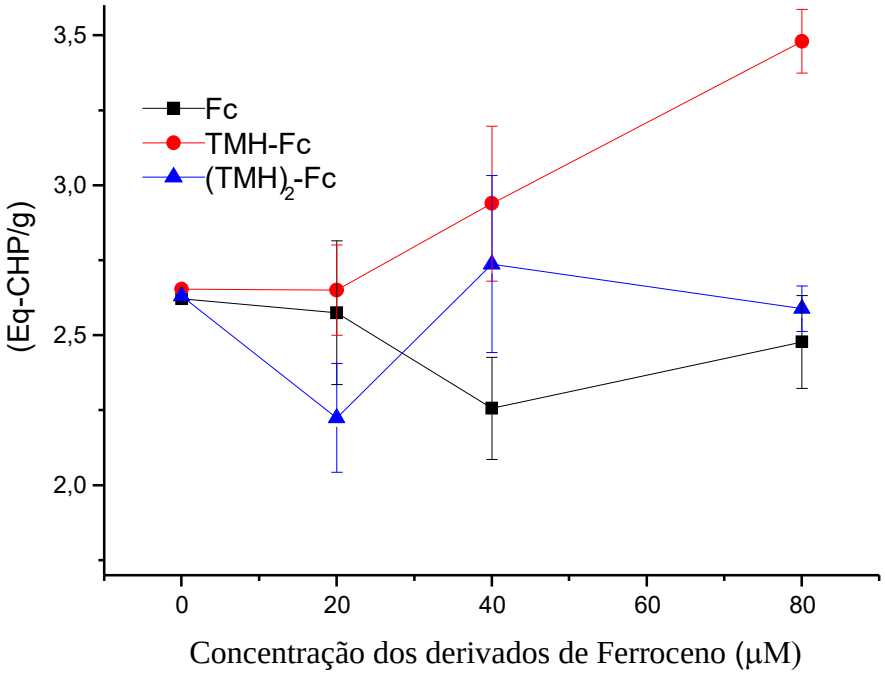


Figura 4.39: Lipoperoxidação (valores em equivalente de CHP por grama de *A. Salina*) depois do tratamento com os derivados de Fc.

Os resultados obtidos anteriormente também foram discutidos e publicados num artigo cientifico: Vitorino, H. A. ; Mantovanelli, L. ; Zanotto, F. P. ; Espósito, B. P. Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. Plos One, v. 10, p. e0121997, 2015 (**Anexo 9.7**).

4.9 Estudo de viabilidade, transporte e quantificação de ferro intracelular em células de hepatopâncreas de caranguejos *Ucides cordatus* frente aos compostos de ferro.

O caranguejo-uça que vive nos manguezais de cidades litorâneas do Estado de São Paulo, se encontram em áreas preservadas (Estação ecológica Juréia-Itatins) e é frequentemente usado como biomodelo de toxicidade aquática[330]. Pesquisas recentes mostram que esta espécie pode monitorar diferentes concentrações de conteúdo metálico de cobre, cádmio, cromo, chumbo e mercúrio. A genotoxicidade induzida por metais pesados, devido à contaminação industrial, presente no litoral de Santos, na municipali-

dade de Cubatão, também já foi relatada para essa espécie [330]. Outras pesquisas mostraram a importância das células epiteliais de hepatopâncreas para monitorar o conteúdo íons de metais essenciais como zinco[331], ferro[332], cobre[38] e metais pesados como cádmio[214]. Nesta seção avaliamos o conteúdo de ferro transportado em células epiteliais de hepatopâncreas com diferente desenvolvimento, frente a compostos de ferro com diferente perfil químico.

O ferro intracelular em cada tipo de célula de hepatopâncreas de caranguejo foi quantificado usando uma curva de calibração com padrões de calceína de concentração conhecida nas mesmas condições de trabalho dos compostos de ferro que foram tratados. A supressão da fluorescência da calceína obedece a uma proporção estequiométrica (1:1) com ferro[91], portanto uma diferença de fluorescência dessa sonda pode ser diretamente relacionada a uma concentração de ferro[183].

4.9.1 Transporte de ferro a partir dos fármacos comerciais

A **Figura 4.41** mostra as curvas cinéticas de transporte do ferro para os diferentes tipos de células (E, R, F e B) tratadas com os metalofármacos comerciais (**Tabela 3.1**). Depois de t = 30s se pode observar uma mudança na intensidade de fluorescência e se houve internalização do ferro, através da supressão de fluorescência. Pelo contrário, leituras de fluorescência constantes ou com incremento podem indicar que não ocorre transporte do metal, morte celular ou internalização do ferro em organelas afins ao metal antes de entrar em contato com a calceína.

Na **Tabela 4.21**, estão apresentados os resultados de concentração de ferro para cada tipo de célula. A robustez do teste foi assegurada, verificando-se a elevada viabilidade (70-95%) que apresentam as células de hepatopâncreas frente aos fármacos comerciais de ferro com concentrações próximas a 1 mM (**Figura 4.40**).

Tabela 4.21: Concentração de ferro intracelular (µM) a partir dos fármacos comerciais em células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus* para os diferentes tipos celulares E, R, F e B. Os dados representam a média com o desvio padrão (n = 5). n.d. = não detectável.

Composto de ferro	E	R	F	B
Fe(II)	2,31 ± 0,08	1,80 ± 0,08	1,73 ± 0,16	1,72 ± 0,03
F 1: Glucoheptonato	0,36 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,06
F 2: dextrano	0,33 ± 0,08	0,27 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,06
F 3:dextrano	0,34 ± 0,05	0,30 ± 0,08	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,05
F 4:dextrano	0,33 ± 0,09	0,29 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,34 ± 0,02
F 5:dextrano	0,30 ± 0,08	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,06	0,31 ± 0,06
F 6:dextrano	0,33 ± 0,07	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,05	0,33 ± 0,06
F 7:glicinato	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,06	0,19 ± 0,04
F 8:polimaltosa	0,27 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,25 ± 0,05	0,21 ± 0,09

Os fármacos comerciais avaliados seguem uma tendência de ordem segundo a quantidade de ferro transportada, através dos tipos de células de hepatopâncreas (**Figura 4.42)**:

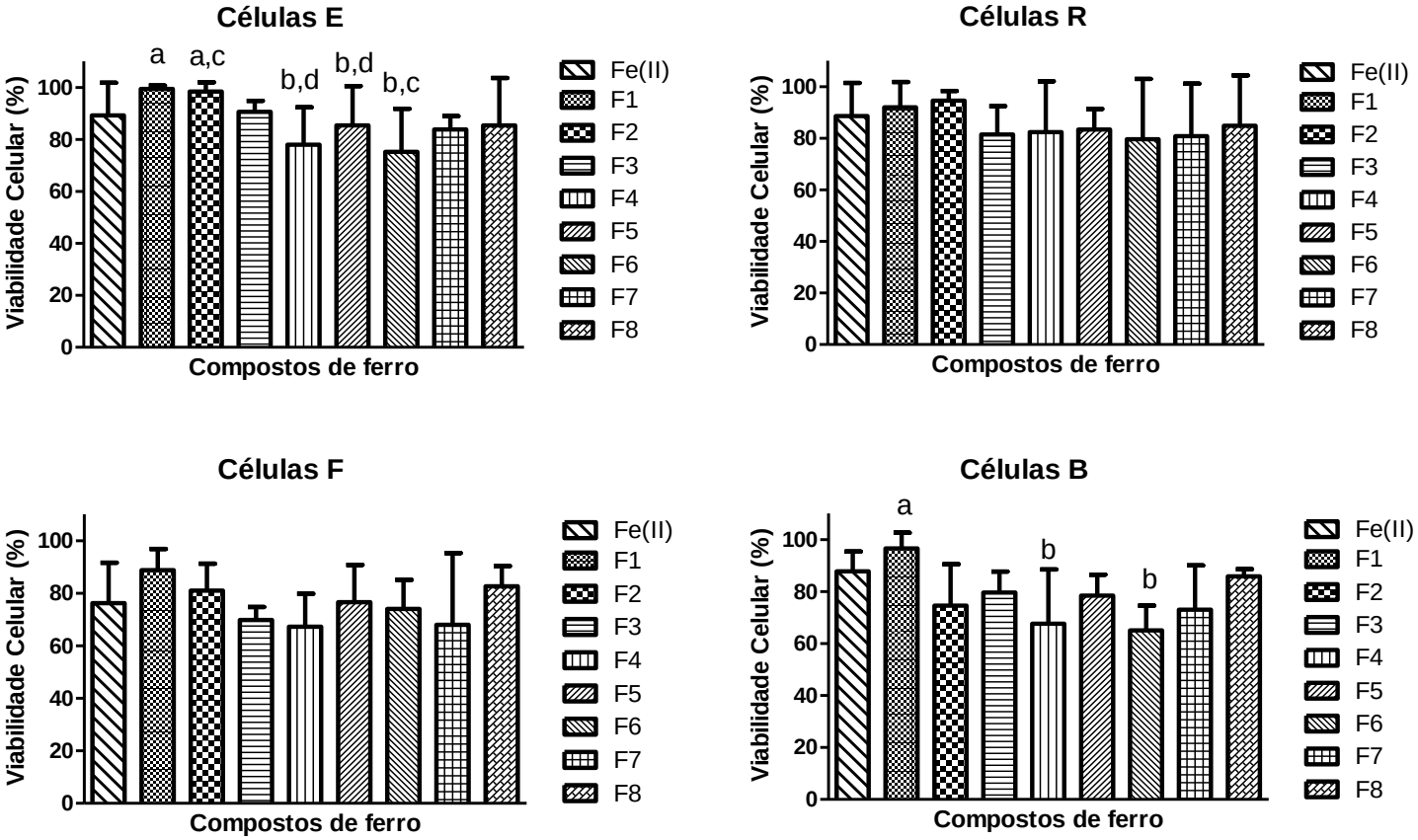


Figura 4.40: Viabilidade dos tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B) do caranguejo *Ucides cordatus*, durante 3 h de exposição. A concentração usada dos compostos de ferro foi de 833 μM, onde as letras representam diferença estatística significativa (ANOVA), $P<0.05$, $n = 5$.

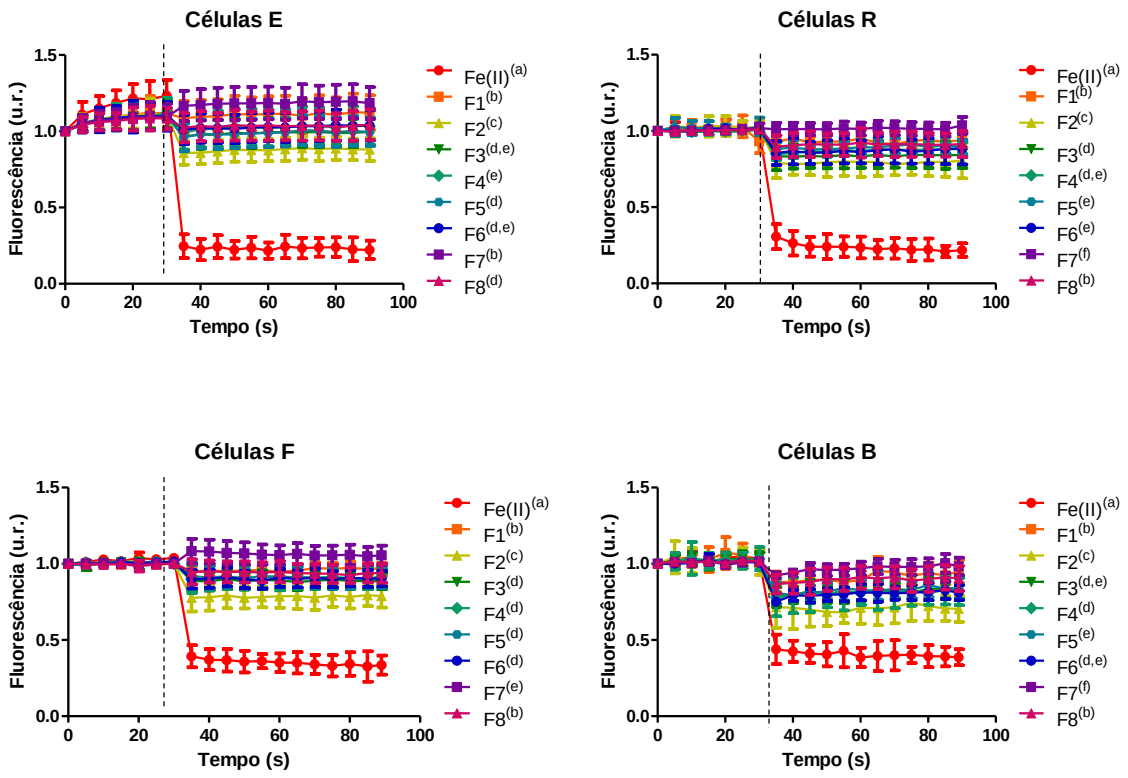


Figura 4.41: Perfis de supressão de fluorescência, devido ao transporte de ferro a partir dos metalofármacos comerciais para células do hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus*. A linha pontilhada a 30 s representa o momento da adição dos compostos de ferro (833 µM de concentração final). Letras diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, $n = 5$.

Em todas as células, observa-se que a máxima absorção de ferro ocorreu para o íon Fe(II), em níveis ao redor de 2 µM com tendência a maior absorção pelas células embrionárias (E). Em meio biológico de células de hepatopâncreas, a absorção de ferro pode ser organizada em três grandes grupos:

a) [Fe] < 0,2 µM: Ferro glicinato
b) 0,2 < [Fe] < 0,3 µM: Ferro polimaltose
c) [Fe] ≥0,3 µM: Ferro dextrano, Ferro glucoheptonato

Metalofármacos comerciais, sendo espécies onde o ferro está complexado, vão apresentar concentrações de ferro intracelular menores que o ferro lábil. O ferro iônico poderia usar diferentes caminhos e/ou moléculas transportadoras de metais[333,334]. O fer-

ro bivalente apresenta maior tamanho e solubilidade em relação ao ferro trivalente em meio biológico[91], porém ambos possuem menor raio iônico que o íon cálcio[335]. Desse modo, o ferro bivalente poderia utilizar os canais de cálcio durante o seu transporte.

E: Fe(II)> Ferro-glucoheptonato ≥ Ferro-dextrano≥ Ferro-Polimaltose> Ferro-Glicinato.
R: Fe(II)> Ferro-dextrano≥Ferro-glucoheptonato ≥ Ferro-Polimaltose> Ferro-Glicinato.
F: Fe(II)> Ferro-glucoheptonato ≈ Ferro-dextrano≥ Ferro-Polimaltose> Ferro-Glicinato.
B: Fe(II)>Ferro-glucoheptonato ≈ Ferro-dextrano ≥ Ferro-Polimaltose≥ Ferro-Glicinato.

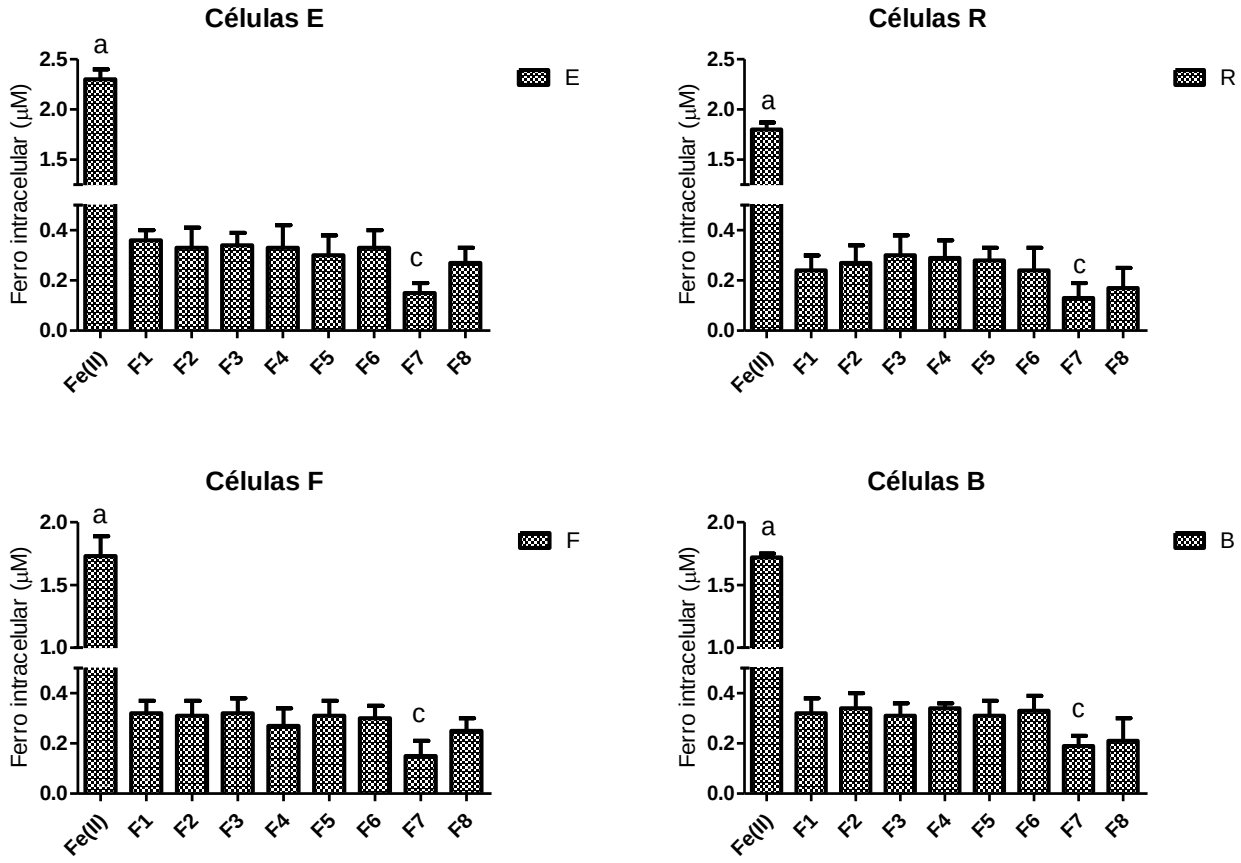


Figura 4.42: Transporte de ferro a partir dos metalofármacos comerciais por tipo celular do hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus*. (ANOVA), [a, c] $P < 0,05$, n = 5.

A quantidade de ferro intracelular nos diferentes tipos de células de hepatopâncreas não guardou uma relação direta com a capacidade quelável do ligante calceína nem transferrina em meio marinho, mas sim com a quantidade do ferro lábil em meio HBS (pH 7,4). Neste meio, o ferro disponível dos metalofármacos, nas concentrações

maiores (como 80 µM), mostra quantidades de ferro semelhantes às transportadas em todos os tipos de células de hepatopâncreas (**Tabela 4.21).** Para os fármacos VI se observa incorporação de 0,24 - 0,36 µM de Fe e disponibilização pela CAL de 0,37 - 0,55 µM. Nos compostos VO, se observa incorporação de 0,15 - 0,27 µM de Fe e disponibilização pela CAL de 0,63 a 0,75 µM.

Têm-se várias prováveis rotas por onde o ferro do fármaco pode ser internalizado na célula e entrar em contato com a calceína, e assim suprimindo-a. Uma delas e a mais provável é a endocitose (**Figura 4.43**), onde o fármaco é absorbido por invaginação da membrana celular e seguidamente pode ser transportado por lisossomos [336–338], onde pode ser desestabilizado por diminuição de pH[339–341] e liberar o ferro para interagir com o detector fluorescente.

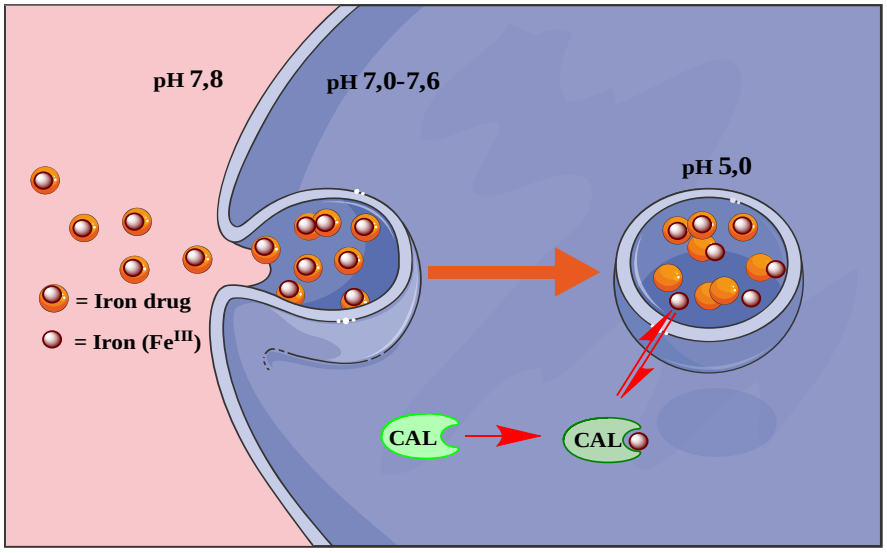


Figura 4.43: Absorção do fármaco de ferro por endocitose, seguida da liberação de ferro para depois suprimir a fluorescência da calceína.

Outra possível rota de internalização e/ou transporte nas células de hepatopâncreas é através do contato com a membrana plasmática, podendo interagir com ferriredutases[332,342], que reduzem o Fe^{3+} para Fe^{2+}, que pode se internalizar através dos transportadores de membrana de cátions divalentes DMT1[23,214,343] (**Figura 4.44)**, ou pelos canais de Zn^{2+} e Ca^{2+} [38,39].

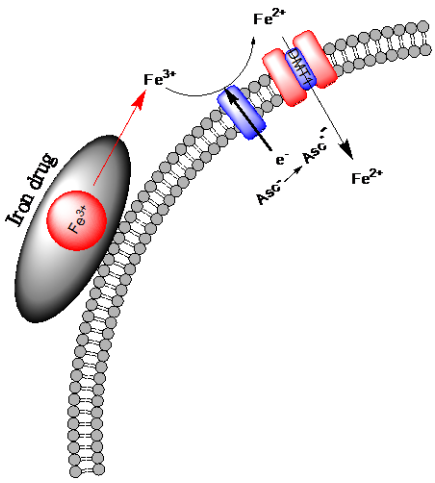


Figura 4.44: Absorção do fármaco de ferro, através da redução do Fe(III) do fármaco para a internalização do Fe(II) pelo transportador de metal divalente (DMT1).

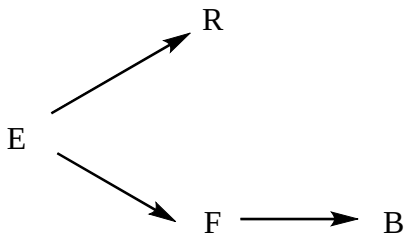
Segundo o tipo celular, a seguinte relação de transporte dos compostos comerciais é observada:

$$\mathbf{E} \geq \mathbf{B} \geq \mathbf{F} > \mathbf{R}$$

O ferro é transportado e/ou armazenado através das células de hepatopâncreas (E, R, F e B) independentemente do tipo de composto.

Da literatura se sabe que existem quatro tipos celulares no hepatopâncreas que foram classificados segundo as funções que desempenham [344] . Células tipo E (embrionárias), precursoras, se originam por mitose na região distal do túbulo do hepatopâncreas e se diferenciam quando migram para a região proximal, contem poucas mitocôndrias e organelas, além de possuir reticulo endoplasmático e aparato de Golgi pequenos. Células tipo R (absortivas), transportadoras, contem gotículas de glicogênio, lipídeos, retículo endoplasmático com mitocôndrias. Células tipo F (fibrilares), transportadoras/armazenadoras, possuem um citoplasma granular e vacúolos supranucleares que se expandem conforme a maturação da célula. Células tipo B (blister ou vesiculares), armazenadoras, contém um único e grande vacúolo enzimático cercado por um fino citoplasma[214,226,344].

Alguns autores[345] estabelecem a procedência de cada tipo celular (E, R, F e B) , de acordo com o seu desenvolvimento dentro do hepatopâncreas, como representado abaixo:



Segundo as funções e/ou desenvolvimento de cada tipo celular, estas podem apresentar diferente quantidade de acúmulo de ferro.

As células tipo **E** são as menos numerosas, possuem organelas típicas de células indiferenciadas, poucos retículos endoplasmáticos lisos e rugosos, pequenas mitocôndrias esféricas com poucas cristas e numerosas vesículas simples ligadas à membrana e aparelho de Golgi, sendo as únicas capazes de realizar mitose nesse órgão[346]. Este tipo celular apresenta numerosas organelas, tem a função principal de realizar a mitose, e é a célula precursora dos outros tipos celulares; portanto, é natural que necessite de uma grande quantidade de energia[214,347], o que explicaria o acúmulo de ferro em maior proporção proveniente dos fármacos comerciais, que seria aproveitado para desempenhar funções de desenvolvimento como a mitose.

As células tipo **R** se encontram principalmente localizadas na região intermediária do túbulo. Em geral, são consideradas células absortivas e de estoque do epitélio, responsáveis pelo sequestro de gordura, glicogênio e cátions divalentes, incluindo o cálcio e uma variedade de metais, neste caso o ferro que poderia ser disponibilizado como Fe(II), por causa de uma redução (ferrireductase). Portanto, as células estão relacionadas com a assimilação e armazenamento de nutrientes[38,347,348]. Este tipo celular encarrega-se de acumular metais divalentes, porém, não necessariamente internaliza mais metal que os outros tipos celulares (**E, F** e **B)**, pois se encontra num estágio final de desenvolvimento, provavelmente precisando de ferro só para a manutenção.

As células tipo **B** apresentam a maior densidade em relação aos outros tipos celulares[226]. São derivadas das células **F** e aparentam ter função significativa na digestão intracelular e na excreção de produtos lisados, oriundos da digestão e de xenobióticos[39].Atuam, também, junto com as células **F**, nos processos de síntese de proteínas e de secreção enzimática[38,349] . As células **B,** também denominadas secretoras, são encontradas na região intermediária e proximal dos túbulos do hepatopâncreas, e provavelmente atuam na digestão e excreção, através do processo de auto-extrusão[350]. Estes dos últimos tipos celulares, por serem muito semelhantes em desenvolvimento, apresentam funções similares ou complementares, principalmente de estocagem[224,226], porém poderiam absorver maiores proporções de ferro dos compostos comerciais.

4.9.2 Transporte de ferro a partir dos derivados de ferroceno

A **Figura 4.46** apresenta a cinética de supressão de fluorescência por causa do ferro do Fc e dos derivados de ferroceno (TMH-Fc e $(TMH)_2$-Fc), após a penetração nos diferentes tipos celulares. A queda de sinal de fluorescência indica que houve ferro transportado e/ou internalizado, detectado pela calceína. A continuidade do sinal ou incremento depois de 30 s pode indicar que não houve transporte, morte celular ou armazenamento de ferro.

Na **Tabela 4.22**, estão apresentados os resultados de concentração de ferro para cada tipo de célula. A robustez do teste foi assegurada, verificando-se a elevada viabilidade (85-95%) que apresentam as células de hepatopâncreas frente aos compostos de ferroceno com concentrações próximas a 1 mM (**Figura 4.45**).

Tabela 4.22: Concentração de ferro intracelular promovido por derivados de ferroceno, por tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B) do caranguejo *Ucides cordatus*, durante 90 s. P<0.05, n = 5. n.d. = não detectado.

Composto de ferro	E	R	F	B
Fe(II)	2.29 ± 0.03	1.82 ± 0.11	1.72 ± 0.08	1.69 ± 0.05
Ferroceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TMH-Ferroceno	n.d.	n.d.	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.08
$(TMH)_2$-Ferroceno	n.d.	n.d.	0.20 ± 0.03	0.31 ± 0.04

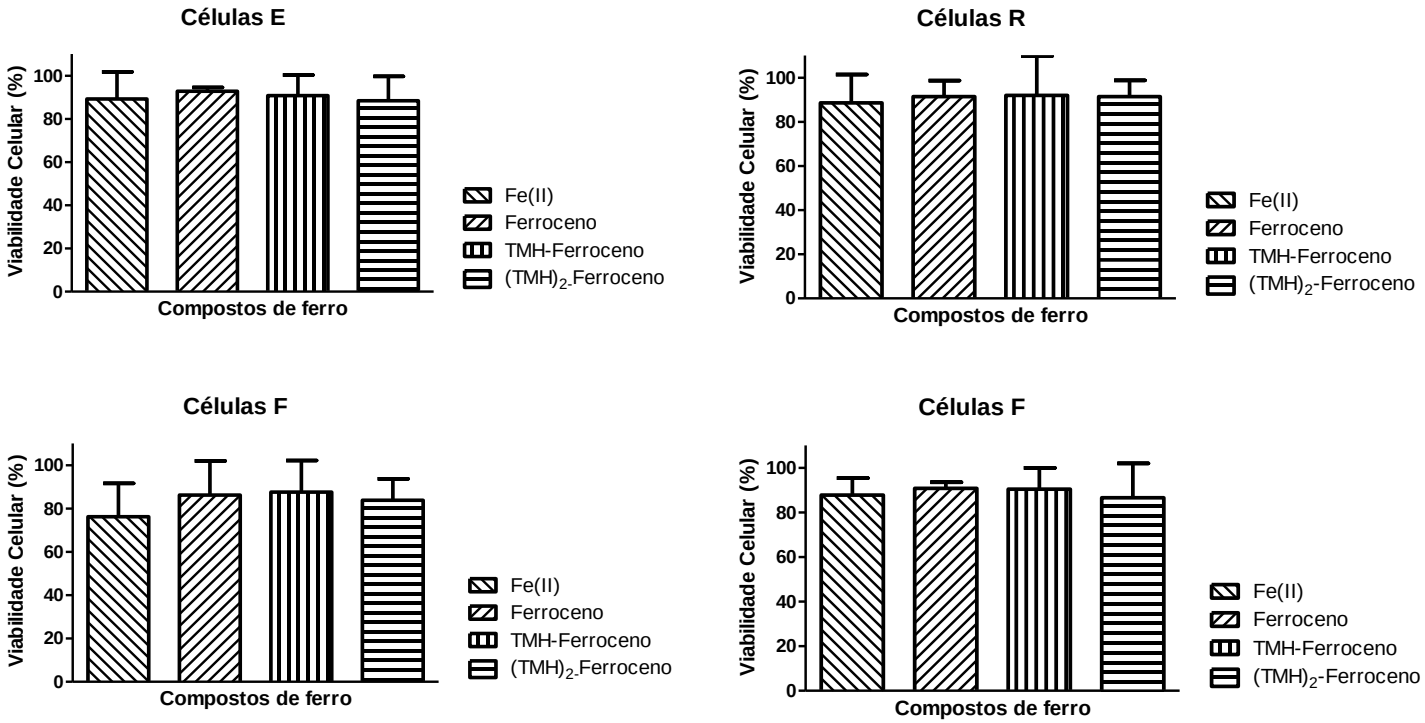


Figura 4.45: Viabilidade dos tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B) do caranguejo *Ucides cordatus* durante 3 h de exposição frente aos compostos de ferroceno. A concentração usada dos compostos de ferro foi de 833 µM, onde as letras representam diferença estatística significativa (ANOVA), P<0.05, n = 5

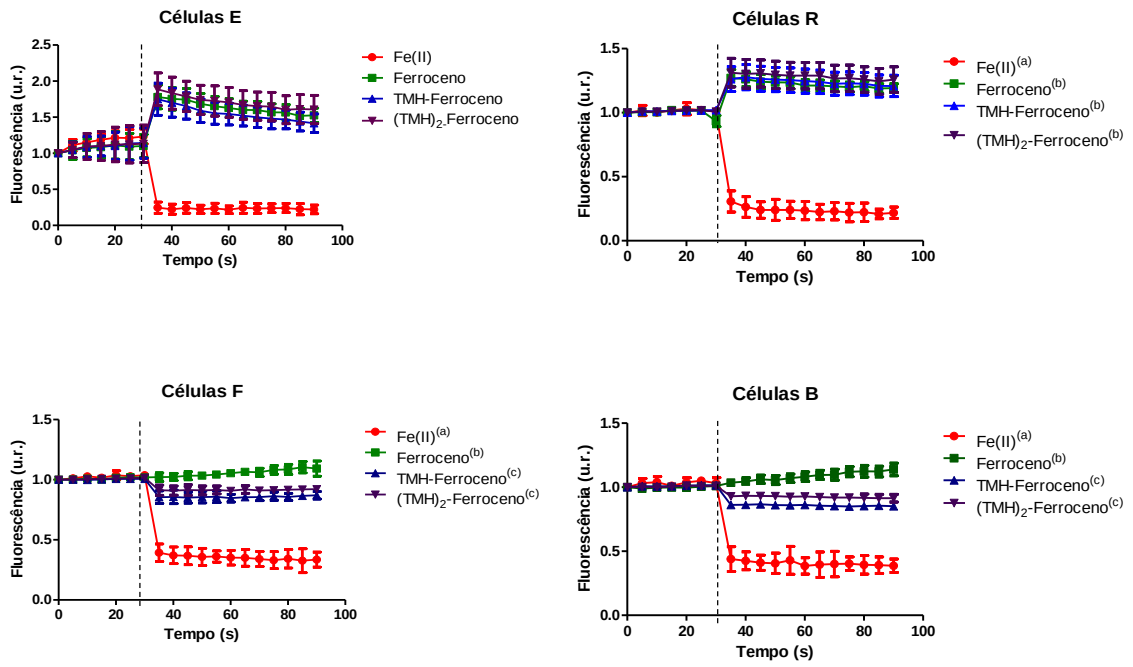


Figura 4.46: Transporte de ferro a partir dos derivados de ferroceno para células do hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus*. A linha pontilhada a 30 s representa o momento da adição dos derivados de Fc (833 µM de concentração final). Letras diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, $n = 5$.

Os compostos de ferroceno avaliados seguem uma ordem segundo o ferro transportado, só através de dois tipos celulares (F e B) (**Figura 4.47)**:

F, B: Fe(II) > TMH-Fc > $(TMH)_2$-Fc

O ferro presente nos derivados de ferroceno, diferentemente dos compostos comerciais, somente é transportado em dois tipos celulares (F e B), assim o ferro pode seguir duas rotas prováveis de internalização que poderiam ser por endocitose[337] ou difusão passiva[351]. Os derivados de ferroceno são mais lipofílicos[205], podendo entrar simplesmente por difusão passiva. A probabilidade de uso de canais de ferro mediante o DMT1 ou canais de cálcio ou zinco, se vê reduzida, porque não se teve resposta do transporte nos tipos celulares E e R para os derivados de Fc, e sim para o ferro iônico. Os tipos celulares F e B apresentam como característica principal o armazenamento e estocagem de substâncias, e essa característica fisiológica poderia explicar o acúmulo observado apenas nessas linhagens.

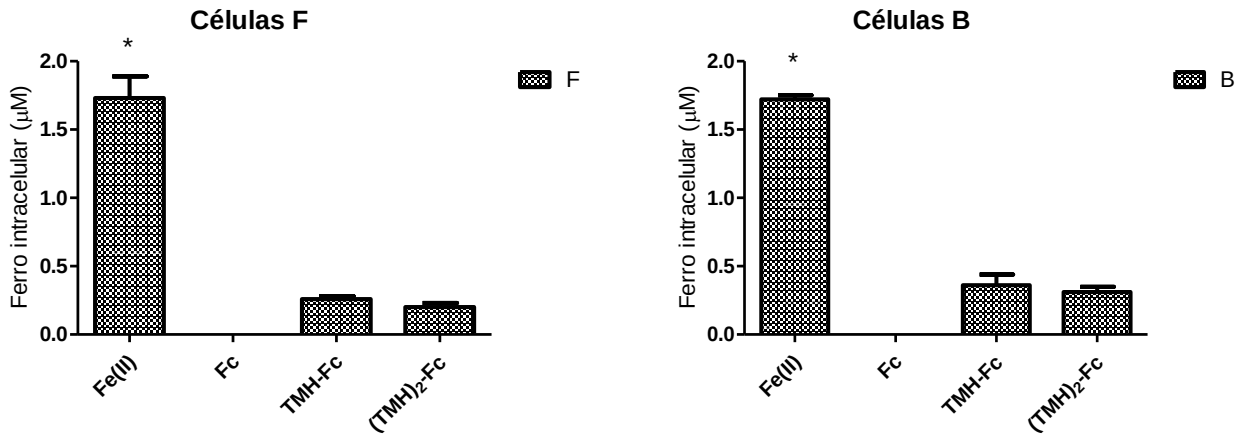


Figura 4.47: Transporte de ferro a partir dos compostos de ferroceno em células tipo F e B de hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus.* (ANOVA), *, $P < 0,05$, $n = 5$.

Segundo a **Tabela 4.22,** o ferro do TMH-Fc é captado pela calceína dentro das células de hepatopâncreas em maior proporção que o $(TMH)_2$-Fc. Esses resultados de estocagem de metal têm relação com a estabilidade desses compostos a pH 7,4 (HBS) frente às sondas CAL e Fl-Tf. Segundo os valores de ferro disponível para as sondas (**Tabela 4.14 e 4.15**), há uma correlação direta da disponibilidade de ferro com o transporte nas células de hepatopâncreas. A menor estabilidade dos derivados de ferroceno se correlaciona com mais ferro disponível, e este pode ser disponibilizado dentro das células de hepatopâncreas suprimindo o sinal de fluorescência.

Segundo o tipo celular, a seguinte relação de transporte dos derivados de ferroceno é observada:

B > **F**

O ferro é transportado e/ou armazenado através das células de hepatopâncreas (F e B) independentemente do tipo de composto, mas com maior preferência pelas células tipo B. A célula tipo F tem a característica principal de síntese de proteínas[352], podendo internalizar a mesma quantidade de ferro que na célula de tipo B, porém a célula F poderia estar utilizando uma parte do ferro intracelular para a suas funções, diminuindo a quantidade de ferro “ocioso” (que se liga à calceína).

4.9.3 Transporte de ferro a partir das nanopartículas de magnetita revestida (Fe_3O_4-OA-Tween 80)

O perfil de supressão de fluorescência por causa do ferro das NPs se mostra na **Figura 4.49,** para os diversos tipos celulares. A queda de sinal de fluorescência indica que houve ferro transportado e/ou internalizado, detectado pela calceína. A continuidade do sinal depois de 30 s pode indicar que não houve transporte, morte celular ou armazenamento de ferro.

Na **Tabela 4.23**, apresentam-se os resultados de concentração de ferro para cada tipo de célula. A robustez do teste foi assegurada, verificando-se a elevada viabilidade (85-95%) que apresentam as células de hepatopâncreas frente às NPs com concentrações próximas a 1 mM (**Figura 4.48**).

Tabela 4.23: Concentração de ferro intracelular por tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B) do caranguejo *Ucides cordatus*, durante 90 s. $P<0.05$, n = 5

Composto de ferro	**E**	**R**	**F**	**B**
Fe(II)	1,88 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,54 ± 0,02	1,58 ± 0,01
5 nm	0,90 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,84 ± 0,22
8 nm	0,85 ± 0,04	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,65 ± 0,03
12 nm	0,67 ± 0,05	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,64 ± 0,01

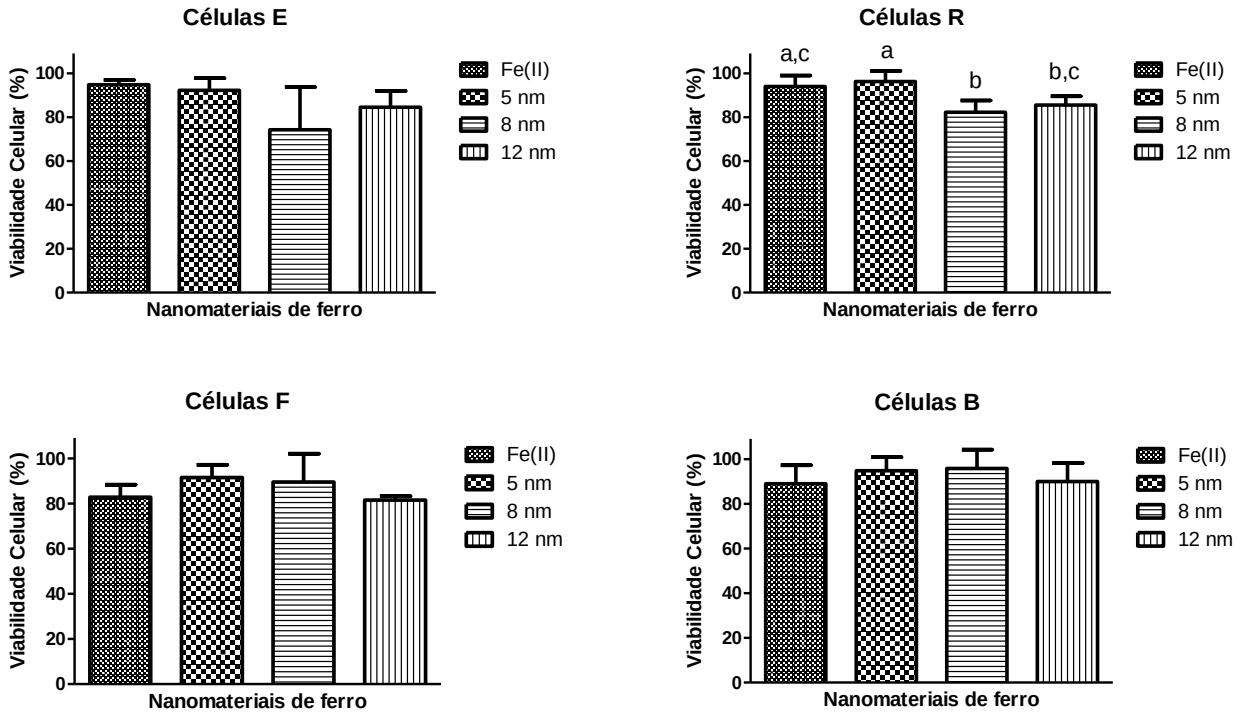


Figura 4.48: Viabilidade dos tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B) do caranguejo *Ucides cordatus* durante 3 h de exposição frente às NPs. A concentração usada dos compostos de ferro foi de 833 µM, onde as letras representam diferença estatística significativa (ANOVA), $P<0.05$, $n = 5$

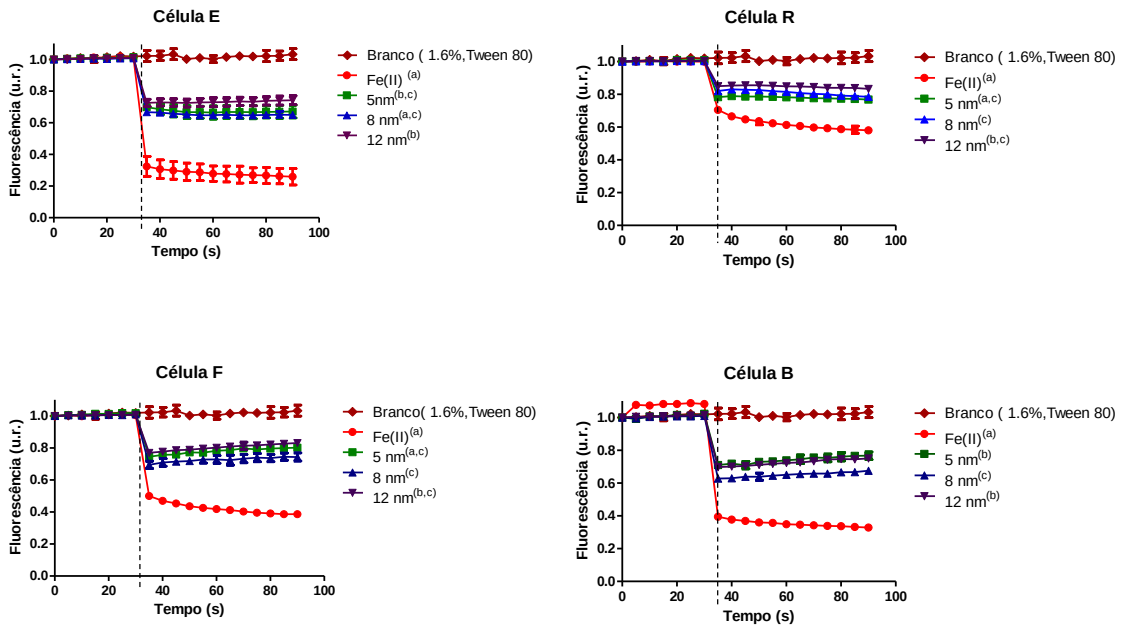


Figura 4.49: Perfis de supressão de fluorescência por causa do ferro das NPs de magnetita em células de hepatopâncreas do caranguejo *Ucides cordatus*. A linha pontilhada a 30 s representa o momento da adição das NPs (833 µM de concentração final). Letras diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA), $P < 0,05$, $n = 5$.

Para cada NP, a seguinte ordem de disponibilidade para as células é observada (**Tabela 4.23)**:

E: Fe(II) > NP (5 nm) ≥ NP (8 nm) > NP (12 nm)
R: Fe(II) > NP (5 nm) ≥ NP (8 nm) > NP (12 nm)
F: Fe(II) > NP (5 nm) ≥ NP (8 nm) > NP (12 nm)
B: Fe(II) > NP (5 nm) ≥ NP (8 nm) ≥NP (12 nm)

O ferro presente nas NPs teve uma relação com o tamanho/revestimento no que diz respeito ao transporte através dos quatro tipos celulares de hepatopâncreas (E, R, F e B). As NPs poderiam ser internalizadas por endocitose[165,353] ou difusão passiva devido ao pequeno tamanho e diferença de concentração[354,355]. A probabilidade do uso de canais é menor devido à estrutura muito estável e de tamanho incompatível. As diferenças de internalização por endocitose poderiam ser diferenciadas pela carga externa negativa das nanopartículas, sendo maior a carga negativa para as NPs de maior tamanho (devido à sua preparação), segundo se mostra na **Tabela 4.9.** Entretanto as NPs poderiam tam-

bém se internalizar de forma proporcional inversa ao tamanho, ou seja quanto menor o tamanho da partícula se tem maior quantidade de ferro que interage com a sonda detectora[353]. Ademais as NPs de menor tamanho podem se distribuir de uma forma mais organizada[353], de tal maneira que se acomodem num endossomo a maior quantidade de partículas, aproveitando o seu menor tamanho[165,353]

Segundo o tipo celular, a seguinte relação de transporte das nanopartículas é observada:

$$\mathbf{E} > \mathbf{B} > \mathbf{F} \geq \mathbf{R}$$

Em nanopartículas não se observa uma ordem de transporte similar aos compostos comercias, nem derivados de ferroceno, devido às diferenças e complexidades estruturais (Fe_3O_4)[353], revestimento orgânico (ácido oleico) e o estabilizante (Tween 80). Nas células tipo F e R, por terem em comum funções de síntese de enzimas e proteínas, é possível a maior utilização do ferro no exercício das suas funções. Ao contrário, as células E e B apresentam funções de mitose e de estocagem, respectivamente, porém o ferro captado não é utilizado para as funções exercidas, tornando-se disponível em maior proporção no citosol e sendo captado pela sonda.

Em forma geral, as concentrações de ferro intracelular nos diferentes experimentos (fármacos comerciais, derivados de ferroceno e nanopartículas), verificou-se que o transporte de Fe(II) nos diferentes tipos celulares mostra a seguinte tendência de ordem:

$$\mathbf{E} > \mathbf{R} > \mathbf{F} \geq \mathbf{B}$$

O íon Fe(II) pode se internalizar através dos canais de zinco, cálcio e DMT1. O Fe(III) produto da oxidação devido às condições de pH do meio, pode ser reduzido com o auxílio da ferriredutase para re-disponibilizá-lo como Fe(II).

Além disso, as células E apresentam maior transporte possivelmente devido aos constantes processos de mitose que sofrem. Essas células, por serem precursoras dos outros tipos celulares, podem utilizar o Fe(II) como cofator enzimático, sendo importan-

te o seu transporte para viabilizar os seus processos fisiológicos. Da mesma maneira, as células R também apresentam altos índices de transporte celular, pois o Fe(II) é um componente essencial para a homeostase celular. Como as células R apresentam como função majoritária a regulação e troca iônica, o Fe(II) sería transportado para o seu interior por apresentar-se em pequenas quantidades. As células F e B, por sua vez, apresentam um transporte celular semelhante. Por apresentarem vacúolos e serem específicas para estocagem, o Fe(II) poderia ser transportado e armazenado nessas organelas. Em adição, proteínas detoxificadoras, como as metalotioneínas, poderiam ser expressadas na presença de Fe(II), ligando-se ao ion e impedindo que este se ligue à calceína, diminuindo a eficiência de supressão e assim poderia ser identificado como um menor transporte celular.

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os metalofármacos apresentaram grande estabilidade frente à calceína e transferrina fluorescente em condições de pH 7,4. Em concentrações elevadas, liberaram um máximo de 2% do ferro total. Frente à deferiprona, os fármacos de via oral disponibilizam 8% mais ferro que os de via intravenosa. A presença de citrato pode aumentar a disponibilidade de ferro em fármacos de via intravenosa frente à deferiprona em 3%, já em fármacos de via intravenosa o citrato pode inibir a disponibilidade frente DFP em 13%. Os fármacos de via oral, a pH 2,2, podem disponibilizar mais ferro. Os compostos comerciais (a 1 mM) induziram baixa mortalidade em *Artemia salina* adulta (10%) e nehuma toxicidade em *Artemia* de primeiro estágio. Em células de hepatopâncreas o ferro dos fármacos teve transporte pelos quatro tipos celulares (E, R, F e B), com concentrações maiores para os compostos de via intravenosa (0,24 - 0,36 µM) do que os de via oral (0,15 - 0,27 µM).

O TMH-Fc e $(TMH)_2$-Fc foram menos estáveis a pH 7,4 e muito estáveis com o aumento da salinidade e pH. Em HBS o Fc apresentou 3%, no TMH-Fc, 9,5% e $(TMH)_2$-Fc, 8,2% do ferro total de atividade redox. Em água do mar artificial, os ferrocenos aumentaram a atividade de forma quase proporcional (Fc, 13,8%, TMH-Fc, 40% e $(TMH)_2$-Fc, 85,4%). A toxicidade, a 300 µM, em artêmias adultas foi de 7,0% (TMH-Fc) e 33% ($(TMH)_2$-Fc). Em artêmias de primeiro estágio, estes compostos apresentaram diferentes toxicidades, sendo mais tóxico o TMH-Fc (LC 50 ~ 80 µM) que o $(TMH)_2$-Fc (2,5%). O transporte de ferrocenos em células de hepatopâncreas de *Ucides cordatus* só foi obsevado para TMH-Fc e $(TMH)_2$-Fc em células tipo F e B, provavelmente devido às suas características de armazenadoras.

As nanopartículas não disponibilizaram ferro para calceína, transferrina e desferroxamina. A atividade redox poderia ser devida à transição a maghemita. Podem carregar de ferro células de hepatopâncreas em maior extensão do que os outros compostos avaliados, independentemente do tipo celular, tendo uma capacidade de transporte de quase 50% de eficiência em relação ao ferro iônico.

Capítulo 6

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

- Identificação dos diferentes canais e transportadores de ferro em células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus*: este estudo poderia fornecer o entendimento sobre a bioacumulação de ferro em crustáceos, devido ao descarte de fármacos de forma direta ou indireta no ecossistema aquático.

- Estudo de toxicidade comparativo dos compostos de ferro com bioindicadores aquáticos de água doce (*Daphnia*) e salgada (*Artemia salina*).

- Estudo da toxicidade de nanomateriais com diferentes revestimentos orgânicos e maior faixa de dispersão de tamanho.

- Especiação dos compostos de ferro em meios fisiológicos de soro sanguíneo e marinho (células de hepatopâncreas de caranguejo *Ucides cordatus*).

Capítulo 7

Bibliografia

7. BIBLIOGRAFIA

1. Harris, W. R. *Iron chemistry, in Molecular and Cellular Iron Transport*. (Marcel Dekker, New York, 2002).

2. Crichton, R. R. & Pierre, J.-L. Old Iron, Young Copper: from Mars to Venus. *Biometals* **14,** 99–112

3. Baes CF, Mesmer RE (1976) The hydrolysis of cations. Wiley, New York.

4. Andrews, S. C., Robinson, A. K. & RodrÃ-guez-QuiÃ±ones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27,** 215–237 (2003).

5. Kosman, D. J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol. Microbiol.* **47,** 1185–97 (2003).

6. Cabaj, A. & Kosakowska, A. Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. *Microbiol. Res.* **164,** 570–7 (2009).

7. Gulbis, B. *et al.* Distribution of iron and iron-binding proteins in first-trimester human pregnancies. *Obstet. Gynecol.* **84,** 289–93 (1994).

8. Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases—the evolution of a chemical concept. *Coord. Chem. Rev.* **100,** 403–425 (1990).

9. England, J. *et al.* Characterization of a tricationic trigonal bipyramidal iron(IV) cyanide complex, with a very high reduction potential, and its iron(II) and iron(III) congeners. *Inorg. Chem.* **50,** 2885–96 (2011).

10. Nishibayashi, Y. Nitrogen fixation: nitrido complexes step up. *Nat. Chem.* **3,** 502–4 (2011).

11. Pierre, J. L., Fontecave, M. & Crichton, R. R. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **15,** 341–346

12. Crichton, R. & Boelaert, J. R. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. (John Wiley & Sons, 2001).

13. Perutz, M. F. Review Lecture: Stereochemical Mechanism of Oxygen Transport by Haemoglobin. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **208,** 135–162 (1980).

14. Lykkesfeldt, J., Morgan, E., Christen, S., Skovgaard, L. T. & Moos, T. Oxidative stress and damage in liver, but not in brain, of Fischer 344 rats subjected to dietary iron supplementation with lipid-soluble [(3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene]. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21,** 145–55 (2007).

15. Andrews, N. C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat. Rev. Genet.* **1,** 208–17 (2000).

16. Grotto, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **32,** 08–17 (2010).

17. Parrow, N. L., Fleming, R. E. & Minnick, M. F. Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect. Immun.* **81,** 3503–14 (2013).

18. Finch, C. Regulators of iron balance in humans. *Blood* **84,** 1697–702 (1994).

19. Grotto, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **30,** 390–397 (2008).

20. Horvathova, M., Ponka, P. & Divoky, V. Molecular basis of hereditary iron homeostasis defects. *Hematology* **15,** 96–111 (2010).

21. Naigamwalla, D. Z., Webb, J. A. & Giger, U. Iron deficiency anemia. *Can. Vet. J.* **53,** 250–6 (2012).

22. Gardenghi, S., Grady, R. W. & Rivella, S. Anemia, ineffective erythropoiesis, and hepcidin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in β-thalassemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **24,** 1089–107 (2010).

23. Cançado, R. D., Lobo, C. & Friedrich, J. R. Tratamento da anemia ferropriva com ferro por via oral. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **32,** 114–120 (2010).

24. Niitsu, Y., Kato, J. & Takimoto, R. [Iron metabolism in iron deficiency anemia and anemia of chronic disease]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* **93,** 445–50 (2004).

25. Stein, J., Hartmann, F. & Dignass, A. U. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7,** 599–610 (2010).

26. Medeiros, D. A., Hadler, M. C. C. M., Sugai, A. & Torres, V. M. The effect of folic acid supplementation with ferrous sulfate on the linear and ponderal growth of children aged 6–24 months: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **69,** 198–204 (2014).

27. Kassebaum, N. J. *et al.* A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* **123,** 615–624 (2013).

28. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. (2015).

29. Schade, A. L. & Caroline, L. An Iron-binding Component in Human Blood Plasma. *Science* **104,** 340–1 (1946).

30. Hradilek, A. & Neuwirt, J. Iron uptake from transferrin and transferrin endocytic cycle in Friend erythroleukemia cells. *J. Cell. Physiol.* **133,** 192–6 (1987).

31. McGraw, T. E. & Subtil, A. Endocytosis: biochemical analyses. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 15,** Unit 15.3 (2001).

32. Chung, M. C.-M. Stucture and function of transferrin. *Biochem. Educ.* **12,** 146–154 (1984).

33. Klausner, R. D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J. B. & Bridges, K. R. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80,** 2263–6 (1983).

34. Grosell, M., McDonald, M. D., Wood, C. M. & Walsh, P. J. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (Opsanus beta). I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products. *Aquat. Toxicol.* **68,** 249–62 (2004).

35. Shingles, R. Copper Transport Across Pea Thylakoid Membranes. *PLANT Physiol.* **135,** 145–151 (2004).

36. Ahearn, G. A., Mandal, P. K. & Mandal, A. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B.* **174,** 439–52 (2004).

37. Chavez-Crooker, P. *et al.* Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (Homarus americanus) hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **136,** 213–24 (2003).

38. Chavez-Crooker, P., Garrido, N., Pozo, P. & Ahearn, G. A. Copper transport by lobster (Homarus americanus) hepatopancreatic lysosomes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **135,** 107–18 (2003).

39. Chavez-Crooker, P., Garrido, N. & Ahearn, G. A. Copper transport by lobster hepatopancreatic epithelial cells separated by centrifugal elutriation: measurements with the fluorescent dye Phen Green. *J. Exp. Biol.* **204,** 1433–44 (2001).

40. Viarengo, A. & Nott, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* **104,** 355–372 (1993).

41. Dallinger, R. & Rainbow, P. S. *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. (CRC Press, 1993).

42. Rainbow, P. S. Ecophysiology and trace metal uptake in crabs and other crustaceans. *P.S. Rainbow. 2000. Ecophysiol. trace Met. uptake crabs other Crustac. Comp. Biochem. Physiol. Part A 126 (Supplement 1) S124.* **Supplement,** S124 (2000).

43. Rainbow, P. S. & Black, W. H. Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, Carcinus maenas and Eriocheir sinensis. *Aquat. Toxicol.* **72,** 45–65 (2005).

44. Brouwer, M., Syring, R. & Hoexum Brouwer, T. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, Callinectes sapidus, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* **88,** 228–39 (2002).

45. Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A. & Montes, C. The use of the red swamp crayfish (Procambarus clarkii, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci. Total Environ.* **366,** 380–390 (2006).

46. Garrick, M. D. & Garrick, L. M. Cellular iron transport. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790,** 309–325 (2009).

47. Cabantchik, Z. I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front. Pharmacol.* **5,** 45 (2014).

48. Koorts, A. M. & Viljoen, M. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch. Physiol. Biochem.* **113,** 30–54 (2007).

49. Srai, S. K. S., Bomford, A. & McArdle, H. J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **15,** 243–59 (2002).

50. Kakhlon, O. & Cabantchik, Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1 1This article is part of a series of reviews on 'Iron and Cellular Redox Status.' The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic. Biol. Med.* **33,** 1037–1046 (2002).

51. Hider, R. C. & Kong, X. Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton Trans.* **42,** 3220–9 (2013).

52. Scheers, N. & Sandberg, A.-S. Iron transport through ferroportin is induced by intracellular ascorbate and involves IRP2 and HIF2α. *Nutrients* **6,** 249–60 (2014).

53. Travacio, M. & Llesuy, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Ciênc. cult. (Säo Paulo)* **48,** 9–13

54. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine.4th ed.* (Oxford University Press., 2007).

55. Aguiar, A., Ferraz, A., Contreras, D. & Rodríguez, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Quim. Nova* **30,** 623–628 (2007).

56. Ribeiro, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal* **21,** (2006).

57. Lehninger, A. L. & Cox, M. M. *Principios de bioquímica*. (2006).

58. Babior, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood* **93,** 1464–76 (1999).

59. El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidalo, M.-A. & Elbim, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **53,** 199–206

60. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014,** 1–31 (2014).

61. Moldovan, L. & Moldovan, N. I. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem. Cell Biol.* **122,** 395–412 (2004).

62. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* **111,** 5944–72 (2011).

63. Fruhwirth, G. O., Loidl, A. & Hermetter, A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772,** 718–36 (2007).

64. Reis, A. & Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1818,** 2374–87 (2012).

65. Kinnunen, P. K. J., Kaarniranta, K. & Mahalka, A. K. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations. *Biochim. Biophys. Acta* **1818,** 2446–55 (2012).

66. Volinsky, R. & Kinnunen, P. K. J. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J.* **280,** 2806–16 (2013).

67. Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39,** 1529–42 (1998).

68. Kanner, J., German, J. B. & Kinsella, J. E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **25,** 317–64 (1987).

69. Jüstel, T. in *Luminescence* 179–190 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007). doi:10.1002/9783527621064.ch7

70. Kirchhoff, J. Luminescence Spectroelectrochemistry. *Curr. Sep.* **1,** 11–14 (1997).

71. Geddes, C. D. Optical halide sensing using fluorescence quenching: theory, simulations and applications - a review. *Meas. Sci. Technol.* **12,** R53–R88 (2001).

72. Lakowicz, J. Quenching of Fluorescence. *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* 277–330 (2007).

73. Anger, P., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **96,** (2006).

74. Tsien, R. Y. Fluorescent probes of cell signaling. *Annual Review of Neuroscience* **12,** 227–253 (1989).

75. Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. (1996).

76. Su, B.-L., Moniotte, N., Nivarlet, N., Tian, G. & Desmet, J. Design and synthesis of fluorescence-based siderophore sensor molecules for FeIII ion determination. *Pure Appl. Chem.* **82,** 2199–2216 (2010).

77. Tsafack, A., Libman, J., Shanzer, A. & Cabantchik, Z. I. Chemical Determinants of antimalarial activity of reversed siderophores. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40,** 2160–6 (1996).

78. Shanzer, A., Libman, J., Lytton, S. D., Glickstein, H. & Cabantchik, Z. I. Reversed siderophores act as antimalarial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88,** 6585–9 (1991).

79. Kemlo, J. A. & Shepherd, T. M. Quenching of excited singlet states by metal ions. *Chem. Phys. Lett.* **47,** 158–162 (1977).

80. Varnes, A. W., Dodson, R. B. & Wehry, E. L. Interactions of transition-metal ions with photoexcited states of flavines. Fluorescence quenching studies. *J. Am. Chem. Soc.* **94,** 946–950 (1972).

81. Zeng, Z. & Jewsbury, R. A. Fluorimetric determination of iron using 5-(4-methoxyphenylazo)-8-(4-toluenesulfonamido)quinoline. *Analyst* **125,** 1661–1665 (2000).

82. Lytton, S. D., Mester, B., Libman, J., Shanzer, A. & Ioav Cabantchik, Z. Monitoring of iron(III) removal from biological sources using a fluorescent siderophore. *Anal. Biochem.* **205,** 326–333 (1992).

83. Shanzer, A. *et al.* Molecular recognition and signaling. *Pure Appl. Chem.* **68,** 757–760 (1996).

84. Werts, M. H. V, Hofstraat, J. W., Geurts, F. A. J. & Verhoeven, J. W. Fluorescein and eosin as sensitizing chromophores in near-infrared luminescent ytterbium(III), neodymium(III) and erbium(III) chelates. *Chem. Phys. Lett.* **276,** 196–201 (1997).

85. Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. *Anal. Biochem.* **299,** 194–202 (2001).

86. Palanch, T., Marmolle, F., Abdallah, M. A., Shanzer, A. & Albrecht-Gary, A.-M. Fluorescent siderophore-based chemosensors: iron(III) quantitative determinations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4,** 188–198 (1999).

87. Nudelman, R. *et al.* Modular Fluorescent-Labeled Siderophore Analogues. *J. Med. Chem.* **41,** 1671–1678 (1998).

88. Ardon, O. *et al.* Iron uptake in Ustilago maydis: Tracking the iron path. *J. Bacteriol.* **180,** 2021–2026 (1998).

89. Ardon, O. *et al.* Iron uptake in Ustilago maydis: studies with fluorescent ferrichrome analogues. *Microbiology* **143,** 3625–3631 (1997).

90. Fages, F., Bodenant, B. & Weil, T. Fluorescent, Siderophore-Based Chelators. Design and Synthesis of a Trispyrenyl Trishydroxamate Ligand, an Intramolecular Excimer-Forming Sensing Molecule Which Responds to Iron(III) and Gallium(III) Metal Cations. *J. Org. Chem.* **61,** 3956–3961 (1996).

91. Espósito, B. P., Epsztejn, S., Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A Review of Fluorescence Methods for Assessing Labile Iron in Cells and Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **304,** 1–18 (2002).

92. Thomas, F. *et al.* Calcein as a Fluorescent Probe for Ferric Iron: Application to iron nutrition in plant cells. *J. Biol. Chem.* **274,** 13375–13383 (1999).

93. Su, B.-L. *et al.* Fl–DFO molecules@mesoporous silica materials: Highly sensitive and selective nanosensor for dosing with iron ions. *J. Colloid Interface Sci.* **358,** 136–145 (2011).

94. New, E. J. Tools to study distinct metal pools in biology. *Dalton Trans.* **42,** 3210–9 (2013).

95. Cabantchik, Z. I., Sohn, Y. S., Breuer, W. & Espósito, B. P. The molecular and cellular basis of iron toxicity in Iron Overload (IO) disorders. Diagnostic and therapeutic approaches. *Thalass. Reports* **3,** 3 (2013).

96. Petrat, F., Groot, H. de, Sustmann, R. & Rauen, U. The Chelatable Iron Pool in Living Cells: A Methodically Defined Quantity. *Biol. Chem.* **383,** (2002).

97. Greenberg, G. R. & Wintrobe, M. M. A LABILE IRON POOL. *J. Biol. Chem.* **165,** 397–398 (1946).

98. Kozlov, A. Intracellular free iron in liver tissue and liver homogenate: Studies with electron paramagnetic resonance on the formation of paramagnetic complexes with desferal and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **13,** 9–16 (1992).

99. Weaver, J. & Pollack, S. Low-Mr iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochem. J.* **261,** 787–92 (1989).

100. Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. Fluorescence Analysis of the Labile Iron Pool of Mammalian Cells. *Anal. Biochem.* **248,** 31–40 (1997).

101. PETRAT, F., de GROOT, H. & RAUEN, U. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* **356,** 61–69 (2001).

102. Queirós, C. *et al.* A novel fluorescein-based dye containing a catechol chelating unit to sense iron(III). *Dye. Pigment.* **93,** 1447–1455 (2012).

103. Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.* (2008).

104. Monserrat, J. M. *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. (2007).

105. Canli, M. & Furness, R. W. Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the norway lobster Nephrops norvegicus. *Mar. Environ. Res.* **36,** 217–236 (1993).

106. Wu, J.-P. & Chen, H.-C. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp Litopenaeus vannamei exposed to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **140,** 383–394 (2005).

107. Páez-Osuna, F. & Tron-Mayen, L. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp Penaeus vannamei from the northwest coast of Mexico. *Environ. Int.* **22,** 443–450 (1996).

108. Chua, T.-E. Coastal aquaculture development and the environment. *Mar. Pollut. Bull.* **25,** 98–103 (1992).

109. Martín-Díaz, M. L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J. & DelValls, T. Á. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, Carcinus maenas. *Chemosphere* **58,** 615–626 (2005).

110. Borković, S. S. *et al.* Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (Orconectes limosus) from the River Danube. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **147,** 122–128 (2008).

111. Rainbow, P. S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.* **33,** 576–82 (2007).

112. Beltrame, M. O., De Marco, S. G. & Marcovecchio, J. E. The burrowing crab Neohelice granulata as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. *Environ. Monit. Assess.* **172,** 379–89 (2011).

113. O'Connor, J. M. & Huggett, R. J. Aquatic pollution problems, North Atlantic coast, including Chesapeake Bay. *Aquat. Toxicol.* **11,** 163–190 (1988).

114. Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* **44,** 69–84 (1997).

115. Morales-Hernández, F., Soto-Jiménez, M. F. & Páez-Osuna, F. Heavy metals in sediments and lobster (Panulirus gracilis) from the discharge area of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **46,** 485–91 (2004).

116. Wood, C. M. Flux measurements as indices of H+ and metal effects on freshwater fish. *Aquat. Toxicol.* **22,** 239–263 (1992).

117. Batista, A. P. S. & Nogueira, R. F. P. Parameters affecting sulfonamide photo-Fenton degradation – Iron complexation and substituent group. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **232,** 8–13 (2012).

118. Melo, S. A. S., Trovó, A. G., Bautitz, I. R. & Nogueira, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Quim. Nova* **32,** 188–197 (2009).

119. Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. & Hartemann, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **214,** 442–8 (2011).

120. US EPA National Center for Environmental Assessment, I. O. O. of D. D. & Murphy, P. EPA's Report on the Environment (ROE) (2008 Final Report).

121. Hignite, C. & Azarnoff, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.* **20,** 337–341 (1977).

122. Rodriguez-Mozaz, S. *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* **69C,** 234–242 (2014).

123. Writer, J. H., Ferrer, I., Barber, L. B. & Thurman, E. M. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci. Total Environ.* **461-462,** 519–527 (2013).

124. Escher, B. I. *et al.* Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* **45,** 75–92 (2011).

125. Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76,** 122–59 (2006).

126. Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. & Fanelli, R. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* **37,** 1241–1248 (2003).

127. Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R.-D. & Baumann, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* **225,** 135–141 (1999).

128. Huang, R. *et al.* The NCGC pharmaceutical collection: a comprehensive resource of clinically approved drugs enabling repurposing and chemical genomics. *Sci. Transl. Med.* **3,** 80ps16 (2011).

129. Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* **75,** 417–34 (2009).

130. Cassiani, S. H. D. B. A segurança do paciente e o paradoxo no uso de medicamentos. *Rev. Bras. Enferm.* **58,** 95–99 (2005).

131. Pinto, A. C. & Barreiro, E. J. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. *Quim. Nova* **36,** 1557–1560 (2013).

132. PORTAL BRASIL. Ciência e Tecnologia. Tecnologia em Saúde. Indústria Farmacêutica. 2012.

133. Bila, D. M. & Dezotti, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova* **26,** 523–530 (2003).

134. Richardson, M. L. & Bowron, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* **37,** 1–12 (1985).

135. Ternes, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday.1. *Water Res.* **32,** 3245–3260 (1998).

136. Becker, R. W. Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS. (2012).

137. Montagner, C. C. & Jardim, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* **22,** 1452–1462 (2011).

138. Fornazari, A. L. de T. *Degradação de fármacos em água pelo acoplamento dos processos ferro zero e Fenton*. (2015).

139. Xu, W., Zhang, G., Zou, S., Li, X. & Liu, Y. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* **145,** 672–9 (2007).

140. Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Meisel, L. M., Lino, C. M. & Pena, A. Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environ. Res.* **136,** 108–19 (2015).

141. Thanh Thuy, H. T. & Nguyen, T. D. The potential environmental risks of pharmaceuticals in Vietnamese aquatic systems: case study of antibiotics and synthetic hormones. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **20,** 8132–40 (2013).

142. Duong, H. A. *et al.* Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* **72,** 968–73 (2008).

143. Le, T. X. & Munekage, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Mar. Pollut. Bull.* **49,** 922–9 (2004).

144. Rodrigues, M.A., R. Ruggiero, and W. G. Guerra, Compostos inorgânicos como fármacos. *Bol. da Soc. Port. Química* **115,** 25–30 (2009).

145. Ronconi, L. & Sadler, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord. Chem. Rev.* **251,** 1633–1648 (2007).

146. Rodrigues; M.A.; R. Ruggiero; and W. Guerra. Compostos inorgânicos como fármacos. *Bol. da Soc. Port. Química* **115,** 25–29 (2009).

147. Gielen, Marcel / Tiekink, E. R. T. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents the use of metals in medicine /.* (Wiley, 2005).

148. Banerjee, R. *et al.* Nanomedicine: magnetic nanoparticles and their biomedical applications. *Curr. Med. Chem.* **17,** 3120–41 (2010).

149. Terreno, E. *et al.* Advances in metal-based probes for MR molecular imaging applications. *Curr. Med. Chem.* **17,** 3684–700 (2010).

150. Cattaneo, A. G. *et al.* Nanotechnology and human health: risks and benefits. *J. Appl. Toxicol.* **30,** 730–44 (2010).

151. Skotland, T., Iversen, T.-G. & Sandvig, K. New metal-based nanoparticles for intravenous use: requirements for clinical success with focus on medical imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6,** 730–737 (2010).

152. Espósito, B. P., Breuer, W., Slotki, I. & Cabantchik, Z. I. Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **32 Suppl 1,** 42–9 (2002).

153. Nielsen, P., Düllmann, J., Wulfhekel, U. & Heinrich, H. C. Non-transferrin-bound-iron in serum and low-molecular-weight-iron in the liver of dietary iron-loaded rats. *Int. J. Biochem.* **25,** 223–32 (1993).

154. Malecki, E. A., Cable, E. E., Isom, H. C. & Connor, J. R. The lipophilic iron compound TMH-ferrocene [(3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene] increases iron concentrations, neuronal L-ferritin, and heme oxygenase in brains of BALB/c mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **86,** 73–84 (2002).

155. Spicher, K. *et al.* Differences in tissue distribution of iron from various clinically used intravenous iron complexes in fetal avian heart and liver. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **73,** 65–72 (2015).

156. Onoue, S., Yamada, S. & Chan, H.-K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine* **9,** 1025–37 (2014).

157. Devalapally, H., Chakilam, A. & Amiji, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J. Pharm. Sci.* **96,** 2547–65 (2007).

158. De Jong, W. H. & Borm, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles:applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* **3,** 133–49 (2008).

159. Macdougall, I. C. Evolution of iv iron compounds over the last century. *J. Ren. Care* **35 Suppl 2,** 8–13 (2009).

160. Ling, D. & Hyeon, T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small* **9,** 1450–1466 (2013).

161. Liu, G., Gao, J., Ai, H. & Chen, X. Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small* **9,** 1533–1545 (2013).

162. Ai, J. *et al.* Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International journal of nanomedicine* **6,** 1117–1127 (2011).

163. Shen, Y. *et al.* Iron-induced myocardial injury: an alarming side effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Cell. Mol. Med.* **19,** 2032–5 (2015).

164. Wu, H., Yin, J.-J., Wamer, W. G., Zeng, M. & Lo, Y. M. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. *J. food drug Anal.* **22,** 86–94 (2014).

165. Könczöl, M. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-κB. *Chem. Res. Toxicol.* **24,** 1460–75 (2011).

166. Srinivas, A. *et al.* Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum. Exp. Toxicol.* **31,** 1113–31 (2012).

167. Okam, M. M. *et al.* Comparative rates of adverse events with different formulations of intravenous iron. *Am. J. Hematol.* **87,** E123–4 (2012).

168. Stefánsson, B. V, Haraldsson, B. & Nilsson, U. Acute oxidative stress following intravenous iron injection in patients on chronic hemodialysis: a comparison of iron-sucrose and iron-dextran. *Nephron. Clin. Pract.* **118,** c249–56 (2011).

169. Hayat, A. Safety issues with intravenous iron products in the management of anemia in chronic kidney disease. *Clin. Med. Res.* **6,** 93–102 (2008).

170. Anirban, G., Kohli, H. S., Jha, V., Gupta, K. L. & Sakhuja, V. The Comparative Safety of Various Intravenous Iron Preparations in Chronic Kidney Disease Patients. *Ren. Fail.* (2009).

171. Fütterer, S., Andrusenko, I., Kolb, U., Hofmeister, W. & Langguth, P. Structural characterization of iron oxide/hydroxide nanoparticles in nine different parenteral drugs for the treatment of iron deficiency anaemia by electron diffraction (ED) and X-ray powder diffraction (XRPD). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **86,** 151–160 (2013).

172. Toblli, J. E., Cao, G., Olivieri, L. & Angerosa, M. Comparison of the renal, cardiovascular and hepatic toxicity data of original intravenous iron compounds. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25,** 3631–3640 (2010).

173. Sturm, B., Steinkellner, H., Ternes, N., Goldenberg, H. & Scheiber-Mojdehkar, B. In vitro study on the effects of iron sucrose, ferric gluconate and iron dextran on redox-active iron and oxidative stress. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **60,** 459–465 (2010).

174. Roth, S., Langguth, P., Spicher, K. & Enzmann, H. Comparative toxicity and cell-tissue distribution study on nanoparticular iron complexes using avian embryos and HepG2-cells. *Transl. Res.* **151,** 36–44 (2008).

175. Stieber, M., Putschew, A. & Jekel, M. Treatment of Pharmaceuticals and Diagnostic Agents Using Zero-Valent Iron – Kinetic Studies and Assessment of Transformation Products Assay. *Environ. Sci. Technol.* **45,** 4944–4950 (2011).

176. Crane, R. A. & Scott, T. B. Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology. *J. Hazard. Mater.* **211-212,** 112–125 (2012).

177. Güyer, G. T. & Ince, N. H. Degradation of diclofenac in water by homogeneous and heterogeneous sonolysis. *Ultrason. Sonochem.* **18,** 114–119 (2011).

178. Singh, K. P., Singh, A. K., Gupta, S. & Rai, P. Modeling and optimization of reductive degradation of chloramphenicol in aqueous solution by zero-valent bimetallic nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19,** 2063–78 (2012).

179. Segura, Y., Martínez, F. & Melero, J. A. Effective pharmaceutical wastewater degradation by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Appl. Catal. B Environ.* **136-137,** 64–69 (2013).

180. Zhang, X., Lin, S., Lu, X.-Q. & Chen, Z. Removal of Pb(II) from water using synthesized kaolin supported nanoscale zero-valent iron. *Chem. Eng. J.* **163,** 243–248 (2010).

181. Crane, R. A., Dickinson, M., Popescu, I. C. & Scott, T. B. Magnetite and zero-valent iron nanoparticles for the remediation of uranium contaminated environmental water. *Water Res.* **45,** 2931–2942 (2011).

182. Keller, A. A., Garner, K., Miller, R. J. & Lenihan, H. S. Toxicity of nano-zero valent iron to freshwater and marine organisms. *PLoS One* **7,** e43983 (2012).

183. Vitorino, H. A., Mantovanelli, L., Zanotto, F. P. & Espósito, B. P. Iron metallodrugs: stability, redox activity and toxicity against Artemia salina. *PLoS One* **10,** e0121997 (2015).

184. Monserrat, J. M. *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **146,** 221–34

185. Monserrat, J. M., Monserrat, L. A. G. & Bianchini, A. Current and Future Perspectives Using Biomarkers to Assess Pollution in Aquatic Ecosystems. (2003).

186. Freire, M. M., Santos, V. G., Ginuino, I. S. F. & Arias, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* **12,** 2 (2008).

187. Michael, A. S., Thompson, C. G. & Abramovitz, M. Artemia salina as a Test Organism for Bioassay. *Science* **123,** 464 (1956).

188. Gonçalves, F ; Melo, B.; Rodrigues, J ; Sousa, R ; Rodrigues F., F. F. Biomonitoramento de produtos naturais frente Artemia Salina. *Anais da IV Semana de Iniciação Científica da Faculdade de Juazeiro do Norte* 3 (2012).

189. Sanchez-Forton, S., Sanz-Barrera, F. & Barahona-Gomariz, M. V. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod Artemia salina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54,** (1995).

190. A. Lagarto Parraa, R. Silva Yhebraa, I. Guerra Sardiñasa, L. I. B. Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **8,** 395–400 (2001).

191. Freeman, J. A., Kilgus, G., Laurendeau, D. & Perry, H. M. Postmolt and intermolt molt cycle stages of Callinectes sapidus. *Aquaculture* **61,** 201–209 (1987).

192. Criel, G. R. J. & Walgraeve, H. R. M. A. Molt staging in artemia adapted to drach's system. *J. Morphol.* **199,** 41–52 (1989).

193. Sorgeloos, P., Remiche-Van Der Wielen, C. & Persoone, G. The use of Artemia nauplii for toxicity tests—A critical analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2,** 249–255 (1978).

194. Ali, A. A., Fortuna, L., Frasca, M., Rashid, M. T. & Xibilia, M. G. Complexity in a population of Artemia. *Chaos, Solitons & Fractals* **44,** 306–316 (2011).

195. Mantovanelli, L. *Phytoecdysone activity of brazilian ginseng (Pfaffia paniculata) on moult control in Artemia salina (Dissertação de Mestrado)*. (Universidade de São Paulo, 2013).

196. Silva, Z. de S. & Oshiro, L. M. Y. Crescimento em Goniopsis cruentata (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) em laboratório. *Rev. Bras. Zool.* **19,** 915–923 (2002).

197. Martinez, C. B., Alvares, E. P., Harris, R. R. & Santos, M. C. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab Ucides cordatus. *Tissue Cell* **31,** 380–9 (1999).

198. Nudi, A. H. *et al.* Validation of Ucides cordatus as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ. Int.* **33,** 315–27 (2007).

199. Alves, R. R. N., Nishida, A. K. & Hernández, M. I. M. Environmental perception of gatherers of the crab 'caranguejo-uçá' (Ucides cordatus, Decapoda, Brachyura) affecting their collection attitudes. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **1,** 10 (2005).

200. Sá, M. G. e. *Caracterização do transporte de zinco em células isoladas do epitélio branquial da lagosta Homarus americanus (Dissertação de Mestrado)*. (Universidade de São Paulo, 2009).

201. Türker, A. R., Bağ, H. & Erdoğan, B. Determination of iron and lead by flame atomic absorption spectrometry after preconcentration with sepiolite. *Fresenius J. Anal. Chem.* **357,** 351–353 (1997).

202. Wade, L. G. *Organic Chemistry*. (Prentice Hall, 2010).

203. Sun, S. *et al.* Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 273–9 (2004).

204. Sun, S. *et al.* Monodisperse MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 273–9 (2004).

205. Nielsen, P. & Heinrich, H. C. Metabolism of iron from (3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene in rats. A dietary model for severe iron overload. *Biochem. Pharmacol.* **45,** 385–91 (1993).

206. Neuse, E. W. Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **15,** 3–31 (2005).

207. Ogasahara, K., Sorai, M. & Suga, H. Thermodynamic Properties of Ferrocene Crystal. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **71,** 189–211 (2011).

208. Edwards, J. W., Kington, G. L. & Mason, R. The thermodynamic properties of ferrocene. Part 1.?The low-temperature transition in ferrocene crystals. *Trans. Faraday Soc.* **56,** 660 (1960).

209. Dunitz, J. D. Organic Chemistry: Its Language and Its State of the Art. *M. Volkan Kisakürek, ed.* **1,** p.9–23 (1993).

210. Sun, S. & Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 8204–8205 (2002).

211. Arelaro, A. D., Lima, E., Rossi, L. M., Kiyohara, P. K. & Rechenberg, H. R. Ion dependence of magnetic anisotropy in MFe2O4 (MFe, Co, Mn) nanoparticles synthesized by high-temperature reaction. *J. Magn. Magn. Mater.* **320,** e335–e338 (2008).

212. Baccan, M. M., Chiarelli-Neto, O., Pereira, R. M. S. & Espósito, B. P. Quercetin as a shuttle for labile iron. *J. Inorg. Biochem.* **107,** 34–9 (2012).

213. Esposito, B. P. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* **102,** 2670–2677 (2003).

214. Ortega, P. *et al.* Cytochemical characterization of gill and hepatopancreatic cells of the crab Ucides cordatus (Crustacea, Brachyura) validated by cell metal transport. *Iheringia. Série Zool.* **104,** 347–354 (2014).

215. Puglisi, A. *et al.* Synthesis, physicochemical properties and antioxidant activity of deferiprone-cyclodextrin conjugates and their iron(III) complexes. *Dalton Trans.* **41,** 2877–83 (2012).

216. Evans, P., Kayyali, R., Hider, R. C., Eccleston, J. & Porter, J. B. Mechanisms for the shuttling of plasma non-transferrin-bound iron (NTBI) onto deferoxamine by deferiprone. *Transl. Res.* **156,** 55–67 (2010).

217. Silva, A. M. N., Kong, X., Parkin, M. C., Cammack, R. & Hider, R. C. Iron(iii) citrate speciation in aqueous solution. *Dalt. Trans.* 8616 (2009). doi:10.1039/b910970f

218. Alta, E. C. P. *et al.* Desferrioxamine-caffeine (DFCAF) as a cell permeant moderator of the oxidative stress caused by iron overload. *BioMetals* **27,** 1351–1360 (2014).

219. Goswami, D., Machini, M. T., Silvestre, D. M., Nomura, C. S. & Esposito, B. P. Cell penetrating peptide (CPP)-conjugated desferrioxamine for enhanced neuroprotection: synthesis and in vitro evaluation. *Bioconjug. Chem.* **25,** 2067–80 (2014).

220. Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H. G. de & Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* **30,** 441–449 (2007).

221. Hermes-Lima, M. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* **19,** 271–280 (1995).

222. Jiang, Z.-Y., Woollard, A. C. S. & Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26,** 853–856 (1991).

223. Ortega, P. Cadmium transport in gill cells of the mangrove crab Ucides cordatus (Dissertação de Mestrado). (Universidade de São Paulo, 2013).

224. Ortega, P., Custódio, M. R. & Zanotto, F. P. Characterization of cadmium plasma membrane transport in gills of a mangrove crab Ucides cordatus. *Aquat. Toxicol.* **157,** 21–9 (2014).

225. Sá, M. G. & Zanotto, F. P. Characterization of copper transport in gill cells of a mangrove crab Ucides cordatus. *Aquat. Toxicol.* **144-145,** 275–83 (2013).

226. Ortega, P., e Sá, M. G., Custódio, M. R. & Zanotto, F. P. Separation and viability of gill and hepatopancreatic cells of a mangrove crab Ucides cordatus. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **47,** 346–349 (2011).

227. Pond, W. G., Lowrey, R. S., Maner, J. H. & Loosli, J. K. Parenteral Iron Administration to Sows during Gestation or Lactation. *J. Anim. Sci.* **20,** 747–750 (1961).

228. Zimmerman, D. R., Speer, V. C., Hays, V. W. & Catron, D. V. Injectable Iron-Dextran and Several Oral Iron Treatments for the Prevention of Iron-Deficiency Anemia of Baby Pigs. *J. Anim. Sci.* **18,** 1409–1415 (1959).

229. Ullrey, D. E. *et al.* Oral and Parenteral Administration of Iron in the Prevention and Treatment of Baby Pig Anemia. *J. Anim. Sci.* **18,** 256–263 (1959).

230. Egeli, A. K. & Framstad, T. An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res. Vet. Sci.* **66,** 179–84 (1999).

231. Ahsan, N. Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: a single center comparative study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9,** 664–8 (1998).

232. Singh, K., Fong, Y. F. & Kuperan, P. A comparison between intravenous iron polymaltose complex (Ferrum Hausmann) and oral ferrous fumarate in the treatment of iron deficiency anaemia in pregnancy. *Eur. J. Haematol.* **60,** 119–24 (1998).

233. Meyer, M. P., Haworth, C., Meyer, J. H. & Commerford, A. A comparison of oral and intravenous iron supplementation in preterm infants receiving recombinant erythropoietin. *J. Pediatr.* **129,** 258–63 (1996).

234. Van Wyck, D. B. *et al.* Safety and efficacy of iron sucrose in patients sensitive to iron dextran: North American clinical trial. *Am. J. Kidney Dis.* **36,** 88–97 (2000).

235. Szarfarc, S. C., de Cassana, L. M., Fujimori, E., Guerra-Shinohara, E. M. & de Oliveira, I. M. Relative effectiveness of iron bis-glycinate chelate (Ferrochel) and ferrous sulfate in the control of iron deficiency in pregnant women. *Arch. Latinoam. Nutr.* **51,** 42–7 (2001).

236. Kamdi, S. P. & Palkar, P. J. Efficacy and safety of ferrous asparto glycinate in the management of iron deficiency anaemia in pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol.* **35,** 4–8 (2015).

237. Geisser, P. Safety and efficacy of iron(III)-hydroxide polymaltose complex / a review of over 25 years experience. *Arzneimittelforschung.* **57,** 439–52 (2007).

238. Reddy, P. S., Adsul, B. B., Gandewar, K., Korde, K. M. & Desai, A. Evaluation of efficacy and safety of iron polymaltose complex and folic acid (Mumfer) vs iron formulation (ferrous fumarate) in female patients with anaemia. *J. Indian Med. Assoc.* **99,** 154–5 (2001).

239. Wojaczyński, J., Latos-Grażyński, L. & Głowiak, T. Characterization of High-Spin and Low-Spin Iron(III) Quinoxalinotetraphenylporphyrin. *Inorg. Chem.* **36,** 6299–6306 (1997).

240. Somsook, E. *et al.* Interactions between iron(III) and sucrose, dextran, or starch in complexes. *Carbohydr. Polym.* **61,** 281–287 (2005).

241. Scheinost†† A.C. Scheinost current address: Dep. of Plant and Soil Sciences, U. of D. N. D. 19717. . A. C. & Schwertmann, U. Color Identification of Iron Oxides and Hydroxysulfates. **63,** 1463–1471 (1999).

242. Barot, B. S., Parejiya, P. B., Mehta, D. M., Shelat, P. K. & Shah, G. B. Physicochemical and structural characterization of iron-sucrose formulations: a comparative study. *Pharm. Dev. Technol.* **19,** 513–20 (2014).

243. Meléndez, E. Metallocenes as target specific drugs for cancer treatment. *Inorganica Chim. Acta* **393,** 36–52 (2012).

244. Nielsen, P. & Heinrich, H. C. Metabolism of iron from (3,5,5-trimethylhexanoyl) ferrocene in rats. *Biochem. Pharmacol.* **45,** 385–391 (1993).

245. Cable, E. E. & Isom, H. C. Metabolism of 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocene by Rat Liver: Release of Iron from 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocene by a Microsomal, Phenobarbital-Inducible Cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.* **27,** 255–260 (1999).

246. Cable, E. E. & Isom, H. C. Metabolism of 3,5,5-trimethylhexanoyl-ferrocene by rat liver: release of iron from 3,5,5-trimethylhexanoyl-ferrocene by a microsomal, phenobarbital-inducible cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.* **27,** 255–60 (1999).

247. Nielsen, P., Heinelt, S. & Düllmann, J. Chronic feeding of carbonyl-iron and TMH-ferrocene in rats. Comparison of two iron-overload models with different iron absorption. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **106,** 429–36 (1993).

248. Dive, D. & Biot, C. Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial. *ChemMedChem* **3,** 383–91 (2008).

249. Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L. A. & Brocard, J. S. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* **40,** 3715–8 (1997).

250. Pradines, B. *et al.* Ferrocene-chloroquine analogues as antimalarial agents: in vitro activity of ferrochloroquine against 103 Gabonese isolates of Plasmodium falciparum. *J. Antimicrob. Chemother.* **48,** 179–84 (2001).

251. Popenoe, D. D., Deinhammer, R. S. & Porter, M. D. Infrared spectroelectrochemical characterization of ferrocene-terminated alkanethiolate monolayers at gold. *Langmuir* **8,** 2521–2530 (1992).

252. Mohammadi, N., Ganesan, A., Chantler, C. T. & Wang, F. Differentiation of ferrocene D5d and D5h conformers using IR spectroscopy. *J. Organomet. Chem.* **713,** 51–59 (2012).

253. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. & Bryce, D. L. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (John Wiley & Sons, 2014).

254. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, G. S. K. *Introdução à Espectroscopía*. (Cengage Learning, 2010).

255. Skrabalak, S. E., Wiley, B. J., Kim, M., Formo, E. V. & Xia, Y. On the Polyol Synthesis of Silver Nanostructures: Glycolaldehyde as a Reducing Agent. *Nano Lett.* **8,** 2077–2081 (2008).

256. Miguel-Sancho, N. *et al.* Synthesis of Magnetic Nanocrystals by Thermal Decomposition in Glycol Media: Effect of Process Variables and Mechanistic Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51,** 8348–8357 (2012).

257. Soon, G. K. *et al.* Kinetics of monodisperse iron oxide nanocrystal formation by 'heating-up' process. *J. Am. Chem. Soc.* **129,** 12571–12584 (2007).

258. Smolensky, E. D., Park, H.-Y. E., Berquó, T. S. & Pierre, V. C. Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications - effect of anchoring group and ligand exchange protocol. *Contrast Media Mol. Imaging* **6,** 189–99

259. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72,** 4847–4854 (1950).

260. Li, H., Xia, H., Wang, D. & Tao, X. Simple synthesis of monodisperse, quasi-spherical, citrate-stabilized silver nanocrystals in water. *Langmuir* **29,** 5074–9 (2013).

261. Park, J., Joo, J., Kwon, S. G., Jang, Y. & Hyeon, T. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46,** 4630–60 (2007).

262. Wetterskog, E. *et al.* Precise control over shape and size of iron oxide nanocrystals suitable for assembly into ordered particle arrays. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **15,** 055010 (2014).

263. Moya, C., Batlle, X. & Labarta, A. The effect of oleic acid on the synthesis of Fe3-xO4 nanoparticles over a wide size range. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17,** 27373–9 (2015).

264. Chun Zeng, H. Ostwald Ripening: A Synthetic Approach for Hollow Nanomaterials. *Curr. Nanosci.* **3,** 177–181 (2007).

265. Barbeta, V. B., Jardim, R. F., Kiyohara, P. K., Effenberger, F. B. & Rossi, L. M. Magnetic properties of Fe[sub 3]O[sub 4] nanoparticles coated with oleic and dodecanoic acids. *J. Appl. Phys.* **107,** 073913 (2010).

266. Redl, F. X. *et al.* Magnetic, electronic, and structural characterization of nonstoichiometric iron oxides at the nanoscale. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 14583–99 (2004).

267. Butter, K., Bomans, P. H. H., Frederik, P. M., Vroege, G. J. & Philipse, A. P. Direct observation of dipolar chains in iron ferrofluids by cryogenic electron microscopy. *Nat. Mater.* **2,** 88–91 (2003).

268. Shen, L., Laibinis, P. E. & Hatton, T. A. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir* **15,** 447–453 (1999).

269. Patterson, A. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Phys. Rev.* **56,** 978–982 (1939).

270. Jolivet, J.-P., Henry, M. & Livage, J. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis: From Solution to Solid State*. (Wiley, 2000).

271. Lima, E., Vargas, J. M., Rechenberg, H. R. & Zysler, R. D. Interparticle interactions effects on the magnetic order in surface of FeO4 nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8,** 5913–20 (2008).

272. Gajbhiye, N. S. *et al.* Mössbauer and magnetic studies of MFe2O4(M = Co, Ni) nanoparticles. *Hyperfine Interact.* **165,** 153–159 (2006).

273. Zhao, S.-Y. *et al.* Synthesis of magnetic nanoparticles of Fe3O4 and CoFe2O4 and their surface modification by surfactant adsorption. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27,** 237–242

274. Knobel, M. *et al.* Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8,** 2836–57 (2008).

275. Aizawa, H. Morphology of polysorbate 80 (Tween 80) micelles in aqueous 1,4-dioxane solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **42,** 592–596 (2009).

276. Maqbool, Q., Singh, C., Paul, A. & Srivastava, A. Uniform spheroidal nanoassemblies of magnetite using Tween surfactants: influence of surfactant structure on the morphology and electrochemical performance. *J. Mater. Chem. C* **3,** 1610–1618 (2015).

277. Perez De Berti, I. O. *et al.* Alternative low-cost approach to the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by thermal decomposition of organic precursors. *Nanotechnology* **24,** 175601 (2013).

278. Dong, Z., Wang, Q. & Du, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *J. Memb. Sci.* **280,** 37–44 (2006).

279. Abbiss, J. B., Chubb, T. W. & Pike, E. R. Laser Doppler anemometry. *Opt. Laser Technol.* **6,** 249–261 (1974).

280. Holland, J. P. *et al.* Annotating MYC status with 89Zr-transferrin imaging. *Nat. Med.* **18,** 1586–91 (2012).

281. Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **119,** 758–68 (1964).

282. Miyahara, T. Determination of the stability constants of copper (II)-calcein complexes. *Bunseki Kagaku* **26,** 615 (2010).

283. *The Kinetics and Thermodynamics of Copper Complexation in Aquatic Systems*. (Woods Hole oceanographic institution, 1988).

284. Graczykowski, B. & Dobek, A. Iron-dextran complex: geometrical structure and magneto-optical features. *J. Colloid Interface Sci.* **363,** 551–6 (2011).

285. Van Wyck, D., Anderson, J. & Johnson, K. Labile iron in parenteral iron formulations: a quantitative and comparative study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19,** 561–565 (2004).

286. Johnson, D. *et al.* Oral versus intravenous iron supplementation in peritoneal dialysis patients. *Perit. Dial. Int.* **21,** S231–235 (2001).

287. Surles, T. Spectrophotometric determination of sodium citrate in blood. *Microchem. J.* **19,** 153–156 (1974).

288. Königsberger, L.-C., Königsberger, E., May, P. M. & Hefter, G. T. Complexation of iron(III) and iron(II) by citrate. Implications for iron speciation in blood plasma. *J. Inorg. Biochem.* **78,** 175–184 (2000).

289. Evans, R. W. *et al.* Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **13,** 57–74 (2007).

290. Silva, A. M. N., Kong, X., Parkin, M. C., Cammack, R. & Hider, R. C. Iron(III) citrate speciation in aqueous solution. *Dalton Trans.* 8616–25 (2009). doi:10.1039/b910970f

291. Scharlach, C. *et al.* Synthesis of acid-stabilized iron oxide nanoparticles and comparison for targeting atherosclerotic plaques: evaluation by MRI, quantitative MPS, and TEM alternative to ambiguous Prussian blue iron staining. *Nanomedicine* **11,** 1085–95 (2015).

292. Kotsmar, C. *et al.* Stable Citrate-Coated Iron Oxide Superparamagnetic Nanoclusters at High Salinity. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49,** 12435–12443 (2010).

293. Crichton, R. R., Danielson, B. G. & Geisser, P. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. (2008).

294. Danielson, B. G. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15 Suppl 2,** S93–8 (2004).

295. Graczykowski, B. & Dobek, A. Iron-dextran complex: geometrical structure and magneto-optical features. *J. Colloid Interface Sci.* **363,** 551–6 (2011).

296. Bartošík, M. *et al.* Electrochemical analysis of a novel ferrocene derivative as a potential antitumor drug. *Analyst* **140,** 5864–5867 (2015).

297. Kopf-Maier, P., Kopf, H. & Neuse, E. W. Ferrocenium Salts:The First Antineoplastic Iron Compounds. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **23,** 456–457 (1984).

298. Ornelas, C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem.* **35,** 1973 (2011).

299. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*. (John Wiley & Sons, 2005).

300. Biot, C. *et al.* Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity. *Mol. Pharm.* **2,** 185–193 (2005).

301. Harding, M. M. & Mokdsi, G. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr. Med. Chem.* **7,** 1289–303 (2000).

302. Abeysinghe, P. M. & Harding, M. M. Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. *Dalton Trans.* 3474–82 (2007). doi:10.1039/b707440a

303. Warren, A. D. Synthesis and Characterization of Cyclopentadienyl Transition Metal Complexes Bearing Tetrafluoropyridyl Substituents. (Virginia Tech, 2001).

304. Strahm, U., Patel, R. C. & Matijevic, E. Thermodynamics and kinetics of aqueous iron(III) chloride complexes formation. *J. Phys. Chem.* **83,** 1689–1695 (1979).

305. Mizutani, K., Toyoda, M. & Mikami, B. X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1820,** 203–11 (2012).

306. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2,** 751–60 (2007).

307. SUN, C., LEE, J. & ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60,** 1252–1265 (2008).

308. Weissleder, R. & Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452,** 580–9 (2008).

309. Cai, W. & Chen, X. Nanoplatforms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small* **3,** 1840–54 (2007).

310. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **3,** 891–5 (2004).

311. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* **19,** 311–30 (2005).

312. Jun, Y.-W. *et al.* Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127,** 5732–3 (2005).

313. Yu, W. W. *et al.* Forming biocompatible and nonaggregated nanocrystals in water using amphiphilic polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **129,** 2871–9 (2007).

314. Figuerola, A. *et al.* One-Pot Synthesis and Characterization of Size-Controlled Bimagnetic FePt−Iron Oxide Heterodimer Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **130,** 1477–1487 (2008).

315. Veiseh, O. *et al.* Optical and MRI Multifunctional Nanoprobe for Targeting Gliomas. *Nano Lett.* **5,** 1003–1008 (2005).

316. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. (Springer US, 1997). doi:10.1007/978-1-4757-6482-6

317. Chen, D. & Gao, L. A facile route for high-throughput formation of single-crystal α-Fe2O3 nanodisks in aqueous solutions of Tween 80 and triblock copolymer. *Chem. Phys. Lett.* **395,** 316–320 (2004).

318. Wang, Y. M. *et al.* Synthesis of Fe3O4 magnetic fluid used for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **323,** 2953–2959 (2011).

319. Naqvi, S. *et al.* Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int. J. Nanomedicine* **5,** 983–9 (2010).

320. Maqbool, Q., Singh, C., Paul, A. & Srivastava, A. Uniform spheroidal nanoassemblies of magnetite using Tween surfactants: influence of surfactant structure on the morphology and electrochemical performance. *J. Mater. Chem. C* **3,** 1610–1618 (2015).

321. Noh, J., Osman, O. I., Aziz, S. G., Winget, P. & Brédas, J.-L. Magnetite Fe 3 O 4 (111) Surfaces: Impact of Defects on Structure, Stability, and Electronic Properties. *Chem. Mater.* **27,** 5856–5867 (2015).

322. Rudnev, A. V. *et al.* Ferrocene-terminated alkanethiol self-assembled monolayers: An electrochemical and in situ surface-enhanced infra-red absorption spectroscopy study. *Electrochim. Acta* **107,** 33–44 (2013).

323. Li, S. *et al.* Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. *Biomaterials* **34,** 902–11 (2013).

324. Gorski, C. A., Nurmi, J. T., Tratnyek, P. G., Hofstetter, T. B. & Scherer, M. M. Redox behavior of magnetite: implications for contaminant reduction. *Environ. Sci. Technol.* **44,** 55–60 (2010).

325. Fukumura, H. *et al.* Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. *J. Physiol. Sci.* **62,** 251–7 (2012).

326. Souza, K. C. de, Mohallem, N. D. S. & Sousa, E. M. B. de. Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em Biomedicina. *Quim. Nova* **34,** 1692–1703 (2011).

327. Rodríguez-Luccioni, H. L. *et al.* Enhanced reduction in cell viability by hyperthermia induced by magnetic nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **6,** 373–80 (2011).

328. Song, M. Y., Stark, J. D. & Brown, J. J. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* **16,** 2494–2500 (1997).

329. Jiang, Z.-Y., Hunt, J. V. & Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202,** 384–389 (1992).

330. Pinheiro, M. A. A., Duarte, L. F. A., Toledo, T. R., Adam, M. L. & Torres, R. A. Habitat monitoring and genotoxicity in Ucides cordatus (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ. Monit. Assess.* **185,** 8273–85 (2013).

331. Corrêa Junior, J. D., Allodi, S., Amado-Filho, G. M. & Farina, M. Zinc accumulation in phosphate granules of Ucides cordatus hepatopancreas. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **33,** 217–221 (2000).

332. Ahearn, G. A. *et al.* Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol. Biochem. Zool.* **72,** 1–18

333. Huebers, H. A., Huebers, E., Finch, C. A. & Martin, A. W. Characterization of an invertebrate transferrin from the crabCancer magister (Arthropoda). *J. Comp. Physiol. ? B* **148,** 101–109 (1982).

334. Guary, J. C. & Négrel, R. Plutonium and iron association with metal-binding proteins in the crab Cancer pagurus (L.). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **42,** 87–98 (1980).

335. Shriver, D. F. & Atkins, P. W. *Química inorgânica*. (2008).

336. Vogt, G. Enclosure of bacteria by the rough endoplasmic reticulum of shrimp hepatopancreas cells. *Protoplasma* **171,** 89–96 (1992).

337. Nguyen-Legros, J., Cesaro, P., Gay, M. & Pollin, B. [Evolution of the storage site of iron-dextran after retrograde axonal transport in the rat central nervous system (author's transl)]. *Acta Neuropathol.* **54,** 101–12 (1981).

338. McVeigh, A. Mathematical modelling of hepatopancreatic digestive cell of the blue mussel. (2008).

339. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 597–608 (2009).

340. Miaczynska, M. & Stenmark, H. Mechanisms and functions of endocytosis. *J. Cell Biol.* **180,** 7–11 (2008).

341. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78,** 857–902 (2009).

342. Honolulu, U. of H. at. Cellular Mechanism of Heavy Metal Detoxification in Crustaceans. *United States Environmental Protection Agency* project 6 (1998).

343. Pinto, J. P. *et al.* Physiological implications of NTBI uptake by T lymphocytes. *Front. Pharmacol.* **5,** 24 (2014).

344. Jacobs, W. Untersuchungen uber die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarmdruse von Astacus leptodactylus. *Zeitschrift for Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* **8,** 1–62 (1928).

345. Hirsch, G. C. & Buchmann, W. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdruse von Astacus leptodactylus. *Z. Vgl. Physiol.* **12,** 559–578 (1930).

346. Stanier, J. E., Woodhouse, M. A. & Griffin, R. L. Light- and electron-microscopic observations on the metacercaria of a Spelotrema sp. (Trematoda: Microphallidae) encysted in Carcinus maenas. *J. Invertebr. Pathol.* **10,** 269–282 (1968).

347. Al-Mohanna, S. Y. & Nott, J. A. R-cells and the digestive cycle in Penaeus semisulcatus (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* **95,** 129–137 (1987).

348. Brunet, M., Arnaud, J. & Mazza, J. Gut structure and digestive cellular processes in marine Crustacea. *Oceanogr. Mar. Biol. An Annu. Rev.* (1994).

349. Loizzi, R. F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **113,** 420–40 (1971).

350. Corrêa, J. D. *et al.* Tissue distribution, subcellular localization and endocrine disruption patterns induced by Cr and Mn in the crab Ucides cordatus. *Aquat. Toxicol.* **73,** 139–54 (2005).

351. Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorbtive (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* **79,** 476–482 (1990).

352. Sousa, L. G., Cuartas, E. I. & Petriella, A. M. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of Palaemonetes argentinus (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell* **29,** 25–31 (2005).

353. Jahn, M. R. *et al.* Iron Oxide/Hydroxide Nanoparticles with Negatively Charged Shells Show Increased Uptake in Caco-2 Cells. *Mol. Pharm.* **9,** 1628–1637 (2012).

354. Treuel, L., Jiang, X. & Nienhaus, G. U. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **10,** 20120939 (2013).

355. Shang, L., Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J. Nanobiotechnology* **12,** 5 (2014).

Capítulo 8

Súmula curricular

8. SÚMULA CURRICULAR

HECTOR AGUILAR VITORINO – Lima – Perú

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2008	Bacharel em Química	Universidad Nacional de Ingeniería – Lima-Perú*
2010	Especialista em HSEQ	Universidad Nacional de Ingeniería – Lima-Perú
2015	Doutorando em Química	Universidade de São Paulo – São Paulo- Brasil

*****Selecionado no terço superior na Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) – Lima – Perú (2007).

Trabalho de conclusão de curso:

I. "GENERALIDADES DEL PROCESO SOL GEL PARA LA OBTENCIÓN DE ÓXIDOS DE ALUMINIO" (Julho 2008). (Orientador : Hugo Alarcón Cavero)

II. "SÍNTESIS DE γ-ALÚMINA POR EL MÉTODO SOL-GEL EN MEDIO NO ACUOSO" (Dezembro 2008). (Orientador : Hugo Alarcón Cavero)

2) Histórico profissional

Professor principal em ciências básicas (Química, Matemáticas e Física), Academias NOVAUNI – Lima– Perú: 2004-2009.

Estágio em docência: Auxiliar de laboratório de Química Orgânica (50h), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) –Lima–Perú: 2008 (março-julho).

Supervisor de Laboratório Químico de controle de qualidade: Fabrica de Mechas y Explosivos (FAMESA) – Lima – Perú: 2008 (janeiro-julho).

Estágio em docência: Auxiliar em laboratório de Química Analítica (50h), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) –Lima–Perú: 2008 (julho-dezembro).
Assistente de Laboratório de pesquisa: Coorporación Peruana de Productos Químicos (CPPQ) Lima – Perú:2009-2011 (janeiro-fevereiro).

Professor de ensino médio, Institución educativa Oscar Miro Quesada (OMQ) – Lima – Perú: 2011 (março-junho).

Professor de pré-universitário, Academia pre-militar Husares de Junín – Lima – Perú: 2011 (março-junho).

Doutorando em pesquisa em Química, Laboratório de Química Bioinorgânica e Metalofármacos (LAQBAM), Instituto de Química – USP: 2011-2015.

Monitor da disciplina prática/teórica de Química Geral II, alunos do curso bacharelado em química ambiental e licenciatura, Instituto de Química (USP): 2011 (julho-dezembro).

Monitor da disciplina prática/teórica de Química Geral I, alunos do curso bacharelado em química ambiental e licenciatura, Instituto de Química (USP): 2012 (fevereiro-julho).

Monitor da disciplina prática/teórica de Química Geral II, alunos do curso bacharelado em química ambiental e licenciatura, Instituto de Química (USP): 2012 (agosto-dezembro).

Monitor da disciplina prática/teórica de Química Analítica I, alunos do curso bacharelado em química ambiental e licenciatura, Instituto de Química (USP): 2013 (fevereiro-julho).

Monitor da disciplina prática/teórica de Química Ambiental Experimental, alunos do curso bacharelado em química ambiental e licenciatura, Instituto de Química (USP): 2013 (agosto -dezembro).

Doutorado Sanduíche: Especiação de metalofármacos de ferro em ligantes de soro sanguíneo. King's College London, Londres, Reino Unido. Orientador: Professor Doutor Robert Hider. 2015 (Abril-Julho).

3) Artigos completos publicados em periódicos

1. **VITORINO, HECTOR AGUILAR**; MANTOVANELLI, LUCA; ZANOTTO, FLAVIA PINHEIRO; ESPÓSITO, BRENO PANNIA. Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. Plos One, v. 10, p. e0121997, 2015.

2. GOSWAMI, D.; **VITORINO, H. A.**; MACHINI, M. T.; ESPOSITO, B. P. Self-assembled penetratin-deferasirox micelles as potential carriers for hydrophobic drug delivery. Biopolymers Peptide Science, 2015.
3. GOSWAMI, D; **VITORINO, H. A.**; ALTA, R. Y. P.; SILVESTRE, D. M; NOMURA, C. S ; MACHINI, M. T. ; ESPOSITO, B. P. . Deferasirox-TAT(47-57) peptide conjugate as a water soluble, bifunctional iron chelator with potential use in neuromedicine. BioMetals (Oxford), 2015.

Link para a página MyResearcherID (ISI): http://www.researcherid.com/rid/J-2749-2015

4) Resumos publicados em anais de congressos e apresentações orais

1. **VITORINO, H. A.**; ZANOTTO, F.; MANTOVANELLI, L; ESPOSITO, B. P. Iron metallodrugs: stability, redox activity and toxicity against *Artemia salina*. In: 5th Congress of the International Bioiron Society (Bioiron 2013), 2013, London. American Journal of Hematology, 2013. v. 88. p. E47-E47. **(Apresentação oral).**

2. ALTA, R. Y. P. ; **VITORINO, H. A.** ; KATZIN, A. M ; NEGRON, A. C. V. ; ESPOSITO, B. P. . Synthesis, characterization and anti-malarial activity of a bi-nuclear copper(II) acetate-quinine complex. In: 12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, 2013, Punta del Este, Uruguay. Book of abstracts, 2013.

3. GOSWAMI, D.; **VITORINO, H. A.** ; MACHINI, M. T. ; ESPOSITO, B. P. . Chelator-peptide conjugate as protector against iron-induced toxicity. In: 15th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2013, Campos do Jordão. Book of abstracts, 2013.

4. NAOUM, F.; RUIZ, M ; RUIZ, L ; **VITORINO, H. A.** ; ESPOSITO, B. P. . Effect of labile plasma iron on hepcidin levels of patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation. In: Gordon Research Conference Metals in Biology, 2014, Ventura. Book of abstracts, 2014.

5. GOSWAMI, D. ; **VITORINO, H. A.** ; SILVESTRE, D. M. ; NOMURA, C. S. ; MACHINI, M. T. ; ESPOSITO, B. P. . Peptide-Desferrioxamine Conjugates Against Iron-Induced Toxicity. In: XVII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry (BMIC), 2014, Araxá, Minas Gerais, Brasil. Book of abstracts, 2014.

6. **VITORINO, H. A.**; ORTEGA, P. ; ZANOTTO, F. ; ESPOSITO, B. P. Iron transport in hepatopancreatic cells of the mangrove crab *Ucides Cordatus* : Use of different iron compounds of pharmacologic interest. In: IV Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry - V WOQUIBIO, 2014, Chascomús Buenos Aires. Book of abstracts, 2014.

7. **VITORINO, H. A.**; ORTEGA, P.; ZANOTTO, F.; ESPOSITO, B. P. Actividad de compuestos de hierro en modelos de toxicidad acuática. 2014. Bioinorganic: Metal Overload in Medicine and Environment (BIOMET 2014), 2014. Lima-Perú. **(Apresentação oral).**

8. **VITORINO, H. A.**; ORTEGA, P.; ZANOTTO, F.; ESPOSITO, B. P. Water soluble magnetite nanoparticles Fe_3O_4 – oleic acid – tween 80: Stability, redox activity and transport in hepatopancreatic cells of the mangrove crab *Ucides cordatus*. In: 6th Congress of the International Bioiron Society (Bioiron 2015), 2015, Zhejiang University, Hangzhou, China. Book of abstracts, 2015.

9. **VITORINO, H. A.**; ESPOSITO, B. P. Iron transport: Hepatopancreatic cells of Crabs as model of iron storage in environment. 2015. Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment (BIOMET 2015), 2015. Lima-Perú. **(Apresentação oral).**

5) Organização de eventos

a) Organizador de evento com interesse científico, I Simposium: Bioinorganic: Metal Overload in Medicine and Environment (BIOMET 2014), Dezembro 22, 2014. Universidad Nacional de Ingeniría (UNI).Lima-Perú. (http://www.bicsociety.org)

b) Organizador de evento com interesse científico, II Simposium: Bioinorganic Chemistry in Medicine and Environment (BIOMET 2015), Dezembro 21 – 22, 2015. Universidad Nacional de Ingeniría (UNI).Lima-Perú. (http://www.bicsociety.org)

6) Financiamento à pesquisa:

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (2011-2015)

Doutorado Direto.

Projeto: Compostos de ferro de interesse farmacológico: avaliação da estabilidade de metalofármacos e capacidade de geração de reservatórios de ferro lábil.

Orientador: Professor Dr. Breno Pannia Espósito.
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (2015)

Doutorado Sanduiche.

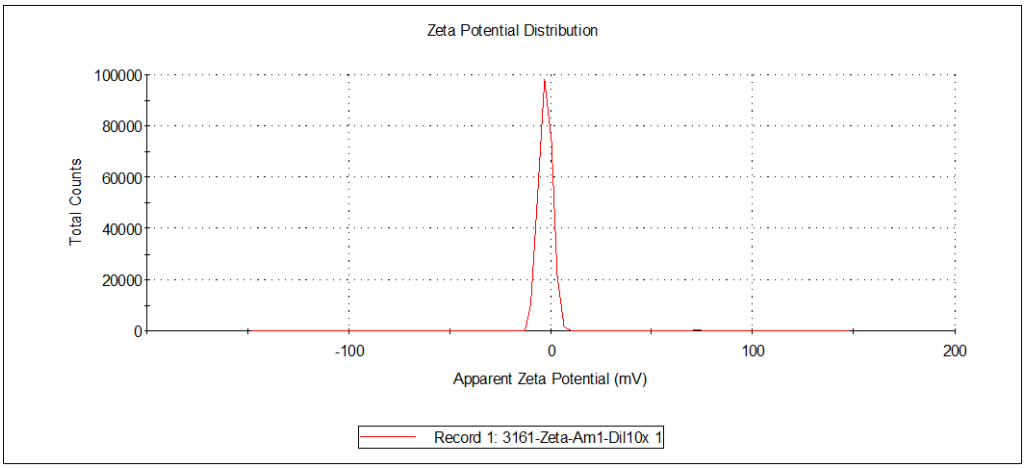
Projeto: Especiação de metalofármacos de ferro em ligantes de soro sanguíneo.

Orientador: Professor Dr. Robert Hider. King's College London, Londres, Reino Unido.

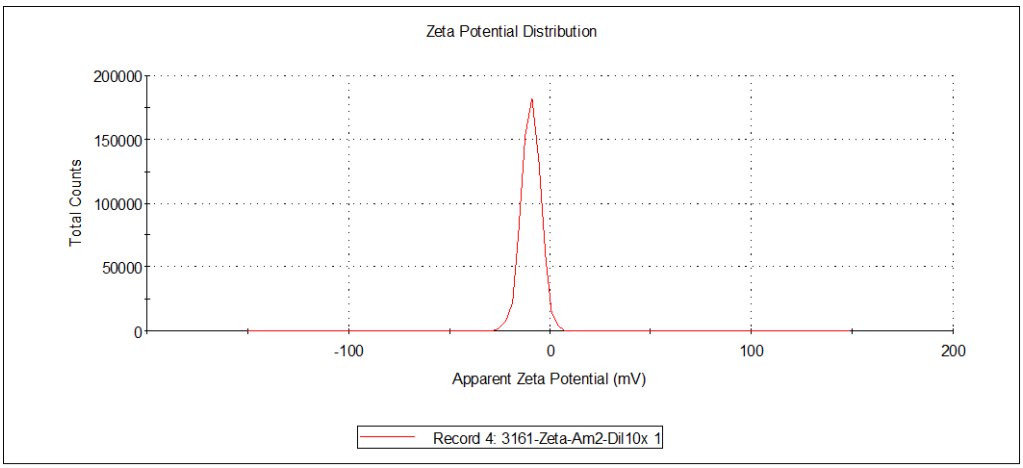
Capítulo 9

Anexos

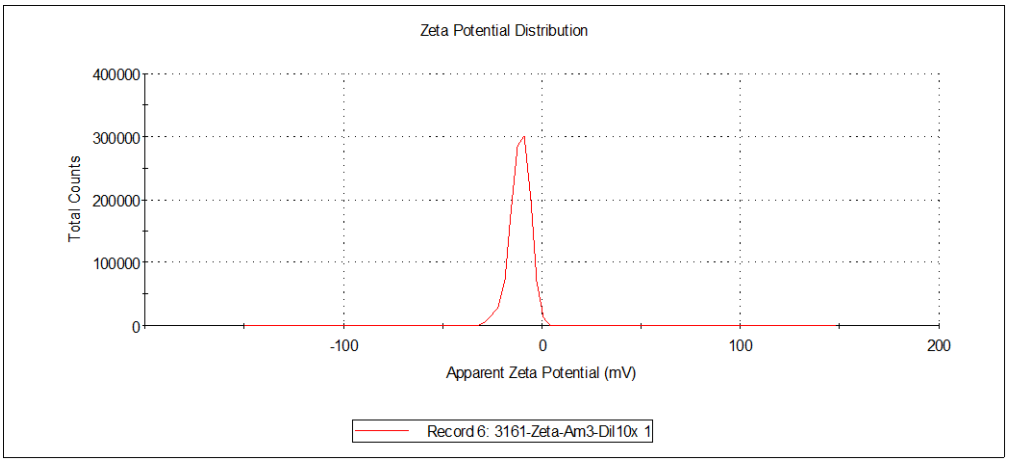
9. ANEXOS



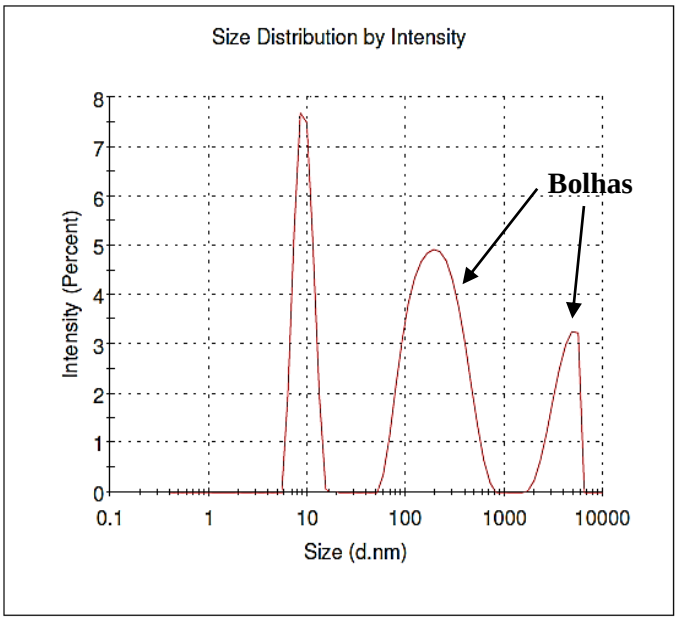
Anexo 9.1: Potencial Zeta da magnetita de 5 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.



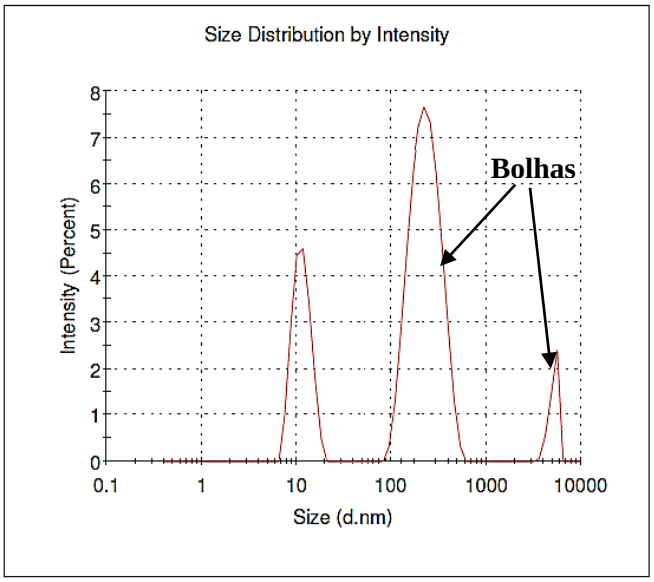
Anexo 9.2: Potencial Zeta da magnetita de 8 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.



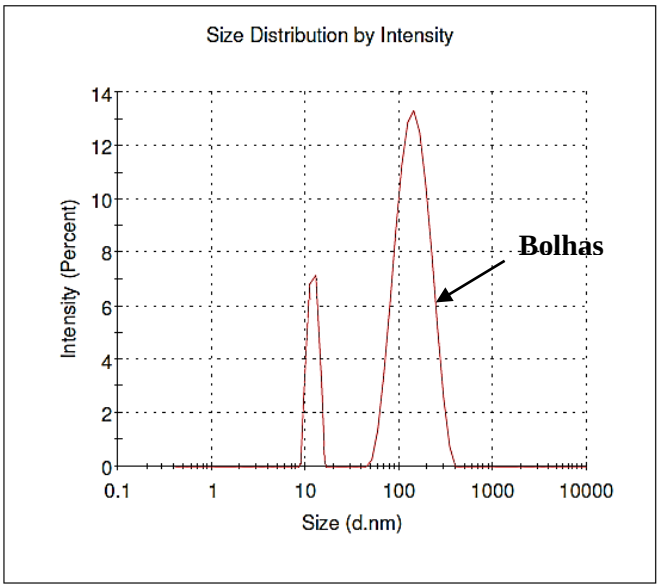
Anexo 9.3: Potencial Zeta da magnetita de 8 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.



Anexo 9.4: Distribuição do tamanho 5 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.



Anexo 9.5: Distribuição do tamanho 8 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.



Anexo 9.6: Distribuição do tamanho 12 nm revestida com ácido oleico e suspendida em meio aquoso com Tween 80.

Anexo 9.7: Artigo publicado em abril de 2015, revista Plos One. Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina.*

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*

Hector Aguilar Vitorino[1☯], Luca Mantovanelli[2☯], Flavia Pinheiro Zanotto[2☯], Breno Pannia Espósito[1☯]*

1 Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

☯ These authors contributed equally to this work.
* breno@iq.usp.br

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Vitorino HA, Mantovanelli L, Zanotto FP, Espósito BP (2015) Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. PLoS ONE 10(4): e0121997. doi:10.1371/journal.pone.0121997

Academic Editor: Fanis Missirlis, CINVESTAV-IPN, MEXICO

Received: October 15, 2014

Accepted: February 5, 2015

Published: April 7, 2015

Copyright: © 2015 Vitorino et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: HAV received a PhD grant from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil. This work was funded by São Paulo Research Foundation, Brazil (2011/50318-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Iron metallodrugs comprise mineral supplements, anti-hypertensive agents and, more recently, magnetic nanomaterials, with both therapeutic and diagnostic roles. As biologically-active metal compounds, concern has been raised regarding the impact of these compounds when emitted to the environment and associated ecotoxicological effects for the fauna. In this work we assessed the relative stability of several iron compounds (supplements based on glucoheptonate, dextran or glycinate, as well as 3,5,5-trimethylhexanoyl (TMH) derivatives of ferrocene) against high affinity models of biological binding, calcein and aprotransferrin, via a fluorimetric method. Also, the redox-activity of each compound was determined in a physiologically relevant medium. Toxicity toward *Artemia salina* at different developmental stages was measured, as well as the amount of lipid peroxidation. Our results show that polymer-coated iron metallodrugs are stable, non-redox-active and non-toxic at the concentrations studied (up to 300 μM). However, TMH derivatives of ferrocene were less stable and more redox-active than the parent compound, and TMH-ferrocene displayed toxicity and lipid peroxidation to *A. salina*, unlike the other compounds. Our results indicate that iron metallodrugs based on polymer coating do not present direct toxicity at low levels of emission; however other iron species (eg. metallocenes), may be deleterious for aquatic organisms. We suggest that ecotoxicity depends more on metal speciation than on the total amount of metal present in the metallodrugs. Future studies with discarded metallodrugs should consider the chemical speciation of the metal present in the composition of the drug.

Introduction

Metallodrugs are either organometallic or coordination compounds designed to have pharmacological activity. Although several metal derivatives have long been used to treat diseases such as arthritis, obsessive-compulsive disorder, stomach ulcer and microbial infestations, it was only after the advent of cisplatin, used for the treatment of cancer in the 1960's, that metal-based compounds with medicinal properties received systematic attention [1]. More often than

not, the association of a metal ion to an organic molecule, i.e. a metallodrug, can lead to synergistic activity that may modulate either the effect of the metal or the properties of the organic molecule [2].

Approved iron metallodrugs include human or veterinary supplements based on the association of iron to a sugar- or amino acid-based coating. Also, the anti-hypertensive agent sodium nitroprussiate is an iron-based compound. Candidate iron metallodrugs are the ferrocene derivatives such as 3,5,5-trimethylhexanoyl (TMH)-ferrocene and ferrochloroquine, with interesting antitumoral, antimalarial, antifungal and antibacterial activities [3–5]. Even though iron is an essential nutrient, the use of iron metallodrugs is not without risks. Indeed, iron overload and subsequent oxidative damage after the use of iron supplements [6] or ferrocene derivatives [7–10] have been reported in the literature.

From an environmental perspective, the levels of both metal derivatives [11] and pharmaceutical waste [12] have increased due to anthropogenic activity, accidental spills, and lack of control or regulations. Metallodrugs may be especially hazardous as they are designed for high biological activity and they carry a metal ion as a non-biodegradable core. Accidental exposure to excess of iron metallodrugs could be even more deleterious, since organisms lack the ability to handle iron as a potentially toxic element, as is the case for other metals such as mercury and lead. Iron toxicity could be restricted to undesirable effects for organisms (oxidative stress following iron overload) and/or could affect the ecosystem (water eutrophication).

As environmental chemistry information is lacking for iron metallodrugs, in this work we studied the aqueous stability and redox-active properties of two different classes of derivatives (polymer-coated and organometallic iron compounds), followed by the study of the mechanisms of toxicity to *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Artemiidae), chosen as a model of ecotoxicological impact. *Artemia* has been used as an ecotoxicological model for both inorganic nanomaterials in general [13–15] and for iron complexes studies [16–18].

Materials and Methods

Iron metallodrugs

Eight iron supplements with different organic coatings for the iron hydroxide core, for both human and veterinary use, were obtained from laboratories in Brazil. They consisted in the dextran derivatives Biovet (Biovet), Dexiron (FATEC), Ferro dextrano (Uzinas Chimicas Brasileiras), Fertal (Mogivet), Ferrodex (Tortuga), and also in Gleptoferril (iron glucoheptonate; Eurofarma), Neutrofer (iron glycinate, EMS Sigma Pharma) and Noripurum (iron maltose; Nycomed). All drugs were marketed as containing 100 mg/mL total iron concentration (except for Neutrofer and Noripurum, which were 50 mg/mL). The iron concentration of each sample was confirmed by furnace atomic absorption spectrometry in a Shimadzu AA-6300 equipment.

Ferrocene (Fc) and the reagents used in the preparation of its 3,5,5-trymethylhexanoyl (TMH) derivatives (Fig 1) were procured from Sigma-Aldrich. TMH-Fc and $(TMH)_2$-Fc were obtained by means of a described protocol [19] with modifications. Reactions were carried out in round flasks under N_2 atmosphere and magnetic stirring. TMH-Fc: a solution of $AlCl_3$ (1.3 g; 9.7 mmol) in 20 mL dichloromethane was mixed with 20 mL of dichloromethane containing 1.5 g (8.1 mmol) Fc. After, 1.4 g (8.1 mmol) TMH chloride was added dropwise and the system was kept in cold water (~ 3°C). $(TMH)_2$-Fc: a solution of $AlCl_3$ (1.8 g; 13 mmol) in 20 mL dichloromethane was mixed with 20 mL of dichloromethane containing 2.2 g (12 mmol) TMH chloride. After, a solution of 1.0 g (5.4 mmol) Fc in 20 mL dichloromethane was added dropwise and the system was kept in cold water (~ 3°C).

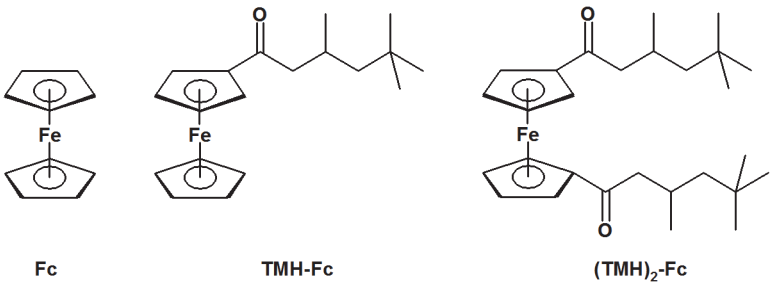


Fig 1. Metallocenes under study.

doi:10.1371/journal.pone.0121997.g001

The mixtures above were stirred at room temperature for 24 h, and then 50 g of ice were added. The organic phases were separated and concentrated by rotative evaporation. The oil residues were dissolved in 10 mL toluene and separated in a silica gel column (20 × 1 cm) eluted with this solvent. Eluates were analyzed by means of thin layer chromatography. Fractions containing TMH-Fc (R_f 0.43) or $(TMH)_2$-Fc (R_f = 0.26) were pooled and dried. The oily residues were redisolved in ethanol and the filtrates were dried at low pressure, resulting in reddish-brown oil products.

For TMH-Fc: Yield = 59% (1.6 g). Elemental analysis ($C_{19}H_{26}OFe$, 326.3 g.mol^{-1}): calculated (%), Fe = 17.12; C = 69.95; H = 8.03. Experimental (%), Fe = 17.22; C = 69.40; H = 7.96. Infrared peaks ($\nu_{max;}$ cm^{-1}): 3098, 2955, 2904, 2868, 1669, 1454, 1378, 1277, 1028, 482. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.20 (s, 4 aromatic H), δ 4.48–4.50 (t, 2 aromatic H), δ 4.77 (d, 2 aromatic H), δ 2.50–2.73 (dd, 2 methylene groups), δ 2.23–2.25 (m, main chain H), δ 1.00–1.03 (d, main chain H), δ 1.12–1.34 (m, 9 methylene H), δ 0.94 (m, 2 main chain H), δ 0.94 (s, 9 methylene H).

For $(TMH)_2$-Fc: Yield = 54% (1.3 g). Elemental analysis ($C_{28}H_{42}O_2Fe$, 466.5 g.mol^{-1}): calculated (%), Fe = 12.0, C = 72.1; H = 9.07. Experimental (%), Fe = 10.9, C = 69.6; H = 9.41. Infrared peaks ($\nu_{max;}$ cm^{-1}): 3218, 3104, 2952, 2901, 2869, 1730, 1675, 1375, 1275, 1028, 482. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.49–4.51 (t, 4 aromatic H), δ 4.78 (m, 4 aromatic H), δ 2.50–2.71 (dd, 4 H main chain), δ 2.20–2.26 (m, 2 H main chain), δ 2.23–2.25 (m, H main chain), δ 1.03–1.05 (m, 6 methylene groups), δ 1.15–1.36 (m, 4 H main chain), δ 0.95 (s, 18 H main chain).

Stability assays

Ecotoxicology models such as the Free-Ion Activity Model assume that only free (i.e., non-chelated) metal would be available for exerting any kind of biological activity against a target organism [20,21]. To verify whether or not free iron from the compounds studied here would correlate with toxicity to *Artemia salina*, stability assays were conducted in two media with different salinities (artificial seawater and physiological buffer). The amount of iron released from the iron metallodrugs was determined by means of competitive assays with the fluorescent probes calcein or fluorescein-transferrin (FlTf). Both probes display quick and stoichiometric fluorescence quenching upon iron binding [22]. FlTf was prepared by the coupling of 5-DTAF (5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein) to holo-transferrin as previously described [23]. In flat, transparent 96 wells microplates, aliquots of 10 μL of the iron compounds with different concentrations or 10 μL of iron standards (ferrous ammonium sulfate in aqueous solution) were treated with 190 μL of 2 μM calcein or 190 μL of 2 μM FlTf supplemented with 10 mM sodium bicarbonate. Calcein and FlTf solutions were prepared in either physiological buffer HBS (Hepes Buffered Saline, hepes 20 mM, NaCl 150 mM, Chelex 1 g/100 mL; pH 7.4) or artificial

seawater (sea salt at 3.5% salinity, pH 8.3, Chelex 1 g/100 mL, filtered under low pressure with a 0.22 nm cellulose membrane). The microplate was incubated at 37°C in a BMG FluoStar Optima instrument and the fluorescence of the samples ($\lambda_{exc}/\lambda_{emis}$ = 485/520 nm) was registered in 1 min intervals during 24 h. Experiments were performed in eight replicates and repeated four times.

Pro-oxidant activity of the iron compounds

The content of pro-oxidant iron in the metallodrugs under physiological conditions was assessed using the rate of dihydrorhodamine (DHR) oxidation in the presence of ascorbate [24]. In flat, transparent 96 wells microplates, 20 μL aliquots of 40 μM iron complexes in HBS (or 20 μL of ferric nitrilotriacetate standards) were treated with 180 μL of a mixture of DHR 50 μM and ascorbic acid 40 μM in HBS. Fluorescence intensity was registered at 37°C in a BMG FluoStar Optima instrument ($\lambda_{exc}/\lambda_{emis}$ = 485/520 nm) in 2 min intervals during 1 h. Oxidation rates (fluorescence/minute) were determined from the slope of the kinetic curves after the t = 15 min point. Experiments were performed in eight replicates and repeated 4 times.

Toxicity to *Artemia salina*

Toxicity tests to *Artemia salina* (INVE, Artemia High 5, Brazil) were conducted with adult individuals (after approximately 8 days hatching) and with individuals at stage 1 after hatching (time zero), according to described protocols [14,25].

Toxicity to adult *Artemia*. Male adult *A. salina* (400 individuals) were screened and transferred to a Petri dish for acclimatization for 1 h. Artificial seawater was prepared with distilled water and sea salt (Red Sea Salt) at 3.5% salinity, pH 8.3, and filtered under low pressure with a 0.22 nm cellulose membrane (Millipore). Different volumes of the iron compounds dissolved in HBS were transferred to 40 mL flasks (25 cm^2 tissue culture flask from TPP), and the volume was completed to 5 mL with artificial seawater to achieve concentrations between 0–1000 μM. Ten animals were then transferred to each flask and incubated at 30°C in the dark. After 24 h, live and dead animals were counted. This experiment was performed in triplicate.

Toxicity to stage 1 *Artemia*. *Artemia* was hatched in a tank (20×10×15 cm) using a thermostat, light source and air metering. Artificial seawater was prepared with distilled water and sea salt (Red Sea Salt) at 3.5% salinity, pH 8.3, and filtered under low pressure with a 0.22 nm cellulose membrane (Millipore). In two liters of artificial seawater, 0.5 gram of *Artemia* cysts was added and kept under light for 24 h. Then, ten animals were separated and treated with 0–300 μM of the iron compounds in the dark. Live and dead animals were counted after 24 h. This experiment was performed in quadruplicate.

Lipid peroxidation. The lipoperoxidation activity of the most toxic compounds was assessed by the modified Fox method as cumene hydroperoxide (CHP) equivalents [26,27]. Stage 1 *Artemia* were treated with iron compounds as described, then frozen and homogenized in 100% methanol. Homogenates were centrifuged (Eppendorf 5424R micro centrifuge) at 15000 rpm and the supernatant (15 μL) was transferred to 96 well microplates. The samples were treated with 90 μL $FeSO_4$ (1 mM), 35 μL H_2SO_4 (0.25 M), 35 μL xilenol orange (1 mM) and 175 μL water. Incubation for 1 h was performed at room temperature, and absorption was measured at 580 nm. Then, 10 μL of CHP (175 μM) were added to the samples and absorbance at 580 nm was read again after 15 min.

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by Tukey Test were performed with Stat 3.2 software.

Results and Discussion

Stability assays

Calcein and transferrin are both strong iron(III) chelators (log*K* = 24 [28] and 20–21 [29], respectively), therefore they are useful as surrogates of high affinity biological substrates in the environment. Also, the fluorescence of calcein and FL-Tf is stoichiometrically quenched by iron, rendering these molecules useful for detection of the metal at very low concentrations by means of competitive equilibrium assays. The underlying concept is, the higher the stability of the iron-based metallodrug, the lesser free iron will be available for coordination with either calcein or FL-Tf, and hence the lesser the fluorescence quenching of these probes. By means of a calibration curve with "free" iron, such as FAS, it is possible to quantify the amount of iron released by the iron metallodrugs and then estimate their stabilities [22].

Once emitted to the environment, iron metallodrugs can either be absorbed as intact molecules (which will dissociate within the organism), or they can dissociate, thus making the hydrolysis products responsible for an array of biological effects. Stability studies were conducted in both physiological (HBS) and seawater conditions, in order to assess both possibilities.

Polymer-coated iron metallodrugs at a $[Fe]_{total}$ = 2 μM maximum concentration displayed in general great stability against either calcein or FlTf in neutral medium, even at non-zero ionic strength, as we were not able to detect significant fluorescence quenching of either probe upon reaction with these compounds (data not shown). Indeed, free iron arising from the dissociation of these molecules has been detected only at higher drug concentrations (200 μM in iron) and comprises usually ~3% of the total metal [6]. Our findings indicate that low levels of emissions of these drugs are not expected to induce high levels of free iron in environmental samples.

On the other hand, candidate metallodrugs derived from the Fc framework displayed lower stability against the high affinity chelator models in the physiological buffer (Fig 2). Binding stoichiometry of the probes (ligand:iron) is 1:1 (calcein) or 1:2 (FlTf), therefore 2 μM of each probe can detect up to 2 μM (calcein) or 4 μM (FlTf) chelatable iron. At the highest iron concentration (2 μM), iron salts are virtually completely chelated, as expected. The parent metallocene is very stable, however both its TMH derivatives show ~ 40–50% decomposition against the probes. In these compounds, deactivation of the organometallic bonds by the carbonyl groups from the 3,5,5-trimethylhexanoyl moiety explains their relative lack of stability and expulsion of the metal from the cyclopentadienyl sandwich [30]. This decreased stability of the TMH derivatives agrees with infrared spectrometry data, where both TMH-Fc and $(TMH)_2$-Fc display a Fe-C_5 stretching band at 482 cm^{-1}, while in Fc this band occurs at 460 cm^{-1}, indicating a weakened bond in the TMH derivatives. These experiments were repeated for higher ferrocenyl concentrations (up to 80 μM), and the relative trend of stability was not altered (data not shown).

Ferrocene and its derivatives displayed no detectable amount of free iron in artificial seawater with any of the Fe probes. Since the salinity of artificial seawater is higher than that of physiological buffer (~0.6 against 0.15 M in NaCl, respectively), the increased amount of Cl^- ions may efficiently compete with the fluorescent probes for metal coordination, and although chloride forms weak complexes with Fe(III) (log*K* = 1.06 for $[FeCl_2]^+$ [31]), its concentration is 300 times higher, therefore any trace amounts of iron released from the ferrocenes may not be accessible to the probes. Fluorescent transferrin binds more iron even in high salinity medium, as the metal is accommodated in a protein fold with little exposure to the solvent [29] in a kinetically inert form.

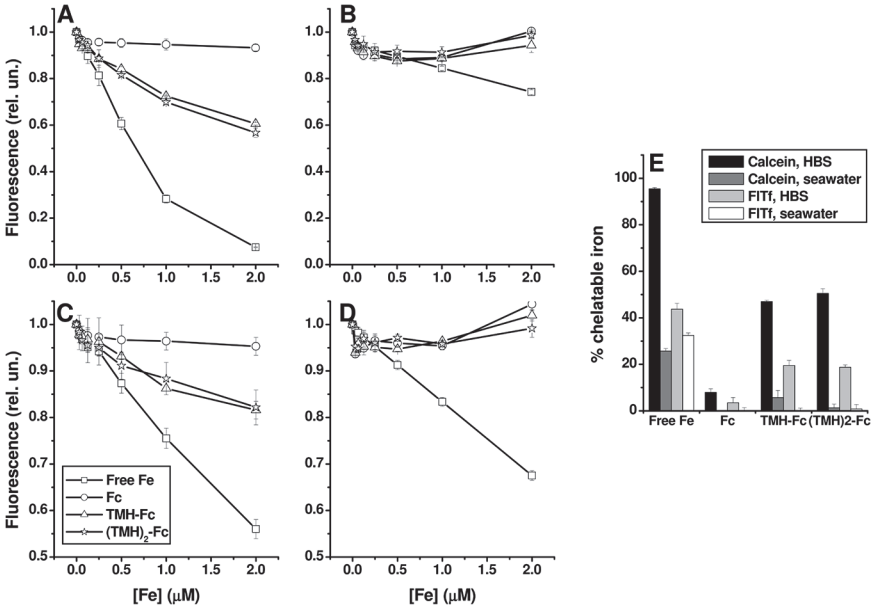


Fig 2. Quenching of 2 μM calcein in (A) HBS or (B) artificial seawater, and of 2 μM Fl-Tf in (C) HBS or (D) artificial seawater, caused by Fc derivatives. (E) Percentage of iron available to these probes (chelatable iron), calculated at the highest Fe concentration (2 μM). Rel. un. = relative fluorescence units.

doi:10.1371/journal.pone.0121997.g002

Pro-oxidant activity of the iron compounds

In biological fluids, labile forms of iron may participate in the auto-oxidation cycle of endogenous ligands such as ascorbate, leading to the development of a plethora of reactive oxygen species, indicating that even otherwise "antioxidants" may behave as pro-oxidants depending upon their relative proportion with redox-active metal ions. The formation of these reactive species is conveniently measured as the rate of conversion of the non-fluorescent probe dihydrorhodamine to its fluorescent counterpart [24].

In agreement with the stability assays, we found that the polymer-coated iron metallodrugs of commercial use displayed no measurable redox-active iron (values were lower than the detection limit of 0.4 μM [24]). Previous reports indeed show that only 0.8% of the total iron in similar formulations is redox-active [6]. Iron from the Fc derivatives, on the other hand, was able to engage into ROS generation mediated by ascorbate auto-oxidation, the TMH

Table 1. Concentrations (μM) and percentage of redox-active iron (%) in samples of Fc derivatives (average ± s.d. of 8 measurements).

Iron compound	Redox-active Fe (μM)	Redox-active iron (%)
Fc	1.20 ± 0.17 [a]	3.0
TMH-Fc	3.80 ± 0.17 [b]	9.5
$(TMH)_2$-Fc	3.26 ± 0.15 [c]	8.2

Total iron concentration = 40 μM.

[a] ($p < 0.05$)

[b] ($p < 0.05$)

[c] ($p < 0.05$)

doi:10.1371/journal.pone.0121997.t001

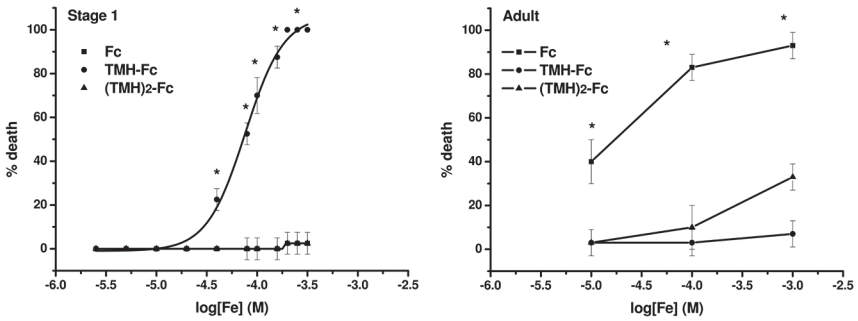


Fig 3. Dose-response curves for adult or stage 1 *Artemia* treated with ferrocene and its derivatives. Effects of Fc (in adults) and TMH-Fc (in stage 1 animals) were statistically different (*, $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0121997.g003

derivatives being more active than the parent metallocene (Table 1). This is in agreement with the higher amount of free iron available from the dissociation of the TMH derivatives (Fig 2). Organometallic complexes based on essential, redox-active ions are in general relatively stable, but they may cause oxidative stress. Depending upon the desired biological outcome, control of this property might be tuned in order to develop new Fc derivatives with potential biological activity [32].

Toxicity to *Artemia*

The toxicity of iron compounds with possible pharmacological activity has already been tested against *Artemia salina*. Iron complexes with thiosemicarbazones, which were proposed as anti-tumor and antimicrobial agents, displayed LD50 values in the range of 14–30 μM for 2-pyridineformamide derivatives [17] or 2–5 μM for *para*-tolyl derivatives [18]. On the other hand, iron magnetic nanoparticles proposed for diagnostic or drug delivery strategies have very low lethality to *Artemia* at concentrations ~ 1 mg/mL, whether or not coated with silica [13], despite decrease in swimming speed and onset of inflammation symptoms [15]. Finally, Al-Bari and colleagues observed that LD50 of four thio- or alcoxy-ferrocene derivatives against *Artemia salina* nauplii was in the range or 20–330 μM [16].

In this work, besides evaluating other candidate iron metallodrugs (ferrocenes), it was assessed, for the first time, the acute toxicity of commercial iron supplements to *A. salina*. Prolonged exposure (> 24 h) to the metal compounds was not conducted because the metal compounds will hydrolyze and precipitate in saline, alkaline medium.

"Free" iron (as FAS) caused only 37% lethality at 1000 μM final concentration in adult *Artemia*. Indeed, concentrations of free iron up to 185 μM are considered sublethal to this organism [33]. All commercial iron metallodrugs under study displayed only < 10% lethality to adult *A. salina* at 1000 μM final concentration (data not shown). Therefore, the polymer coatings alone (glycine, dextran, maltose, glucoheptonate) were not tested. The substituted Fc derivatives displayed toxicity similar to the polymer-coated metallodrugs, however Fc alone was lethal for 40% (at 10 μM), 90% (at 100 μM) and 100% (at 1000 μM) of the individuals (Fig 3). The toxicity of Fc does not correlate with amount of free iron, as probed by the stability assays showed here. This indicates that the whole molecule is responsible for toxic effects in adult *Artemia*.

Polymer-coated iron derivatives were also non-toxic to stage 1 *Artemia* (data not shown). The absence of toxicity of Fc (Fig 3) correlates with the virtual lack of free and/or redox-active iron (Fig 2 and Table 1), however free iron (as FAS) had only 2.5% lethality up to 300 μM.

Toxicity therefore results from properties of the whole molecules rather than from simple metal release, because TMH-Fc and $(TMH)_2$-Fc displayed similar stability (Fig 2) and elevated redox-active iron (Table 1). Indeed, Fc and $(TMH)_2$-Fc were virtually non-toxic (< 2.5% lethality) to stage 1 *Artemia* up to 300 μM. TMH-Fc, on the other hand, displayed a distinctive dose-response behavior (Fig 3), with a LD50 of 76.6 ±1.0 μM, which is close to other candidate ferrocene metallodrugs with low polarity substitutes [16]. Our data are in agreement with previous reports on the relative absorption of these compounds using a mammalian model. For example, rats fed with 5 mg/day with Fc, TMH-Fc and $(TMH)_2$-Fc displayed whole body iron retention of 24, 48 and 6%, respectively [13]. In addition, there are reports of oxidative damage to the liver [34] and astrocytes [35] of mice treated with TMH-Fc. It must be pointed out that bioavailability and absorption through any given biological interface are determined by factors such as lipophilicity and molecule size. Fc is more lipophilic than their derivatives [19], which may difficult its solubility in an aquatic environment, but also facilitate its way through biological membranes and cells. In addition, $(TMH)_2$-Fc is a bigger molecule than the mono-substituted Fc, which may difficult the traffic across biological membranes.

Adults, on the other hand, were more susceptible to Fc, which was non-toxic to stage 1 animals (Fig 3). Adult *Artemia*, in general, should be less susceptible to metallodrugs than larval stages, because earlier larval stages are undergoing major physiological and morphological changes through successive short larval stages and frequent molting, rendering these earlier stages more susceptible to toxicants as a whole. However, routes of absorption are expected to change sharply as the animal develops, going from a non-functional digestive system and yolk dependent larvae up to five days after hatching, to a fully formed digestive system for adults. The routes for absorption, therefore, change from body surface from day 1 larvae to ingestion for adults. In addition, the behavior of Fc was similar to some other contaminants such as substituted phenols [36] or chlorinated solvents [37], which also are progressively more toxic to *Artemia* as the animal ages. At the moment we cannot explain these discrepancies, but results do suggest that Fc could be easily ingested by adults due to its lipophilic nature and easy access to digestive system and biological membranes, even as small droplets. TMH-Fc, on the other hand, could make its way through general body surface for first instar *Artemia*. This is a promising area for further research using ferrocene derivatives and associated biological effects in other ecotoxicological models at different stages of development.

As a means to better understand the mechanisms of toxicity, we determined the amount of lipid peroxidation caused by the Fc derivatives in stage 1 *A. salina* (Fig 4). In agreement with toxicity tests, only TMH-Fc induced a significant increase in lipid peroxidation (3.5 Eg-CHP) at a concentration (80 μM) similar to the LD50, indicating that this could be one of the possible mechanisms to explain the higher toxicity of TMH-Fc to *A. salina*.

The absence of a clear relationship between aqueous stability and toxicity indicates that caution must be observed when assaying (eco)toxicity of metal complexes. Ecotoxicological models (Free Ion Availability, Biotic Ligand Model) [20,21] assume equilibrium conditions and predict that metal toxicity will generally be directly related to the amount of free metal available. However, ours and numerous other results seem to contradict this assumption, as organisms may actively internalize metals complexed with specific ligands, passive diffusion of non-charged, lipophilic metal compounds may occur, or finally organisms may have promiscuous binding sites that are used by different metal species [20,21]. This last possibility is of extreme importance when the metallodrugs are based on iron, an essential element for animals.

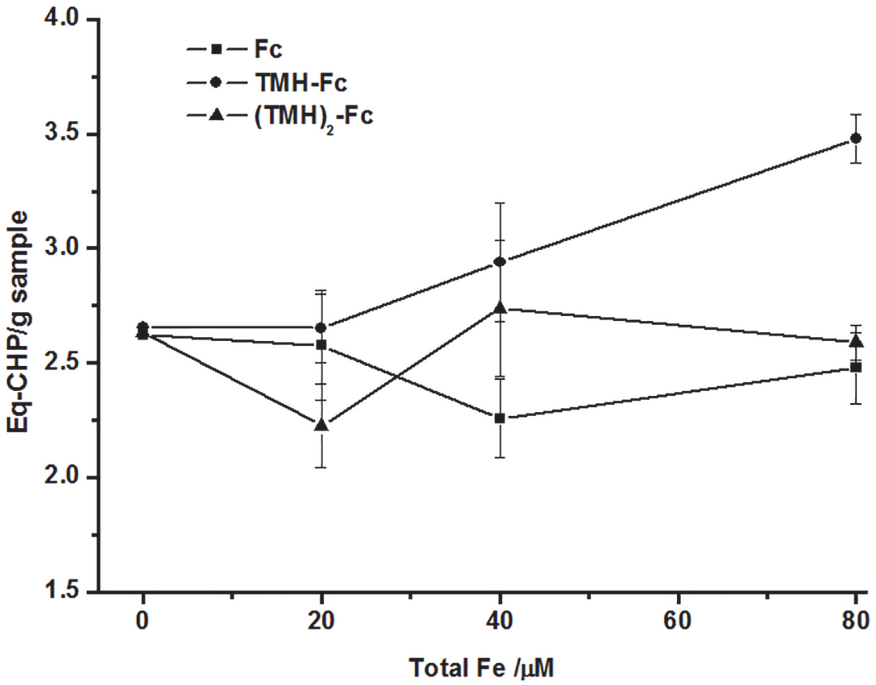


Fig 4. Lipid peroxidation (measured as CHP equivalents per gram of *A. salina*) after the treatment with ferrocene derivatives.

doi:10.1371/journal.pone.0121997.g004

Conclusions

Different probes with distinct binding sites have access to different species of chelatable iron. Ferrocene derivatives metallodrugs, studied here, have lower stability and considerable higher percentage of redox-active iron, when compared to the polymer-coated iron metallodrugs of commercial use. Therefore, the toxicity of the iron supplements of commercial origin was negligible; however, the mono-substituted ferrocene derivative (TMH-Fc) displayed high toxicity to stage 1 Artemia, possibly due to increased absorption through general body surface area followed by higher lipid peroxidation. Fc, on the other hand, was more toxic to adult Artemia. We suggest that ecotoxicity depends more on metal speciation (in this case, iron) present in the metallodrug, than on the total or free amount of metal present. Future studies with discarded metallodrugs should consider the chemical speciation of the metal present in the composition of the drug.

Acknowledgments

Authors are grateful for the technical assistance of Ms. Roxana Yesenia Pastrana Alta. Dr. Márcio Reis Custódio (USP—IB) contributed with useful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FPZ BPE. Performed the experiments: HAV LM. Analyzed the data: HAV LM FPZ BPE. Contributed reagents/materials/analysis tools: HAV LM FPZ BPE. Wrote the paper: HAV LM FPZ BPE.

References

1. Gielen M, Tiekink ERT. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine. Hoboken: John Wiley & Sons Ltda; 2005.
2. Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. Coord Chem Rev. 2007; 251: 1633–1648.
3. Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS, Domarle O, Blampain G, et al. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. J Med Chem. 1997; 40: 3715–3718. PMID: 9371235
4. Heilmann JB, Hillard EA, Plamont M-A, Pigeon P, Bolte M, Jaouen G, et al. Ferrocenyl compounds possessing protected phenol and thiophenol groups: synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological effects against breast cancer. J Organomet Chem. 2008; 693: 1716–1722.
5. Wu X, Go ML. The use of iron-baed drugs in medicine. In: Gielen M, Tiekink ERT, editors. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine. Hoboken: John Wiley & Sons; 2005. pp. 179–200.
6. Esposito BP, Breuer W, Slotki I, Cabantchik ZI. Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. Eur J Clin Invest. 2002; 32: 42–49. PMID: 11886431
7. Lykkesfeldt J, Morgan E, Christen S, Skovgaard LT, Moos T. Oxidative stress and damage in liver, but not in brain, of Fischer 344 rats subjected to dietary iron supplementation with lipid-soluble [(3,5,5-trimethylhexainoyl)ferrocene]. J Biochem Mol Toxicol. 2007; 21: 145–155. PMID: 17623885
8. Malecki EA, Cable E, Connor JR. Dietary iron overload by 3,5,5-trimethylhexanoyl ferrocene (TMH-ferrocene) in mice. Faseb J.1999; 13: A573–A573.
9. Malecki EA, Cable EE, Isom HC, Connor JR. The lipophilic iron compound TMH-ferrocene [(3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene] increases iron concentrations, neuronal L-ferritin, and heme oxygenase in brains of BALB/c mice. Biol Trace Elem Res. 2002; 86: 73–84. PMID: 12002662
10. Nielsen P, Dullmann J, Wulfhekel U, Heinrich HC. Non-transferrin-bound-iron in serum and low-molecular-weight-iron in the liver of dietary iron-loaded rats. Int J Biochem. 1993; 25: 223–232. PMID: 8444319
11. Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. Mol Aspects Med. 2005; 26: 235–244. PMID: 16125765
12. Bound JP, Kitsou K, Voulvoulis N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. Environ Toxicol Pharmacol. 2006; 21: 301–307. doi: 10.1016/j.etap.2005.09.006 PMID: 21783672
13. Ashtari K, Khajeh K, Fasihi J, Ashtari P, Ramazani A, Vali H. Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study. Int J Biol Macromol. 2012; 50: 1063–1069. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.12.025 PMID: 22269345
14. Libralato G. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. Mar Environ Res. 2014; 101: 38–43. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.08.002 PMID: 25195085
15. Gambardella C, Mesaric T, Milivojevic T, Sepcic K, Gallus L, Carbone S, et al. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. Environ Monit Assess. 2014; 186: 4249–4259. doi: 10.1007/s10661-014-3695-8 PMID: 24590232
16. Al-Bari MAA, Hossen MF, Khan A, Islam MR, Kudrat-e-Zahan M, Mosaddik MA, et al. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of ferrocene derivative compounds. Pak J Biol Sci. 2007; 10: 2423–2429. PMID: 19070108
17. Graminha AE, Vilhena FS, Batista AA, Louro SRW, Ziolli RL, Teixeira LR, et al. 2-pyridinoformamide-derived thiosemicarbazones and their iron(III) complexes: potential antineoplastic activity. Polyhedron. 2008; 27: 547–551.
18. Dos Santos Silva T, Teixeira LR, Zioli RL, Louro SRW, Beraldo H. Iron(III) complexes with N^4-para-tolyl-thiosemicarbazones: spectral and electrochemical studies and toxicity to *Artemia salina*. J Coord Chem. 2009; 62: 958–966.
19. Nielsen P, Heinrich HC. Metabolism of iron from (3,5,5-trimethylhexanoyl)ferrocene in rats—a dietary model for severe iron overload. Biochem Pharmacol. 1993; 45: 385–391. PMID: 8435091
20. Slaveykova VI, Wilkinson KJ. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. Environ Chem. 2005; 2: 9–24.
21. Worms I, Simon DF, Hassler CS, Wilkinson KJ. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. Biochimie. 2006; 88: 1721–1731. PMID: 17049417

22. Esposito BP, Epsztejn S, Breuer W, Cabantchik ZI. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. Anal Biochem. 2002; 304: 1–18. PMID: 11969183
23. Breuer W, Cabantchik ZI. A fluorescence-based one-step assay for serum non transferrin-bound iron. Anal Biochem. 2001; 299: 194–202. PMID: 11730343
24. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. Blood. 2003; 102: 2670–2677. PMID: 12805056
25. Ali AA, Fortuna L, Frasca M, Rashid MT, Xibilia MG. Complexity in a population of *Artemia*. Chaos Solitons Fractals. 2011; 44: 306–316.
26. Hermeslima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid-peroxidation in tissue-extracts based on Fe(III)-xylenol orange complex-formation. Free Radic Biol Med. 1995; 19: 271–280. PMID: 7557541
27. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange—comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids. 1991; 26: 853–856. PMID: 1795606
28. Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik ZI. Transport of iron and other transition-metals into cells as revealed by a fluorescent-probe. Am J Physiol Cell Physiol. 1995; 268: C1354–C1361. PMID: 7611353
29. Mizutani K, Toyoda M, Mikami B. X-ray structures of transferrins and related proteins. Biochim Biophys Acta. 2012; 1820: 203–211. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.003 PMID: 21855609
30. Wade LG. Organic Chemistry. 5th edition. London: Prentice Hall; 2002.
31. Strahm U, Patel RC, Matijevic E. Thermodynamics and kinetics of aqueous iron(III) chloride complexes formation. J Phys Chem. 1979; 83: 1689–1695.
32. Li S, Wang Z, Wei Y, Wu C, Gao S, Jiang H, et al. Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. Biomaterials. 2013; 34: 902–911. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.069 PMID: 23174143
33. Mohamed AH, Sheir SK, Osman GY, Abd-El Azeem HH. Toxic effects of heavy metals pollution on biochemical activities of the adult brine shrimp, *Artemia salina*. Can J Pure App Sci. 2014; 8: 3019–3028.
34. Eybl V, Kotyzova D, Kolek M, Koutensky J, Nielsen P. The influence of deferiprone (L1) and deferoxamine on iron and essential element tissue level and parameters of oxidative status in dietary iron-loaded mice. Toxicol Lett. 2002; 128: 169–175. PMID: 11869827
35. Robb SJ, Connor JR. An *in vitro* model for analysis of oxidative death in primary mouse astrocytes. Brain Res. 1998; 788: 125–132. PMID: 9554979
36. Barahona MV, Sánchez-Fortún S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. Bull Environ Contam Toxicol.1996; 56: 271–278. PMID: 8720100
37. Sánchez-Fortún S, Sanz F, Santa-María A, Ros JM, De Vicente ML, Encinas MT, et al. Acute sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to seven chlorinated solvents. Bull Environ Contam Toxicol. 1997; 59: 445–451. PMID: 9256399