

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Filipe Boccato Payolla

**Complexos de platina, vanádio, molibdênio e tungstênio com
aminoácidos, ácidos mono- e dicarboxílicos e ligantes similares. Estudos
de atividade biológica**

Araraquara, SP

2019

Filipe Boccato Payolla

Complexos de platina, vanádio, molibdênio e tungstênio com aminoácidos, ácidos mono- e dicarboxílicos e ligantes similares. Estudos de atividade biológica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Antonio Carlos Massabni

Araraquara, SP

2019

P367c Payolla, Filipe Boccato

Complexos de platina, vanádio, molibdênio e tungstênio com aminoácidos, ácidos mono e –dicarboxílicos e ligantes similares: Estudos de atividade biológica/Filipe Boccato Payolla. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2019.
63f.

Tese (Doutorado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

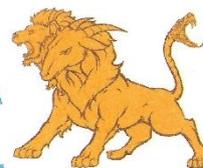
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Massabni

1. Aminoácidos. 2. Ácidos carboxílicos. 3. Vanádio. 4. Platina.
5. Tungstênio. 6. Molibdênio. 7. Complexos metálicos. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



FILIFE BOCCATO PAYOLLA

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 31 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MASSABNI (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Profª Drª ELIANE TROVATTI
Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof. Dr. LUIZ ANTONIO ANDRADE DE OLIVEIRA
Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

Prof. Dr. JOSÉ CLAYSTON MELO PEREIRA
Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

Profª Drª ELIZABETH BERWERTH STUCCHI
Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e professores. Ter a chance de obter o título de doutorado é uma realidade muito rara e significativa. Espero que os resultados obtidos durante a pesquisa feita para a obtenção do título de doutor possam ser úteis para outros pesquisadores e que um dia os complexos que obtive sejam utilizados como tratamento para alguns tipos de câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, aos familiares pelo incentivo e aos amigos por terem me ajudado a manter algum “grau de sanidade”. Algumas pessoas serão citadas, pois sem elas é muito provável que este trabalho não fosse terminado.

A meus pais, irmão e demais familiares: obrigado pela ajuda, carinho e cuidados.

Ao Thiago, ao Luiz Henrique e ao Gabriel: nossas conversas sobre vanádio, UV-Vis e a vida em geral foram extremamente importantes.

Ao Maurício. Sua ajuda no laboratório, sua paciência e a força dada, principalmente no início do trabalho, fizeram as coisas saírem da estaca zero.

À Eliane e ao Edison, pelas conversas, incentivo, sugestões e por toda a paciência durante esses quatro anos.

À Sandra, por me tratar tão bem e sempre estar tão disposta a facilitar e dar andamento às burocracias.

À Sandra, à Patrícia, à Denise, à Isabel e aos demais professores do PJN. Obrigado por me receberem, me ensinarem e me tratarem como um de vocês. Aprendi lições valiosíssimas que me tornaram uma pessoa melhor.

À Cris, à Rose, ao Mauro e aos demais professores do UBC. Obrigado pela ajuda, pela recepção calorosa e por me ensinarem a lidar com adolescentes.

Aos alunos do PJN. Obrigado a todos (alguns mais, outros menos) pelo carinho, por tentarem entender minhas digressões químicas, pelos jogos de vôlei e basquete, pelos momentos de conversa na hora do almoço. Espero que um dia eu possa ser o professor de vocês em alguma universidade.

Aos alunos do UBC. Espero que vocês continuem sendo animados, inteligentes e que continuem gostando de química. Torço pra que todos os nossos dias sejam tão divertidos quanto a feira de ciências de 2019.

Ao Professor Massabni, pela confiança, carinho, rugas, discussões (químicas e aleatórias), pelo projeto e por ter acreditado em mim desde o início do mestrado. Que nossas conversas científicas e não científicas continuem.

“O homem de preto fugia pelo deserto, e o pistoleiro ia atrás.”

(Stephen King)

RESUMO

Uma busca por novos complexos análogos à cisplatina que apresentem maior seletividade e ação contra células tumorais vem ocorrendo na pesquisa científica. Complexos de Pt(IV) tornaram-se o centro das atenções de pesquisadores que buscavam evitar o uso intravenoso dos quimioterápicos contendo Pt(II). Apesar do relativo sucesso desses pró-fármacos, a baixa seletividade dos quimioterápicos à base de platina, o alto custo de produção e os efeitos colaterais trazem à tona a necessidade de estudos e desenvolvimento de novos quimioterápicos que diminuam esses pontos limitadores. Outros metais vêm sendo utilizados e alguns, como vanádio e paládio mostraram-se promissores. Foram obtidos compostos de Pt e V com ácidos mono- e dicarboxílicos e aminoácidos. Foram utilizados os seguintes ligantes: ácido glutâmico, ácido ftálico, ácido mesacônico, ácido orótico e 5-fluorouracil. Tais compostos foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas, termogravimétricas, análise elementar e difratometria de raios-X. Os compostos tiveram sua atividade antitumoral *in vitro* testada e apresentaram algum grau de atividade antitumoral. Os complexos de vanádio com ácido glutâmico e ácido orótico apresentaram índices de seletividade variando entre, aproximadamente, 1,5 e 9; com IC₅₀ indo de 7,9 a 44,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. VOSO₄ apresenta um IC₅₀ muito menor em células normais e de, no mínimo, 1,5 vezes maior para as células tumorais. Devido a esses bons resultados com os complexos de vanádio, três novos complexos de ácido orótico na forma aniônica com vanádio (VI), molibdênio (VI) e tungstênio (VI) foram obtidos e caracterizados.

Palavras-chave: aminoácidos, ácidos carboxílicos, vanádio, platina, tungstênio, molibdênio, complexos metálicos.

ABSTRACT

A search for new complexes analogous to cisplatin that present greater selectivity and action against tumor cells has been occurring in scientific research. Pt(IV) complexes became the center of attention of researchers seeking to avoid the intravenous use of Pt(II) containing chemotherapeutics. Despite the relative success of these prodrugs, the low selectivity of platinum-based chemotherapeutics, the high cost of production, and the side effects bring to the surface the need for studies and development of new chemotherapeutics that diminish these limiting points. Other metals have been used and some such as vanadium and palladium have proved to be promising. Pt and V compounds were obtained with mono- and dicarboxylic acids and amino acids. The following ligands were used: glutamic acid, phthalic acid, mesaconic acid, orotic acid and 5-fluorouracil. Such compounds were characterized using spectroscopic, thermogravimetric, elemental analysis and X-ray diffraction techniques. The compounds had their antitumor activity *in vitro* tested and showed some degree of antitumor activity. Vanadium complexes with glutamic acid and orotic acid had selectivity indices ranging from approximately 1.5 to 9; with IC₅₀ ranging from 7.9 to 44.5 μM. VOSO₄ has a much lower IC₅₀ in normal cells and at least 1.5 times higher in tumor cells. Due to these good results with vanadium complexes, three new complexes of orotic acid in their anionic form with vanadium (VI), molybdenum (VI) and tungsten (VI) were obtained and characterized.

Keywords: amino acids, carboxylic acids, vanadium, platinum, molybdenum, tungsten, metal complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de captação, hidrólise e ação da cisplatina e análogos.....	16
Figura 2. Fórmulas estruturais dos ligantes utilizados.....	24
Figura 3. Esquema geral de obtenção dos complexos de vanádio	26
Figura 4. Esquema de reação para obtenção da cisplatina.....	27
Figura 5. Esquema de reação para obtenção do Pt-5-FU.....	27
Figura 6. Espectros de absorção na região do infravermelho do complexo GV1 e seus precursores	34
Figura 7. Estrutura química do glutamato monossódico hidratado.....	34
Figura 8. Termogravimetria do orotato de oxovanádio	35
Figura 9. Termogravimetria do composto VO(γ -glu)	37
Figura 10. Espectro FTIR do 5-fluorouracil e do complexo de Pt-5-fluorouracil.	38
Figura 11. Espectros FTIR dos compostos contendo ácido ftálico	40
Figura 12. Espectros FTIR dos compostos contendo ácido mesacônico	41
Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo vanádio-orotato, sob as seguintes condições: ar sintético a 100 mL.min ⁻¹ e aquecimento a 10 K.min ⁻¹ , de 30 a 1000 °C.....	45
Figura 14. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo molibdênio-orotato, sob as seguintes condições: ar sintético a 100 mL.min ⁻¹ e aquecimento a 10 K.min ⁻¹ , de 30 a 1000 °C.....	45
Figura 15. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo tungstênio-orotato, sob as seguintes condições: ar sintético a 100 mL.min ⁻¹ e aquecimento a 10 K.min ⁻¹ , de 30 a 1000 °C.....	46
Figura 16. Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos três complexos de orotato.	46
Figura 17. Espectros de IR do ácido orótico, orotato de potássio, orotato de vanádio, orotato de molibdênio e orotato de tungstênio.	47
Figura 18. Teste de viabilidade celular do complexo VO(oro)	50
Figura 19. Teste de viabilidade celular do complexo VO(α -glu)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. V-otato. Valores experimentais e fórmula proposta.....	42
Tabela 2. Mo-otato. Valores experimentais e fórmula proposta.	43
Tabela 3. W-otato. Valores experimentais e fórmula proposta.....	43
Tabela 4. Frequências de IR (cm^{-1}) de ácido orótico (oro), otato de potássio K(oro), otato de vanádio V(oro), otato de molibdênio Mo(oro) e otato de tungstênio W(oro) na região 1700-1300 cm^{-1}	48
Tabela 5. Cálculo da diferença ($\Delta\nu \text{ cm}^{-1}$) entre o estiramento assimétrico (C–O) e o alongamento simétrico (C–O).	48
Tabela 6. IC_{50} dos complexos, ligantes e íon metálico de vanádio sobre as linhagens celulares testadas.....	50
Tabela 7. Índice de seletividade dos complexos para as linhagens celulares testadas	52
Tabela 8. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> tratadas com o complexo metálico Pt-5FU, em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica	55
Tabela 9. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> tratadas com o complexo metálico Pt-mesaconato, em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.....	56
Tabela 10. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> tratadas com o complexo metálico Pt-ftalato em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

SPECT – tomografia por computadorizada por emissão de pósitron único

PET – tomografia por emissão de pósitron

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

GM07492 – fibroblastos humanos saudáveis

MCF-7 - Michigan Cancer Foundation-7 (células tumorais mamárias)

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

DMSO – dimetilsulfóxido

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*

STF – solução tampão de fosfato

HOMO – highest occupied molecular orbital

LUMO – lowest unoccupied molecular orbital

MRC-5 – Medical Research Council cell strain 5 (fibroblastos humanos saudáveis)

HEPG2 – células de carcinoma hepatocelular

Caco-2 – células de adenocarcinoma colorretal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. MECANISMOS DE AÇÃO DA CISPLATINA E ANÁLOGOS.....	15
1.2. MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO.....	17
1.3. ÁCIDO ORÓTICO E VANÁDIO.....	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	Erro! Indicador não definido.
3.1.1. Radiofármacos.....	21
3.2. PRINCIPAIS LIGANTES UTILIZADOS	24
3.3. ÍONS METÁLICOS UTILIZADOS.....	25
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISES.....	25
3.5. SÍNTESE DOS COMPLEXOS	26
3.5.1. Síntese dos complexos de vanádio (IV) – (VO ²⁺)	26
3.5.2. Síntese dos complexos de platina (II) - Pt ²⁺	26
3.6. VIABILIDADE/CITOTOXICIDADE CELULAR.....	28
3.6.1. Testes preliminares.....	28
3.6.2. Testes dos complexos de vanádio	29
3.6.2.1. Linhagens celulares	29
3.6.2.2. Ensaio de viabilidade celular pela resazurina.....	30
3.6.3. Testes dos complexos de platina	31
3.6.4. Teste de Ames.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	33
4.1.1. Orotato de oxovanádio - [VO(C ₅ H ₄ N ₂ O ₄) ₂] – VO(oro)	34
4.1.2. Glutamato de oxovanádio – Na[VO(OH)(C ₅ H ₈ NO ₄)] – VO(α-glu)	36
4.1.3. Glutamato de oxovanádio – Na[VO(OH) ₂ (C ₅ H ₈ NO ₄)] – VO(γ-glu)	36
4.1.4. Pt-5-FU	37
4.1.5. Pt-ftalato	39
4.1.6. Pt-mesaconato.....	40
4.1.7. Ácido orótico com vanádio (VI), molibdênio (VI) e tungstênio (VI)	42
4.2. TESTES DE ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO.....	48
4.2.1. Complexos de vanádio – VO(oro), VO(α-glu) e VO(γ-glu)	48
4.2.2. Complexos de platina – Pt-ftalato, Pt-mesaconato e Pt-5-FU....	52
4.3. TESTES DE MUTAGENICIDADE (AMES).....	53
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da cisplatina por Rosenberg, van Kamp e Krigas (1965) e posterior comprovação da atividade antitumoral de complexos de platina (ROSENBERG *et al.*, 1969; ROSENBERG, 1978), vem ocorrendo na pesquisa científica uma busca por novos complexos análogos à cisplatina que apresentassem maior seletividade e ação contra células tumorais. O surgimento de novas técnicas para o tratamento do câncer, a descoberta de quimioterápicos de segunda e terceira gerações e o número de artigos publicados sobre o tema fizeram com que o interesse pelos complexos de Pt(II) diminuísse (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018). Complexos de platina de segunda geração são complexos onde ocorre a substituição dos cloros ligados à platina por moléculas orgânicas bidentadas. Complexos de platina de terceira geração são complexos de segunda geração que têm os grupos amina ligados à platina substituídos por moléculas orgânicas com aminas terminais ligadas à platina.

Complexos de platina (IV) tornaram-se o centro das atenções de pesquisadores que buscavam evitar o uso intravenoso dos quimioterápicos contendo platina (II). Os pró-fármacos de platina (IV) são administrados por via oral e sofrem redução para platina (II) no organismo do paciente. A principal vantagem desses pró-fármacos é a facilidade de administração, pois dispensam a aplicação intravenosa, envolvem menos profissionais da área da saúde e apresentam resultados similares ao tratamento tradicional (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016).

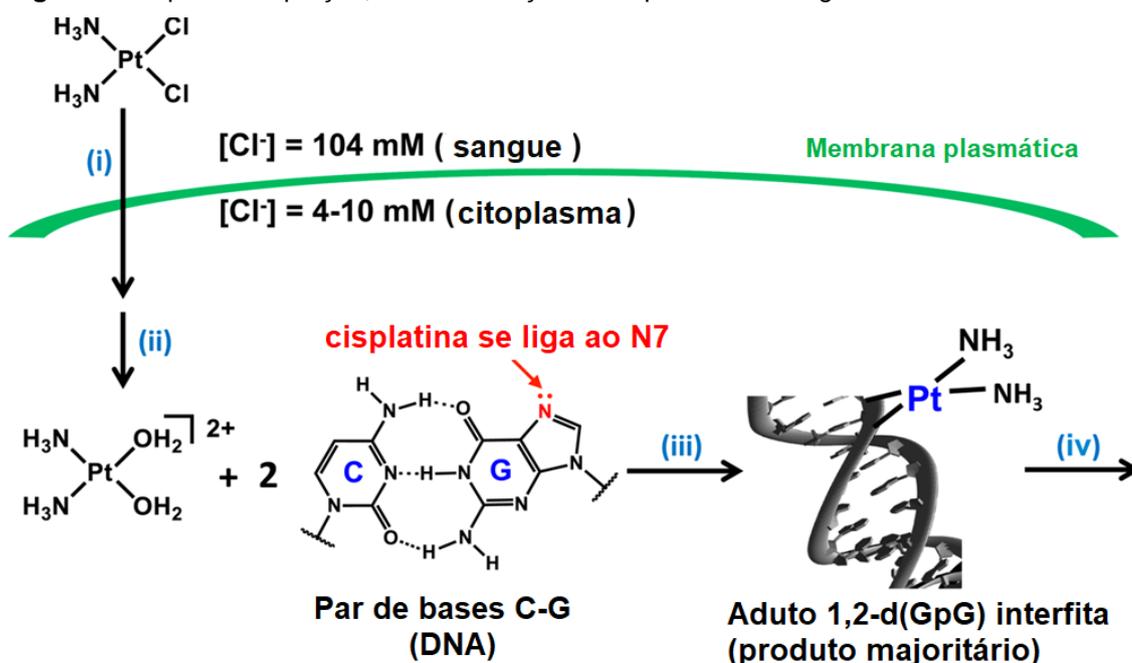
Apesar do relativo sucesso desses pró-fármacos, a baixa seletividade dos quimioterápicos à base de platina, o alto custo de produção e os efeitos colaterais trazem à tona a necessidade de estudos e desenvolvimento de novos quimioterápicos que diminuam esses pontos limitadores. Complexos de rutênio vêm se apresentando como potenciais auxiliares ao tratamento tradicional do câncer. O rutênio age como transportador de ligantes (fármacos com ação antitumoral), que são liberados dentro das células tumorais e têm ação mais efetiva (CINI *et al.*, 2003; JAKUPEC *et al.*, 2008; PAVAN *et al.*, 2010; PAVAN *et al.*, 2011; RONCONI; SADLER, 2007).

Outros metais vêm sendo utilizados e alguns, como vanádio (EVANGELOU, 2002), rutênio, ouro, (BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, 2008), paládio, prata e cobre, entre outros (MEDICI *et al.*, 2015), mostraram-se promissores.

1.1. MECANISMOS DE AÇÃO DA CISPLATINA E ANÁLOGOS

Os complexos planares análogos à cisplatina são complexos de platina (II), quadrado-planares, com duas aminas e dois ligantes *cis* aniônicos sendo que as duas aminas podem ou não ser grupos quelantes e são chamados de “grupos não abandonadores”, porque permanecem ligados ao centro metálico durante as transformações intracelulares. Os “grupos abandonadores”, que podem ser grupos aniônicos monodentados ou quelantes, saem da esfera de coordenação da platina (II). O mecanismo geral de ação envolve quatro etapas principais: (i) captação celular, (ii) hidrólise, (iii) ligação ao DNA e (iv) intercalações ao DNA e morte celular (Figura 1) (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016).

Figura 1. Etapas de captação, hidrólise e ação da cisplatina e análogos



Fonte: modificado de Johnstone; Suntharalingam e Lippard (2016).

A cisplatina é captada pelas células por difusão passiva pela membrana plasmática e transporte ativo pelas proteínas de membrana. Por ser pequena e de geometria planar, a cisplatina vem sendo referida como suscetível à difusão passiva. Tal fato é comprovado pelos níveis da captação celular, que se mantêm constantes com o aumento da concentração e são proporcionais à dose administrada. Alguns estudos demonstraram que o transporte ativo é o principal mecanismo de captação celular, sendo os transportadores de cobre os principais responsáveis pelo transporte da cisplatina. De modo similar, a eficiência da oxaliplatina está diretamente ligada à expressão de transportadores de cátions orgânicos. Aldeídos reativos diminuem a captação da cisplatina, provavelmente por reagirem com as proteínas de membrana que internalizam a cisplatina (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016).

A geometria quadrado-planar da cisplatina facilita a troca de ligantes, que é essencial para a formação de lesões no DNA, sendo essas lesões as responsáveis pela ação antitumoral (FREY; RANFORD; SADLER, 1993). A cisplatina sofre hidrólise mesmo antes da sua ligação ao DNA: um cloreto é substituído por uma molécula de água. O tempo de meia-vida da reação de hidrólise que produz o $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ é de aproximadamente 2 h. A carga

negativa do íon complexo faz com que ele seja atraído para regiões do DNA carregadas com cargas negativas. A carboplatina e a oxaliplatina apresentam grupos quelatos ao invés dos cloretos da cisplatina. Esses quelatos são substituídos muito lentamente e soluções dessas duas drogas são estáveis à hidrólise por períodos que podem chegar a meses (FREY; RANFORD; SADLER, 1993).

A cisplatina hidrolisada consegue entrar no núcleo e ligar-se ao DNA, impedindo os mecanismos de reparo do DNA. Décadas de pesquisas identificaram interações entre platina, DNA, RNA e algumas proteínas. Os sítios mais nucleofílicos do DNA são os átomos de nitrogênio na posição 7 (N7) dos resíduos de purina da guanina e adenina, que são os pontos preferenciais de ligação com os complexos de platina. Experimentos de RMN de platina-195 revelaram que a cisplatina forma, primeiramente, adutos monofuncionais com o DNA (BANCROFT; LEPRE; LIPPARD, 1990) e, posteriormente, o ligante Cl⁻ é substituído por uma guanina, formando um *cross-link* com o DNA. Tais *cross-links* podem ser formados em uma mesma fita do DNA ou entre as duas fitas (BANCROFT; LEPRE; LIPPARD, 1990).

1.2. MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO

O vanádio é um elemento presente em plantas e animais. A presença de vanádio nesses organismos faz com que existam mecanismos para reconhecimento, captação e uso de seus íons, possibilitando assim sua utilização contra várias doenças, como o diabetes (THOMPSON, ORVIG, 2006; THOMPSON *et al.*, 2009; WILLISKY *et al.*, 2011), a osteoporose (ETCHEVERRY; BARRIO, 2007) e o câncer (KIOSEOGLOU *et al.*, 2015; REHDER, 2012; PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015). Nos vertebrados, após a absorção e distribuição nos tecidos, o vanádio apresenta grandes concentrações no fígado e nos ossos (PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015)

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário, sendo o tumor ósseo mais comum em crianças e adultos. Para melhorar o bem-estar e a taxa

de sobrevivência dos pacientes, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos de expressão do osteossarcoma, desenvolvimento de novas drogas e modelos mais confiáveis para testes (GORLICK; KHANNA, 2010).

Os mecanismos de ação de complexos de vanádio foram estudados em uma variedade de linhagens de células tumorais. Dentre elas, podemos destacar: linfoma humano B e leucemia T (KREJSA *et al.*, 1997), eritroleucemia murina (ENGLISH; MACARA; CANTLEY, 1983), leucemia basofílica de ratos (DJORDJEVIC *et al.*, 1995), células da linhagem L1210 de leucemia (DJORDJEVIC; WAMPLER, 1985), HL-60 e M07E (DJORDJEVIC *et al.*, 1995). Tais trabalhos foram pioneiros na tentativa de substituição de complexos de platina por complexos de vanádio para o tratamento de diversos tipos de câncer.

Ocorreram avanços nas últimas décadas e alguns bons resultados foram alcançados no tratamento do osteossarcoma (LEÓN *et al.*, 2014a; LEÓN *et al.*, 2014b), câncer de mama (MCF-7) (EBRAHIMIPOUR *et al.*, 2015) e leucemia linfóide aguda e carcinoma colorretal (SINHA *et al.*, 2014). Vários desses avanços demonstraram que a ação dos complexos de vanádio se dá pela indução à apoptose, pela inibição do crescimento de células tumorais e pela inibição da metástase tumoral.

Os mecanismos de ação do vanádio na inibição de tumores ainda não são totalmente conhecidos, mas é possível afirmar que alguns complexos de vanádio são promissores substitutos/coadjuvantes no tratamento de diversos tipos de câncer.

1.3. ÁCIDO ORÓTICO E VANÁDIO

O ácido orótico é um ácido carboxílico fundamental para a biossíntese de bases pirimidínicas de ácidos nucleicos. Suas propriedades citotóxicas e bactericidas também foram observadas. Usos do ácido orótico como ligante foram descritos anteriormente para estudos de vários íons de metais de transição. Esse ácido é, em geral, coordenado aos íons metálicos na forma de

ânion (orotato) e alguns complexos já foram parcialmente caracterizados (MAISTRALIS; KOUTSODIMOU; KATSAROS, 2000).

Mais recentemente, outro complexo de vanádio (IV) com orotato e NH_3 como ligantes foi descrito na literatura (NAGLAH *et al.*, 2018). Usando espectroscopia e técnicas de análise térmica, Naglah *et al.* (2018) propuseram uma estrutura piramidal quadrada para o complexo com 2 moléculas de NH_3 e 1 orotato coordenado, sendo o orotato bidentado.

Outros complexos de metais de transição com orotato (1-) como ligante monodentado também foram descritos na literatura. A síntese de um novo complexo de índio (III) teve sua estrutura proposta com base em análises químicas e espectrais (KÖSE *et al.*, 2006) e um complexo polimérico de orotato de cobre (II) também foi descrito (KOSTOVA *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

Obter novos complexos de ácidos carboxílicos (mono- ou dicarboxílicos), aminoácidos (mono- ou dicarboxílicos) e 5-fluorouracil com vanádio (IV, V), paládio (II) e platina (II) e testar sua atividade em relação a células de linhagens tumorais de câncer de boca, de hipofaringe, de laringe, de mama, de fígado e colorretal. Obter também novos complexos de ácidos glutâmico e orótico com vanádio (VI), molibdênio (VI) e tungstênio (VI) para serem testados como possíveis quimioterápicos para as mesmas linhagens celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Inicialmente, foi feita uma busca na literatura para catalogar os tipos de complexos metálicos que atuam contra o câncer. A pesquisa foi realizada em bases de dados como SciELO, Scopus e Redalyc, além de relatórios de órgãos relacionados à saúde nacionais e internacionais, como a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil.

3.1.1. RADIOFÁRMACOS

Durante a pesquisa, percebeu-se a importância dos radiofármacos para o tratamento do câncer e, após extenso levantamento, foi publicado um artigo de revisão (*mini review*) com as informações desta seção (PAYOLLA; MASSABNI; ORVIG, 2019).

Na medicina nuclear, os radiofármacos são utilizados em diagnóstico por imagem e em radioterapia, sendo de extrema importância para auxiliar a no diagnóstico de órgãos e tratamentos de condições patológicas, principalmente o câncer. Na modalidade de imagem, os radiofármacos são administrados via oral, intravenosa ou por inalação, para permitir a visualização de vários órgãos através de seus traçadores radioativos, como rins, pulmões, funções da tireoide e do coração, metabolismo ósseo e circulação sanguínea. Na modalidade terapêutica, com o objetivo de tratar o câncer ou o funcionamento da glândula tireoide, uma alta dose de radiação é administrada através de radiofármacos específicos direcionados ao órgão doente (WHO, 2018).

Os radiofármacos geralmente consistem em dois componentes, um elemento radioativo (radionuclídeo), que permite a varredura externa, ligado a um elemento não radioativo, uma molécula biologicamente ativa, droga ou célula (glóbulos vermelhos e brancos marcados com um radionuclídeo, por exemplo)

que atua como ligante, responsável pela condução do radionuclídeo para um órgão específico (CHERRY; SORENSON; PHELPS, 2012).

Algumas características são necessárias para considerar radiofármacos clinicamente úteis para diagnósticos por imagem:

1. O decaimento do radionuclídeo deve estar em faixas específicas de emissões de energia (511 keV para tomografia por emissão de pósitrons – PET e 100-200 keV para câmaras-gama) e em quantidade suficiente para detecção de tomografia.
2. Não deve conter radiação particulada (emissões beta, por exemplo), porque aumenta a dose de radiação nos pacientes.
3. Sua meia-vida deve ter apenas algumas horas.
4. Os radionuclídeos não devem ser contaminados por outros radioisótopos do mesmo elemento, nem mesmo os seus isótopos estáveis (isentos de carga).
5. Devem ter atividade específica, e a atividade específica mais alta provém de radionuclídeos livres de portadores.
6. Os radiofármacos não devem ter toxicidade nem manifestar efeitos fisiológicos.
7. Os radiofármacos devem estar disponíveis para uso imediato e serem de fácil composição.
8. Os radiofármacos devem atingir o órgão-alvo com rapidez e precisão, de acordo com a aplicação pretendida (IAEA, 2018).

Os radiofármacos de diagnóstico não têm efeitos farmacológicos e sua administração não está associada a efeitos secundários clínicos relevantes. Seu uso clínico, entretanto, acarreta o risco inerente de exposição à radiação e possível contaminação durante a formulação radiofarmacêutica, uma vez que a maioria dos produtos radiofarmacêuticos é administrada por via intravenosa (IAEA, 2018).

A diferença mais notável entre medicamentos normais e radiofármacos é que os últimos têm uma meia-vida curta, devido ao seu rápido decaimento. Por essa razão, os radiofármacos devem ser preparados imediatamente antes da sua administração. A preparação e o uso de radiofármacos com segurança e

especialização são, portanto, vitais para a proteção do operador e do paciente (IEAE, 2018).

Os radionuclídeos têm muitas aplicações em diversas áreas que usam energia nuclear. A importância e os usos dos radionuclídeos na medicina estão aumentando continuamente para diagnóstico e terapia em todo o mundo. Em 2018, cerca de 10.000 hospitais utilizaram radionuclídeos e cerca de 90% dos procedimentos foram para o diagnóstico (WNA, 2018).

No Brasil, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) informou que em 2017 havia mais de 440 clínicas de diagnóstico e hospitais de medicina nuclear, 55% na região Sudeste do Brasil, 19% no Nordeste e 15% na região Sul; 72 PETs instalados, com cerca de 1,8 milhão de pessoas suportadas. Existem cerca de 40 radionuclídeos produzidos em reatores nucleares e cerca de 20 radionuclídeos produzidos em ciclotrons (CNEN, 2017).

O tecnécio-99m (^{99m}Tc) é o radionuclídeo mais utilizado para diagnóstico, respondendo por 67,3% do total da receita da CNEN em 2017. Além do ^{99m}Tc , ^{131}I (13,7%), ^{67}Ga (2,9%), ^{177}Lu Dotatate (2,9%) e ^{18}F -FDG (1,1%) foram os mais utilizados no Brasil no período (CNEN, 2017).

A tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, em inglês: *Single photon emission computed tomography*) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET, em inglês: *Positron emission tomography*) são as duas técnicas mais utilizadas em medicina nuclear, mas há atualmente outras técnicas com resultados mais precisos, dentre elas, a tomografia computadorizada de raios-X e a tomografia com imagens tridimensionais (WELLS, 2016).

O exame SPECT é usado principalmente para visualizar o fluxo sanguíneo através das veias e artérias, e para realizar avaliação pré-cirúrgica das convulsões. O SPECT também é útil no diagnóstico de áreas carentes de sangue (isquemia), fraturas por estresse da coluna vertebral (espondilólise) e tumores (WELLS, 2016).

O exame PET detecta o par de raios gama produzidos pela interação entre um pósitron e um elétron nos tecidos do corpo. O elétron e o pósitron se

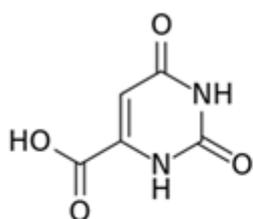
neutralizam, produzindo dois raios gama que se separam em direções opostas. O PET detecta o sinal eletrônico convertendo a energia liberada pelos raios gama em cristais de cintilação (WELLS, 2016).

No entanto, devido à radioatividade emitida por esses complexos, decidiu-se não trabalhar com eles nesta pesquisa. O que observamos é que os complexos com os quais trabalhamos representam um potencial para serem usados como radiofármacos futuramente.

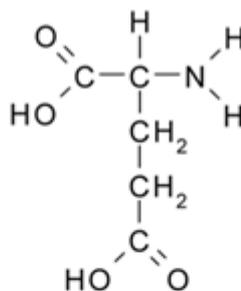
3.2. PRINCIPAIS LIGANTES UTILIZADOS

Foram utilizados os seguintes ligantes: ácido orótico, ácido glutâmico, ácido ftálico e ácido mesacônico, além do 5-fluorouracil, cujas fórmulas podem ser vistas na Figura 2.

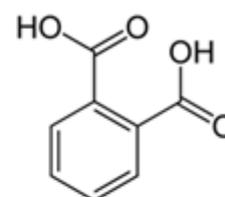
Figura 2. Fórmulas estruturais dos ligantes utilizados



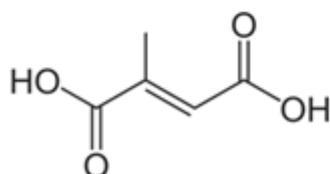
ácido orótico



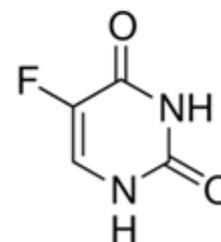
ácido glutâmico



ácido ftálico



ácido mesacônico



5-fluorouracil

Nomenclatura IUPAC dos ligantes utilizados:

- ácido orótico: ácido 1,2,3,6-tetraidro-2,6-dioxopirimidino-4-carboxílico;

- ácido glutâmico: ácido (2S)-2-aminopentanodioico;
- ácido ftálico: ácido 1,2-benzenodicarboxílico;
- ácido mesacônico: ácido (2E)-2-metil-2-butenodioico;
- 5-fluorouracil: 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona.

3.3. ÍONS METÁLICOS UTILIZADOS

Foram utilizados os seguintes íons metálicos: vanádio (IV, VI), platina (II), molibdênio (VI) e tungstênio (VI).

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISES

Os compostos foram caracterizados utilizando-se as seguintes técnicas e equipamentos:

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR): espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier – VERTEX 70 da Bruker. Detector: DLaTGS. Faixa de leitura: 400 a 4000 cm^{-1} . Acessório ATR (Refletância Total Atenuada).

Análise elementar CHNS/O: analisador elementar CHNS/O 2400 série II da Perkin Elmer. Analisa a composição de amostras (CHNS) por meio da combustão em meio de oxigênio puro.

Análise termogravimétrica (TG/DTA): equipamento de análise térmica Seiko. Modelo TG/DTA 6200. Condições da análise: ar sintético, taxa de aquecimento de 10 °C por min e cadinho de alumina.

Difratometria de raios-X: difratômetro de raio-X SIEMENS, modelo D500, DIFFRAC PLUS XRD Commander. Radiação Cu-K α com detector de cintilação e monocromador de grafite. Condições das análises: $2\theta=5-70^\circ$, $0,02^\circ$ e $t=2s$.

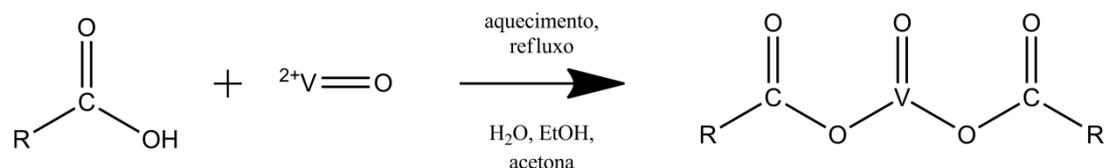
Foram usados os equipamentos do Instituto de Química da Unesp de Araraquara – Laboratório Multiusuários.

3.5. SÍNTESE DOS COMPLEXOS

3.5.1. Síntese dos complexos de vanádio (IV) – (VO²⁺)

Os complexos de vanádio foram obtidos por reação direta entre os ligantes solubilizados em água ou solvente adequado e sais metálicos solubilizados em água (Figura 3). O ajuste do pH foi feito utilizando-se bases como NaOH, KOH, NH₄OH, Ba(OH)₂ e ácidos como HCl, H₂SO₄, HNO₃, aquecimento/refluxo e agitação. Por se tratarem de complexos inéditos, os complexos de vanádio com ácido glutâmico foram preparados diversas vezes por diferentes rotas sintéticas para melhorar o rendimento e diminuir o tempo de obtenção.

Figura 3. Esquema geral de obtenção dos complexos de vanádio

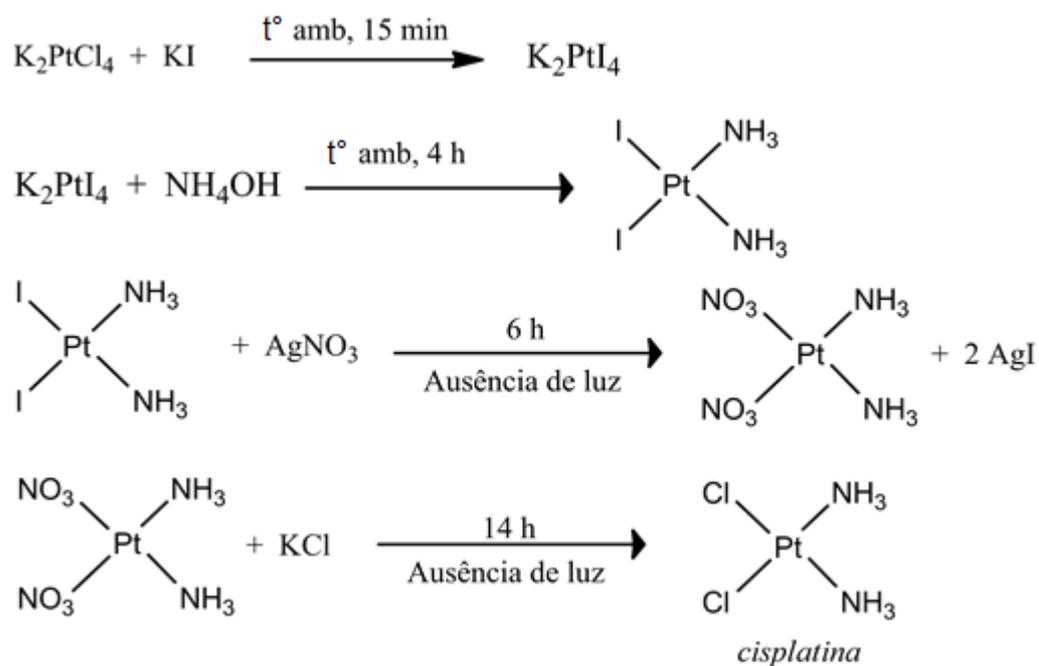


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.2. Síntese dos complexos de platina (II) - Pt²⁺

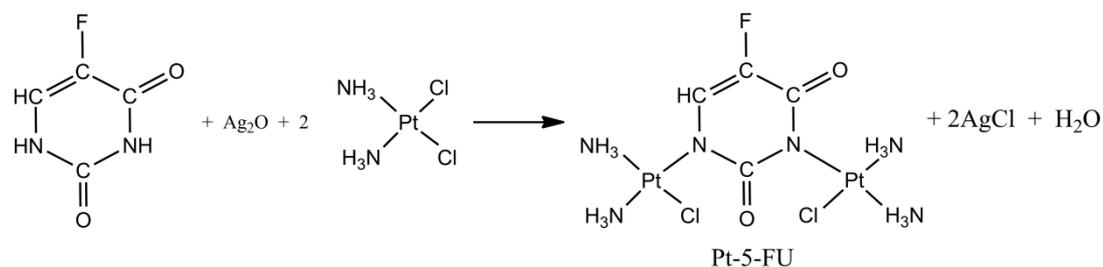
Os complexos de platina foram obtidos utilizando metodologias similares às utilizadas por Liu *et al.* (2014) e Cavicchiolli *et al.* (2015).

O complexo Pt-5-FU foi obtido pela reação entre tetracloridoplatinato de potássio e iodeto de potássio. Ao tetraiodidoplatinato de potássio adicionou-se hidróxido de amônio resultando no diamin-iodidoplatina (precipitado amarelo). As duas etapas finais consistem na adição de nitrato de prata e, posteriormente, cloreto de potássio, resultando na cisplatina (solução alaranjada) (Figura 4).

Figura 4. Esquema de reação para obtenção da cisplatina

Fonte: Cavicchioli, Payolla e Massabni (2015).

O complexo Pt-5-FU foi obtido pela reação entre 5-fluorouracil, óxido de prata e cisplatina, como mostrado na Figura 5. A reação foi feita sob aquecimento (50°C) por 12 horas. Após esse período foi possível notar a formação de um precipitado branco que, quando exposto à luz, rapidamente se tornava escuro. Esse fenômeno foi utilizado como método de identificação do final da reação.

Figura 5. Esquema de reação para obtenção do Pt-5-FU

Fonte: Cavicchioli, Payolla e Massabni (2015).

Todos os complexos obtidos foram lavados com água gelada ou solventes adequados e foram mantidos em dessecadores contendo P_2O_5 /sílica gel sob vácuo, armazenados em tubos tipo *ependorf* e guardados em dessecador contendo sílica gel.

3.6. VIABILIDADE/CITOTOXICIDADE CELULAR

3.6.1. TESTES PRELIMINARES

A viabilidade celular das linhagens GM07492 e MCF-7 foi determinada pelo método de MTT. As células foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular (37 °C, 5% CO_2 , 95% de umidade) em garrafas de cultivo, contendo meio de cultura, suplementado com SBF, antibiótico e antifúngico.

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (KASVI) obtendo uma concentração celular de 1×10^4 células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, durante 24 h para permitir a aderência celular. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L das soluções dos compostos realizando diluição seriada. As células também foram tratadas com DMSO (30%) como controle positivo, e como controle negativo utilizou-se poços com células sem qualquer tratamento. Novamente, as células foram incubadas por 24 h.

Decorrido o período experimental, os poços foram lavados com PBS 1x, aos quais foram adicionados 50 μ L de MTT. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa a 37 °C por 4 h. Após incubação, 100 μ L de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan (corante artificial resultante da redução de sais de tetrazólio por deidrogenases ou redutases presentes nas células testadas).

Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda (λ) de 570 nm em um espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa amostra controle negativo.

Controle negativo: DMEM + STF + antibiótico + antifúngico.

Controle Positivo: DMEM+ STF + 30% de DMSO.

3.6.2. TESTES DOS COMPLEXOS DE VANÁDIO

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se o cloridrato de resazurina (Sigma) como substância reveladora com atividade de oxirredução, com mudança colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular (O'BRIEN *et al.*, 2000).

3.6.2.1. LINHAGENS CELULARES

Foi realizado um *screening* celular utilizando quatro linhagens celulares tumorais e três linhagens celulares normais, a fim de comparar a seletividade das substâncias-teste. As seguintes linhagens foram obtidas no Laboratório de Micobacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF da Unesp de Araraquara. As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's medium* – Sigma Aldrich) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco).

- HepG2 (ATCC HB-8065™), carcinoma hepatocelular humano;
- Caco-2 (BCRJ nº 0059), adenocarcinoma colorretal humano;
- MRC-5 (ATCC® CCI-171™), fibroblastos normais de pulmão humano.

3.6.2.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELA RESAZURINA

Os ensaios de viabilidade celular pela resazurina foram feitos em parceria com a professora Flávia Resende e a mestranda Nádia Aleixo, da Uniara.

A resazurina é um corante azul que pode ser reduzido a resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. Esse corante indica a oxirredução em ensaios de viabilidade celular.

As linhagens celulares foram incubadas sob condições padronizadas (37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂) de cultivo celular em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio de cultura suplementado com SFB (Gibco).

As células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas a 2.000 rpm por 4 min e quantificadas em câmara duplas para contador automático de células [TC20 *Automated Cell Counter* (Bio-RAD)]. Foi adicionada uma solução azul de tripan a 0,2% (Sigma), em proporção 1:1, a fim de ajustar a concentração para $7,5 \times 10^4$ células/mL.

Em seguida, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP) obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, a qual foi incubada, sob as condições já descritas acima, durante 24 h para permitir a aderência celular.

Para o tratamento foram preparadas soluções dos complexos possibilitando realizar 8 diluições na microplaca, a fim de se obter concentrações de 0,97 a 125 µg/mL. Os poços foram preparados com células sem qualquer tratamento e poços com meio de cultura com azida sódica (7,81 a 1000 µg/mL) para realização do controle negativo e positivo, respectivamente. Foi realizado um controle de reação redox advindas dos complexos, no qual foram adicionados os complexos e a solução de resazurina. Após os tratamentos, as células foram novamente incubadas por 24 h. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01% (Sigma). As placas foram novamente incubadas dentre os períodos de 1 a 4 h, de acordo com a linhagem celular.

A leitura da fluorescência foi feita em leitor de microplacas em filtros de excitação nos comprimentos de onda de 530,59 nm.

Os resultados foram expressos pelo IC₅₀ de acordo com o *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) que representa a concentração requerida do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento celular.

3.6.3. TESTES DOS COMPLEXOS DE PLATINA

Foram utilizadas linhagens celulares UM-SCC-1, UM-SCC-22B e UM-SCC-11A em placas de 48 poços com quantidade de 1.104 células por poço. Os controles positivos usados foram 30 mM de 5-fluorouracil, 70 µM de cisplatina, 30 µmmol.L⁻¹ de citomicina C e 10 µmmol.L⁻¹ de etoposídeo. As concentrações utilizadas para testar os complexos foram de 35 e 70 µmmol.L⁻¹ para os complexos Pt-5-Fu, Pt-ftalato, Pt-mesaconato e Pt-5-FU. Para o teste de apoptose foi utilizado um período de 24 h e para a proliferação foram utilizados períodos entre 24 e 120 h.

O método de leitura das placas é totalmente automatizado e os resultados são dados na forma de um mapa de calor com indicação da porcentagem de células viáveis e que sofreram apoptose.

3.6.4. TESTE DE AMES

O teste de mutação bacteriana reversa, também conhecido como teste de Ames, é mundialmente utilizado como base na avaliação do perfil toxicogênico, sendo um dos primeiros testes a ser realizado (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). No decorrer dos anos, ganhou reconhecimento na comunidade científica, em corporações e em agências governamentais. Esse teste é capaz de avaliar se um determinado composto químico tem a capacidade de produzir danos que acarretam em mutações genéticas (TEJS, 2008), ou seja, se ele consegue detectar a interação de agentes mutagênicos com o DNA (WALMSLEY, 2005).

As cepas bacterianas utilizadas são geneticamente modificadas e podem ser de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (TEJS, 2008). Além disso, os tipos de mutações avaliadas podem ser tanto as de *frameshift* quanto as de substituição de bases (MARON; AMES, 1983).

No teste de Ames, as linhagens bacterianas são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina (histidina dependentes), e, portanto, são incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência. Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Essas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por essa razão, o teste é muitas vezes referido como um “ensaio de reversão”. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias à amostra a ser testada (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001). Dessa forma, através da contagem de colônias por placa, é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração (ZEIGER, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

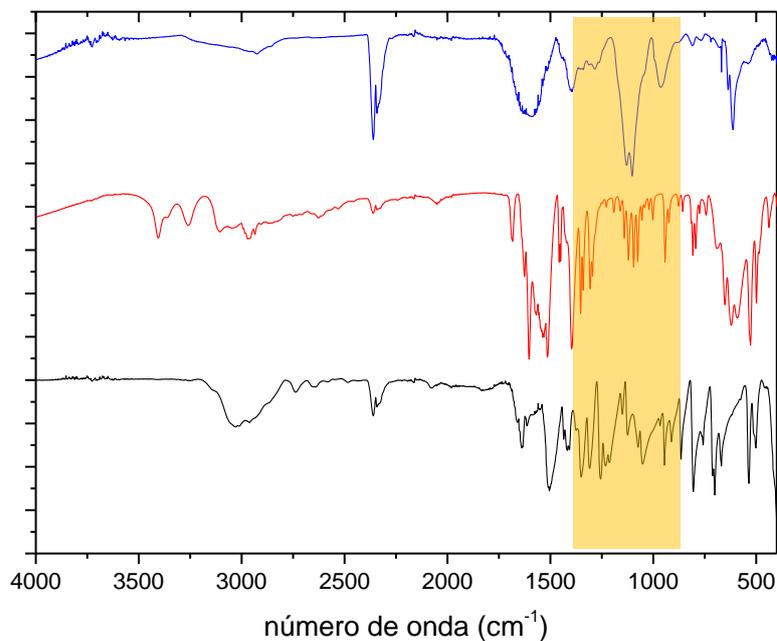
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram utilizados para identificar a presença ou a ausência de certos tipos de ligações: ausência da banda N–H nos compostos contendo 5-FU, presença da banda COO⁻ nos compostos contendo aminoácidos e ácidos carboxílicos. O deslocamento de bandas também foi usado como uma evidência da ligação entre o íon metálico e os ligantes.

Como exemplo de espectro obtido para um dos compostos contendo o íon VO²⁺ e um α -aminoácido, podemos destacar as regiões entre 3500 e 3000 cm⁻¹ e 1250 e 1000 cm⁻¹ (Figura 6). As bandas da região entre 3500 e 3000 cm⁻¹ são características das ligações NH₃⁺ do glutamato monossódico hidratado, de acordo com a sua estrutura química mais comum, representada na Figura 7. O retângulo amarelo na Figura 6. Espectros de absorção na região do infravermelho do complexo GV1 e seus precursores identifica as regiões de interesse no espectro de absorção no infravermelho das moléculas de ácido glutâmico (em preto), glutamato monossódico (em vermelho) e do complexo Na[VO(OH)(C₅H₈NO₄)] (em azul).

A identificação das bandas de espectros FTIR de compostos contendo o ácido glutâmico/glutamato monossódico já foi extensivamente discutida por diversos autores em artigos e livros didáticos, não sendo, assim, necessário identificar cada banda para a utilização (DHAMELIN COURT; RAMIREZ, 1991; PEARSON; SLIFKIN, 1972).

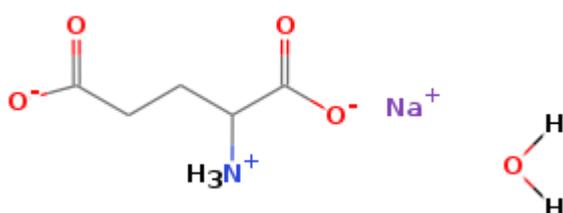
Figura 6. Espectros de absorção na região do infravermelho do complexo GV1 e seus precursores



Ácido glutâmico (em preto), glutamato monossódico (em vermelho) e $\text{Na}[\text{VO}(\text{OH})(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4)]$ (em azul).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7. Estrutura química do glutamato monossódico hidratado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

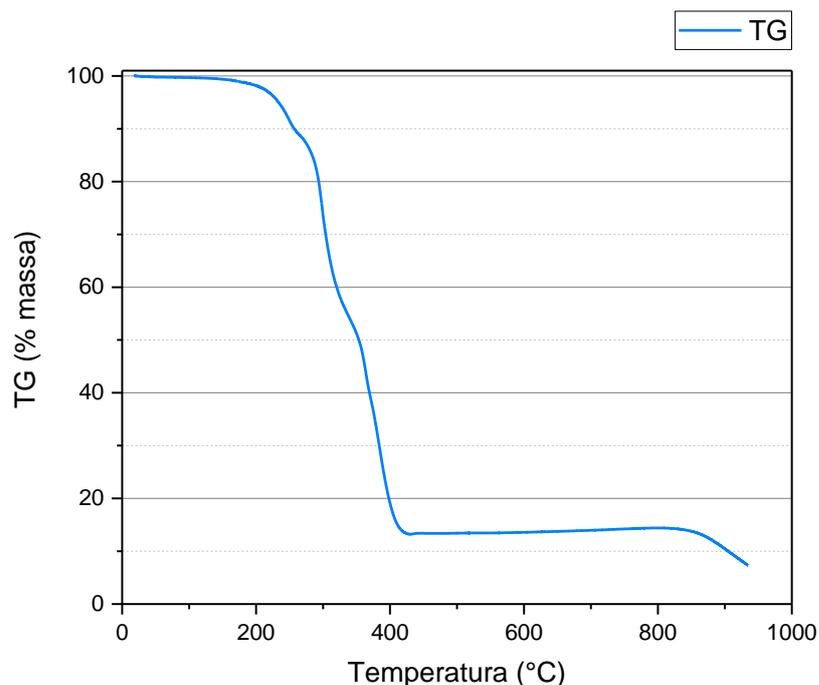
4.1.1. Orotato de oxovanádio – $[\text{VO}(\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4)_2]$ – VO(oro)

O orotato de oxovanádio $[\text{VO}(\text{oro})]$ já foi descrito na literatura, porém não houve estudos de suas atividades antibacteriana e antitumoral. A caracterização

do complexo formado pela reação entre o ácido orótico ($C_5H_4N_2O_4$) e vanadilsulfato ($VOSO_4 \cdot 3H_2O$) foi feita pela análise das principais bandas dos espectros FTIR do ligante livre e do composto formado. O principal indicativo da formação do complexo é o deslocamento das bandas características do carboxilato, que aparece em 1700 cm^{-1} no ligante livre e em 1651 cm^{-1} no complexo (MAISTRALIS; KOUTSODIMOU; KATSAROS, 2000).

Os resultados da análise elementar CHN obtidos são similares aos citados na literatura (MAISTRALIS; KOUTSODIMOU; KATSAROS, 2000), confirmando a obtenção do complexo de fórmula $[VO(C_5H_4N_2O_4)]$. Os valores encontrados (exp. e calc.) foram os seguintes, em porcentagem: %C=29,98(31,8), %H=2,17(1,6) e %N=13,64(14,9). A análise termogravimétrica do VO(oro) (Figura 8) apresenta como resíduo final o V_2O_5 . O DRX do resíduo obtido a $600\text{ }^\circ\text{C}$ é compatível, mesmo que com a baixa intensidade do sinal devido ao baixo tempo de aquisição utilizado na análise, com as fichas cristalográficas do pentóxido de vanádio.

Figura 8. Termogravimetria do orotato de oxovanádio



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2. Glutamato de oxovanádio – Na[VO(OH)(C₅H₈NO₄)] – VO(α -glu)

O glutamato de oxovanádio obtido pela reação entre o ácido glutâmico, NaOH e VOSO₄ é um pó de coloração azul, pouco higroscópico e solúvel em água. A coloração azul do composto é indicativa da presença de íons VO²⁺ em sua composição.

O vanádio é um metal que sofre facilmente oxidação ou redução através de alterações no pH, diferentes concentrações e pela presença de oxigênio. Para evitar a oxidação ou redução do íon VO²⁺, algumas etapas foram seguidas durante a preparação dos compostos. Foi utilizada água milliQ previamente mantida em ebulição por 10 min para retirada do oxigênio dissolvido; após a ebulição, a água foi mantida sob vácuo por 30 min para retirada de gases ainda presentes na água e o sistema de refluxo foi, na medida do possível, mantido vedado.

Os resultados da análise elementar %C=22,52(23,83), %H=3,42(3,20) e %N=5,28(5,23) são condizentes com um complexo do tipo 1:1 (M:L) com um íon Na⁺ no γ -COO⁻. A massa molar do complexo obtido é de 252 g.mol⁻¹.

4.1.3. Glutamato de oxovanádio – Na[VO(OH)₂(C₅H₈NO₄)] – VO(γ -glu)

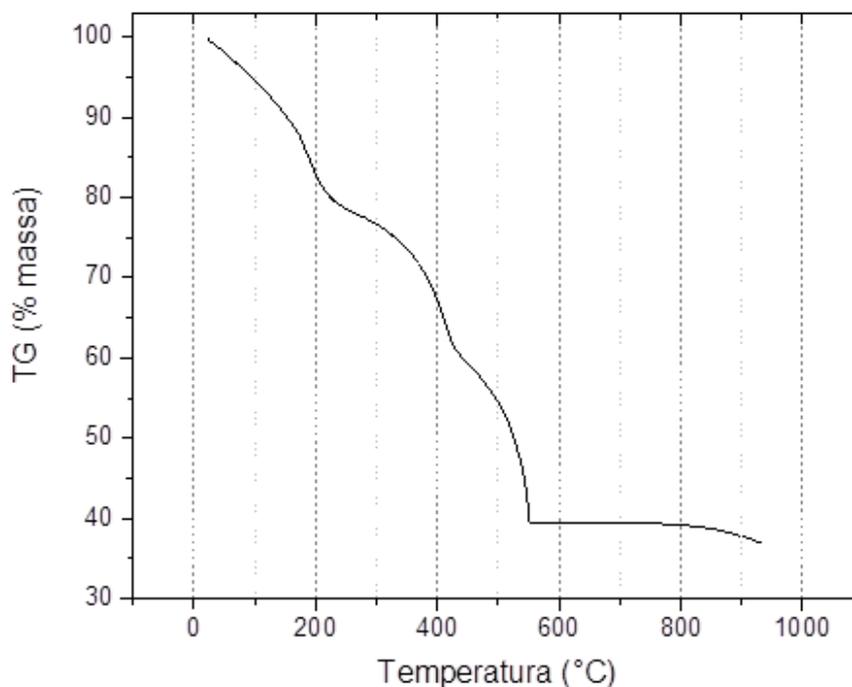
A síntese do VO(γ -glu) foi desenvolvida de modo similar à do VO(α -glu), mas com adição de NaOH até atingir pH 5,0, ultrapassando assim o pK_{a2} do ácido glutâmico, que é igual a 4,07. Tal ajuste foi feito para desprotonar o γ -COOH para se obter um composto com o glutamato na forma bidentada. Analisando os espectros de FTIR e as análises elementares dos compostos VO(α -glu) e VO(γ -glu), é possível afirmar que não há diferença no tipo de ligação dos ligantes, mas pela cor dos compostos é possível afirmar que o VO(γ -glu) contém maior quantidade de íons VO³⁺.

Ao ajustar o pH para valores maiores que 5 pode ocorrer a oxidação do VO²⁺ ou a formação de dímeros e polímeros de VO²⁺, o que dificulta a

caracterização dos compostos obtidos em pH acima de 4. Os resultados da análise elementar %C=22,32(22,74), %H=3,37(3,62), e %N=5,21(5,28) são condizentes com um complexo do tipo 1:1 (M:L) com um íon Na^+ no $\gamma\text{-COO}^-$. A massa molar do complexo obtido é de $269 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

A análise termogravimétrica do composto mostra as perdas de massa do composto e a formação de um resíduo final, V_2O_5 , com massa igual a 39,97% da massa inicial, como mostrado na Figura 9. Calculando a porcentagem de vanádio no resíduo final, chegou-se ao valor de 21,85% de vanádio no composto. Tal valor é próximo ao valor calculado, igual a 19,55%, confirmando assim sua composição.

Figura 9. Termogravimetria do composto $\text{VO}(\gamma\text{-glu})$



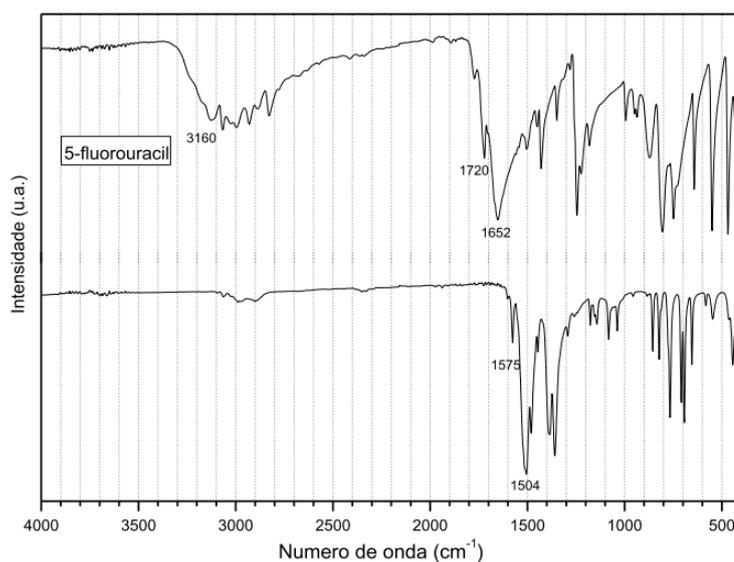
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4. Pt-5-FU

Foi obtido um composto amarelado não higroscópico pela reação entre cisplatina, óxido de prata e 5-fluorouracil. Foi usada a proporção 1:2 (M:L) e, pela comparação dos espectros de FTIR do ligante livre e do composto (Figura 10),

é possível notar a ausência de bandas na região de 3160 cm^{-1} , características de estiramento N–H, no espectro do complexo. As bandas em 1720 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} são referentes aos estiramentos dos grupos C=O do ligante. Essas bandas sofrem deslocamentos para 1575 cm^{-1} e 1504 cm^{-1} , devido à coordenação da Pt(II) aos átomos de nitrogênio vizinhos ao grupo C=O.

Figura 10. Espectro FTIR do 5-fluorouracil e do complexo de Pt-5-fluorouracil



Fonte: Elaborado pelo autor.

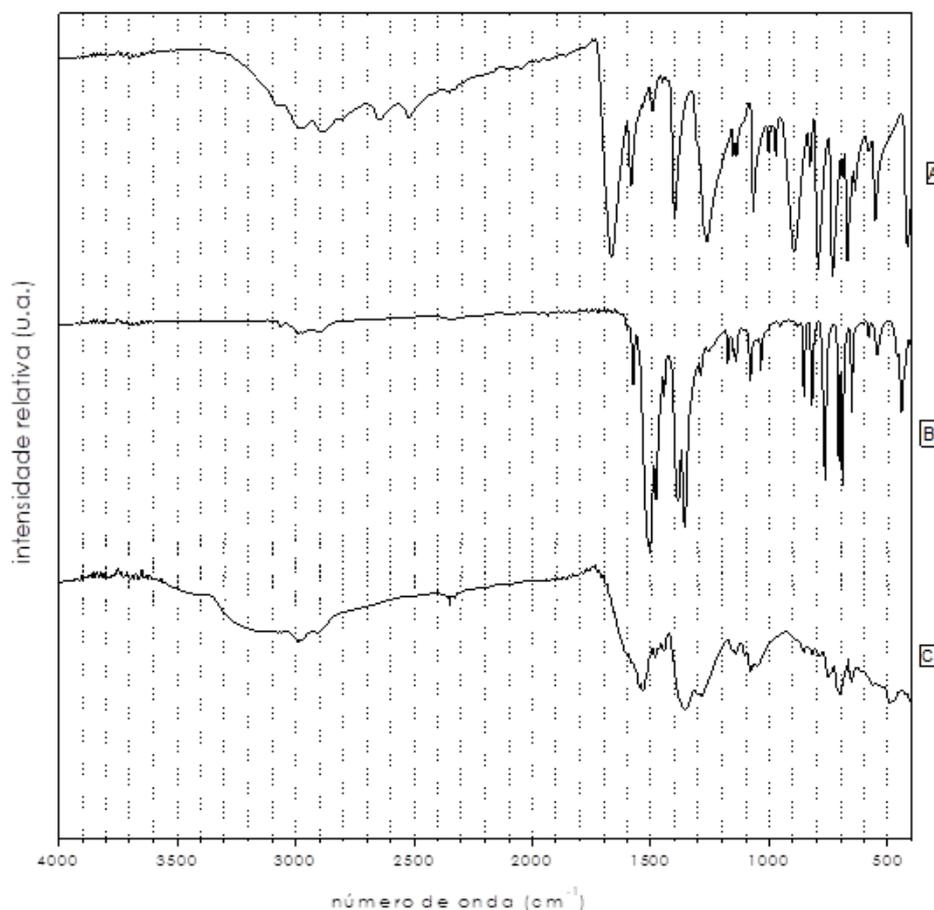
A análise elementar do complexo resultou nos valores (exp. e calc.) %EC=7,0(7,3), %H=1,99(1,99), e %N=11,4(12,8), sendo possível afirmar que o composto tem massa molar igual a $657,24\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e fórmula $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_4(\text{C}_4\text{HN}_2\text{O}_2\text{F}_2)_2]$.

4.1.5. Pt-ftalato

O composto obtido pela reação entre o Ag-ftalato e a cisplatina resultou em um composto azulado não higroscópico com composição aproximada (exp. e calc.) de %C=24,12(24,43), %H=2,86(2,56) e %N=6,73(7,12), que indica a formação do complexo Pt-ftalato. O resíduo da análise termogravimétrica é compatível com Pt⁰ e indica que a porcentagem de platina no composto é de 41%, sendo a porcentagem calculada de aproximadamente 49%. O espectro vibracional no infravermelho do composto apresentado na Figura 11 evidencia a formação do composto, pelas análises das bandas do COOH na região de 1700 cm⁻¹ e pelo deslocamento das bandas do COO⁻ quando ligado aos átomos de prata e platina.

Esse composto foi preparado diversas vezes, utilizando rotas sintéticas diferentes e os complexos obtidos sempre apresentavam uma coloração azul [devido às transições HOMO – LUMO da platina (II)]. Como é sabido, compostos de platina (II), principalmente a *cis*- e a carboplatina, apresentam coloração entre as cores amarela e vermelha, sendo alaranjada a cor mais comum. Não foi possível identificar nenhuma etapa que pudesse causar a oxidação da platina (II) para platina (IV).

Uma nova rota sintética, diferente da proposta inicialmente, também foi utilizada e, após a caracterização por FTIR, foi comprovado se tratar do mesmo produto. Essas informações serão úteis para a discussão dos resultados de atividade antitumoral *in vitro*.

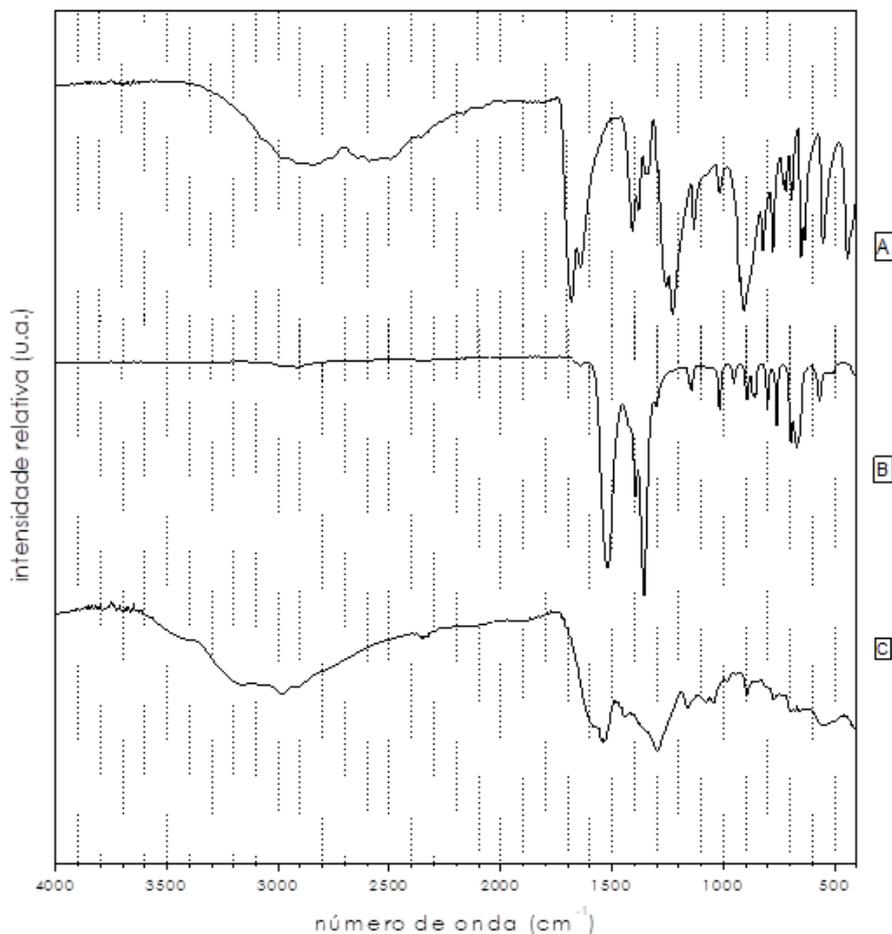
Figura 11. Espectros FTIR dos compostos contendo ácido ftálico

A: ácido ftálico, B: ftalato de prata, C: ftalato de Pt.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.6. Pt-mesaconato

Foi obtido um composto de coloração azulada não higroscópico pela reação entre o mesaconato de prata e a cisplatina. Os espectros FTIR do ácido mesacônico, Ag-mesaconato e Pt-mesaconato foram agrupados na Figura 12 e é possível observar a formação do complexo pela análise das bandas do COOH na região de 1700 cm^{-1} e pelo deslocamento das bandas do COO^- quando ligado aos átomos de prata e platina.

Figura 12. Espectros FTIR dos compostos contendo ácido mesacônico

A: ácido mesacônico, B: mesaconato de Ag, C: mesaconato de Pt.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Similarmente ao Pt-ftalato, o Pt-mesaconato foi repreparado diversas vezes para confirmar a obtenção do mesmo produto em todas essas sínteses. Esse composto foi repreparado usando a mesma rota sintética citada para o Pt-ftalato, mas também resultou em um complexo azulado.

Essas informações serão úteis para a discussão dos resultados de atividade antitumoral *in vitro* e para confirmação da presença de Pt(II) no complexo obtido.

4.1.7. Ácido orótico com vanádio (VI), molibdênio (VI) e tungstênio (VI)

Os valores experimentais e propostos da análise elementar para o complexo V-rotato são descritos na Tabela 1. A fórmula proposta $\text{VO}_2(\text{rotato})$ é a que melhor se ajusta aos valores experimentais. O valor do resíduo final na análise termogravimétrica foi de 35% e está de acordo com a formação de óxido de vanádio (VO_3).

A Tabela 2 apresenta os valores experimentais e propostos da análise elementar para o complexo Mo-rotato. Nesse caso, o potássio foi adicionado à fórmula, para equilibrar as cargas do complexo contendo Mo(VI). A fórmula proposta que melhor se ajusta aos valores experimentais é $\text{KMoO}_2(\text{rotato})$. O valor do resíduo final na análise termogravimétrica foi de 45% e está de acordo com a formação de óxido de molibdênio (MoO_3).

Diferentemente dos complexos anteriores, a fórmula proposta do complexo de tungstênio inclui duas moléculas do ligante rotato. Como os outros complexos, o equilíbrio de carga é completo com dois átomos de oxigênio. A fórmula proposta (Tabela 3) que melhor se ajusta aos valores experimentais é a $\text{WO}_2(\text{rotato})_2$. O valor do resíduo final na análise termogravimétrica foi de 45% e está de acordo com a formação de óxido de tungstênio (WO_3).

Tabela 1. V-rotato. Valores experimentais e fórmula proposta

	<i>Exp.</i>	<i>Proposta para VO₂oro</i>
%C	24,12	25,2
%H	1,52	1,27
%N	14,46	11,8
Massa molar		238,03
% VO ₂ no resíduo final de TG (1000 °C)	35	34

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Mo-rotato. Valores experimentais e fórmula proposta

	<i>Exp.</i>	<i>KMoO₂oro</i>
%C	20,77	18,6
%H	1,18	0,94
%N	11,3	8,7
Massa molar		322,13
% of MoO ₃ no resíduo final de TG (1000 °C)	45%	40,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. W-rotato. Valores experimentais e fórmula proposta

	<i>Exp.</i>	<i>WO₂oro₂</i>
%C	22,68	22,8
%H	0,93	1,15
%N	12,03	10,65
Massa molar		526,02
% of WO ₃ no resíduo final de TG (1000 °C)	45%	44

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 13 mostra a curva termogravimétrica do V(rotato), que apresenta uma perda de peso mais definida com patamares mais planos ao longo da curva. A curva mostra uma perda de peso líquido de cerca de 65%, consistente com a formação final de VO₃. Uma perda de peso inicial de 2% a 78 °C corresponde à perda da água de hidratação. Uma segunda perda de 4% ocorre a 194 °C, e pode ser atribuída à água de cristalização. A terceira perda ocorre a 413 °C, o que corresponde à decomposição da maior parte do ligante. Uma segunda perda do ligante parece ocorrer entre 420 e 800 °C. A 1000 °C, o peso é cerca de 35% da massa inicial e consistente com a formação de VO₃ como resíduo final.

A Figura 14 mostra a curva termogravimétrica do Mo(rotato). A curva mostra uma perda de peso líquido de cerca de 56%, consistente com a formação final de MoO₃. Uma perda de peso inicial de 5% a 95 °C corresponde à perda da

água de hidratação. Uma segunda perda ocorre a 405 °C, o que corresponde à decomposição da maior parte do ligante. A 1000 °C, o peso é cerca de 44% da massa inicial consistente com a formação de MO_3 como resíduo final.

A Figura 15 mostra a curva termogravimétrica do W(oroato). A curva mostra uma perda de peso líquido de cerca de 44%, consistente com a formação final de WO_3 . Uma perda de peso inicial de 2% a 75 °C corresponde à perda da água de hidratação. Uma segunda perda ocorre a 401 °C, o que corresponde à decomposição da maior parte do ligante. Uma segunda perda do ligante parece ocorrer entre 400 e 600 °C. A 1000 °C, o peso é de cerca de 44% da massa inicial e consistente com a formação de WO_3 como resíduo final.

A análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos três complexos de ácido orótico (Figura 16) indica a ocorrência do mesmo evento exotérmico a 410-420 °C, que corresponde à decomposição do ligante.

Após análise dos espectros (Figura 17 e Tabelas 4 e 5), chegou-se às seguintes conclusões:

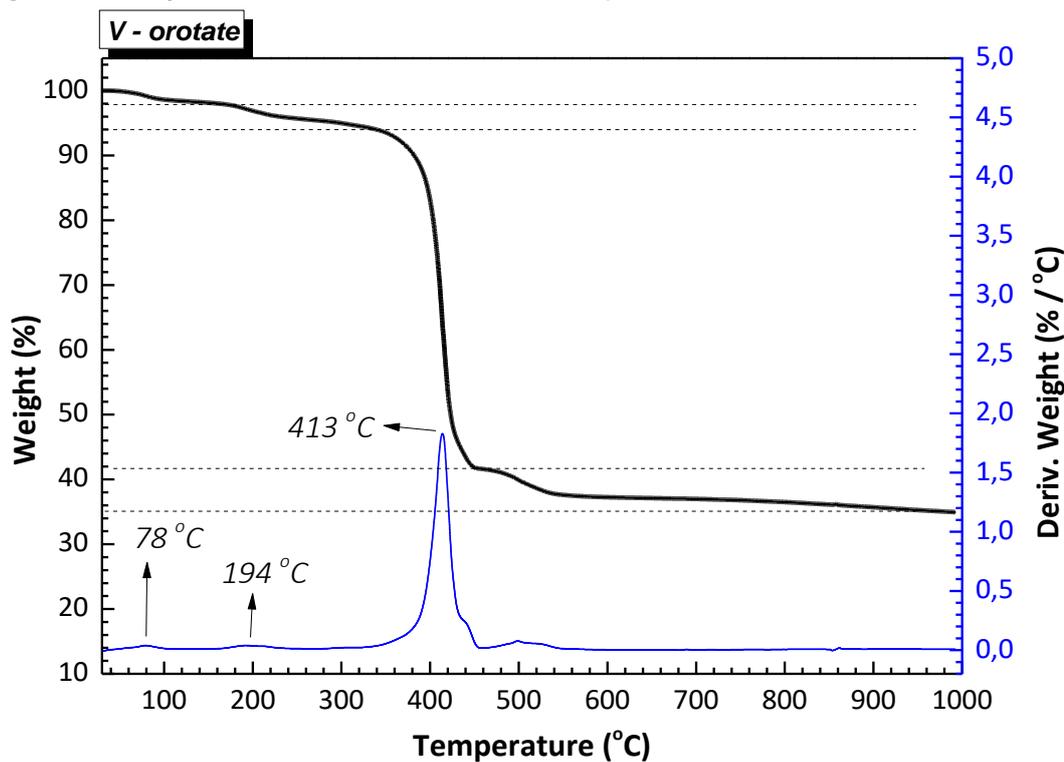
a) ausência de bandas OH de COOH em 3500 cm^{-1} em K(oro) e nos complexos indicando apenas COO^- no sal e complexos;

b) Bandas em 3100-3150, 2990-3110 e 2830-2980 sugerem N-H do anel não coordenado;

c) Outros grupos C=O do anel foram excluídos da ligação ao metal porque a distância da COO^- é muito grande.

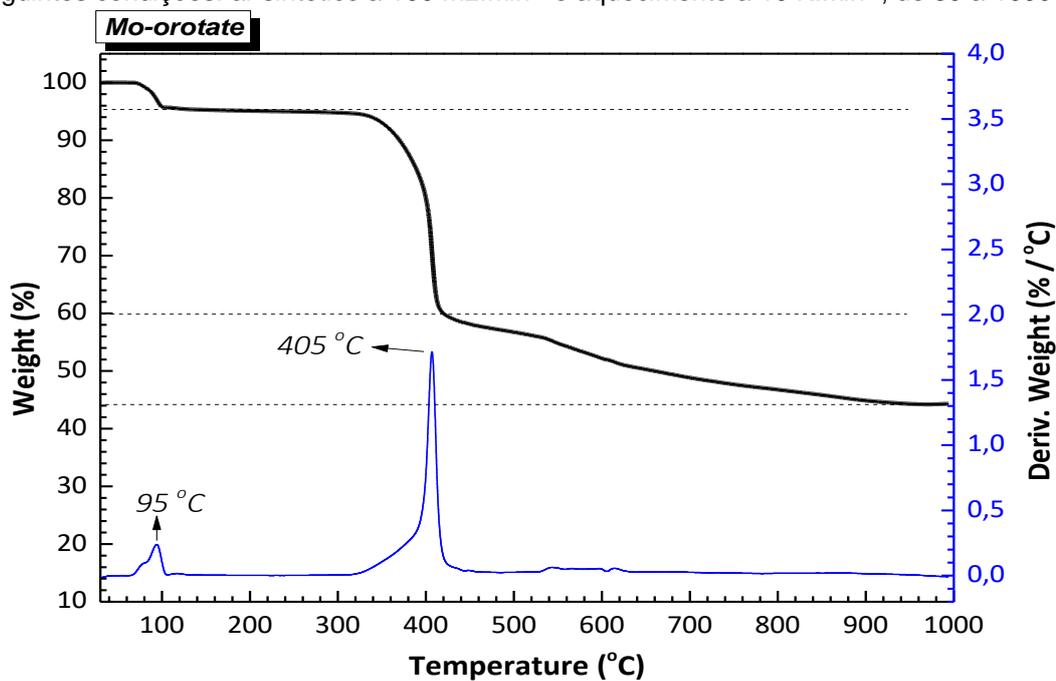
d) Os valores de $\Delta\nu$ na faixa de $300\text{-}340\text{ cm}^{-1}$ sugerem como grupo COO^- monodentado nos quatro casos (MEHROTRA; BOHRA, 1983).

Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo vanádio-oroato, sob as seguintes condições: ar sintético a 100 mL.min⁻¹ e aquecimento a 10 K.min⁻¹, de 30 a 1000 °C



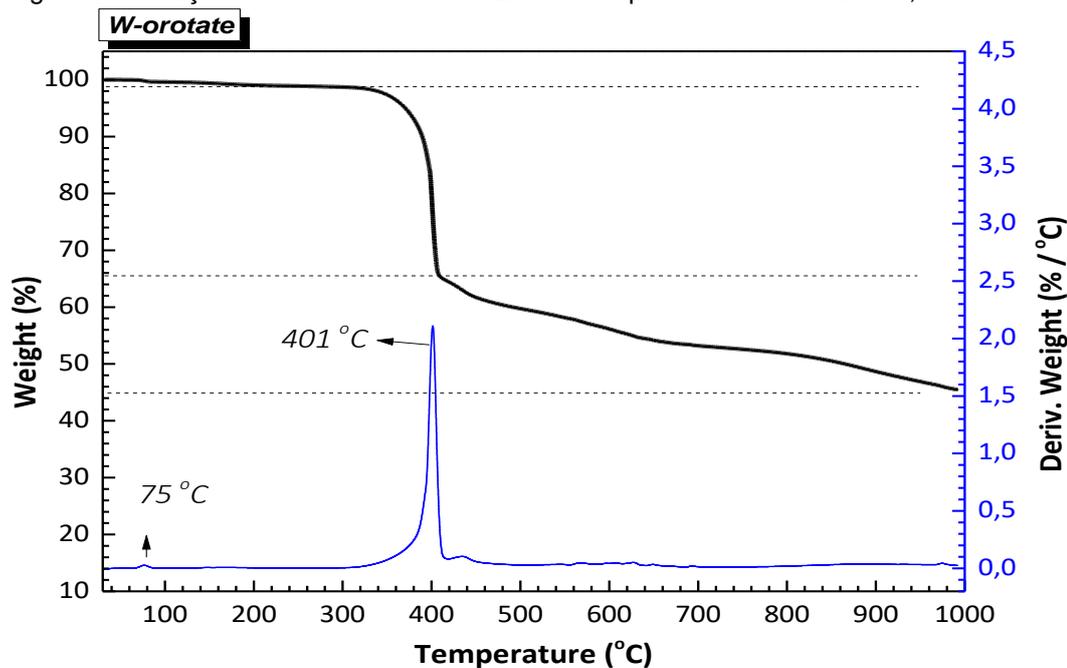
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo molibdênio-oroato, sob as seguintes condições: ar sintético a 100 mL.min⁻¹ e aquecimento a 10 K.min⁻¹, de 30 a 1000 °C



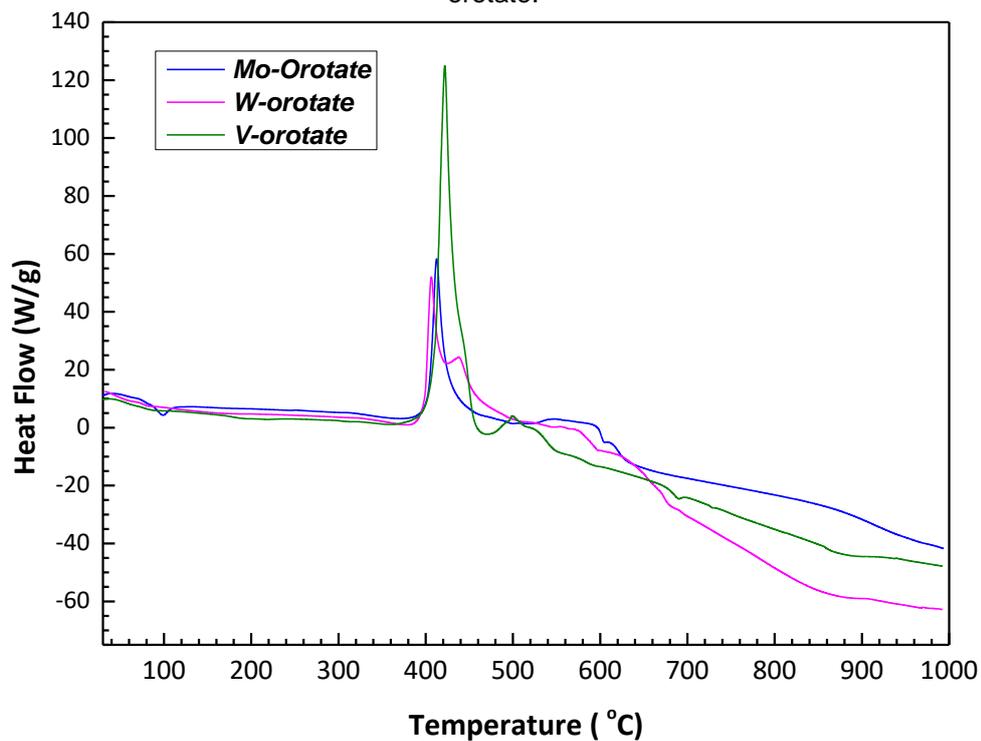
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15. Curvas termogravimétricas (TG e DTG) do complexo tungstênio-orotato, sob as seguintes condições: ar sintético a $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e aquecimento a $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$, de 30 a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16. Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos três complexos de orotato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. Frequências de IR (cm^{-1}) de ácido orótico (oro), orotato de potássio K(oro), orotato de vanádio V(oro), orotato de molibdênio Mo(oro) e orotato de tungstênio W(oro) na região 1700-1300 cm^{-1}

oro	K(oro)	V(oro)	Mo(oro)	W(oro)
1655(b)	1692(s)	1695(s)	1684(s)	1685(s)
1508				1490(w)
1420			1495(w)	1421(w)
1336	1370(s)	1364(s)	1383(s)	1377(s)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5. Cálculo da diferença ($\Delta\nu$ cm^{-1}) entre o estiramento assimétrico (C–O) e o alongamento simétrico (C–O).

	Estiramento assimétrico de C–O	Estiramento simétrico de C–O	$\Delta\nu$ cm^{-1}
K(oro)	1692(s)	1370(s)	322
V(oro)	1695(s)	1364(s)	331
Mo(oro)	1684(s)	1383(s)	301
W(oro)	1685(s)	1377(s)	308

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Testes de atividade antitumoral *in vitro*

Foram feitas três sequências de análise *in vitro*, sendo uma preliminar para os complexos de vanádio e duas mais detalhadas para os complexos de vanádio e platina. Os resultados serão analisados abaixo.

4.2.1. Complexos de vanádio – VO(oro), VO(α -glu) e VO(γ -glu)

Foram feitos dois testes de atividade biológica *in vitro* do orotato de oxovanádio, sendo que, no primeiro, foi possível demonstrar que o composto tem um índice de seletividade igual a 4,9 e as concentrações necessárias para causar a morte de 50% das células tumorais foi de 0,32 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a linhagem MCF-7. O índice de seletividade é calculado pela divisão entre a concentração do composto necessária para causar a morte de 50% das células normais e a concentração do composto necessária para causar a morte de 50% das células

tumorais. Para a cisplatina, que é a droga de referência para os testes, o ID_{50} é de $34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o índice de seletividade é igual a 0,80. Por esses resultados é possível afirmar que o composto obtido tem uma boa atividade antitumoral, mesmo sendo necessária uma concentração dez vezes maior que a concentração de cisplatina.

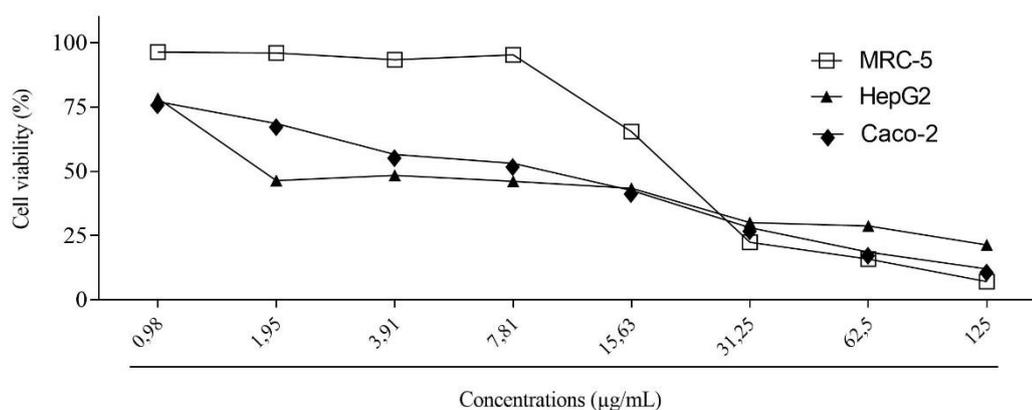
Os testes de atividade antitumoral *in vitro* do VO(γ -glu) para as linhagens GM07492 e MCF-7, células normais e de câncer de mama, respectivamente, resultaram nos valores de ID_{50} iguais a $0,748 \text{ mg.mL}^{-1}$ para a GM07492 e $0,447 \text{ mg.mL}^{-1}$ para a MCF-7. O índice de seletividade calculado foi de 1,7, um resultado claramente não satisfatório.

O segundo teste utilizou outras linhagens de células e o resultado foi diferente do esperado. No primeiro caso, mesmo que demonstrando uma ação menor que a cisplatina, o VO(oro) apresentou um índice de seletividade quase cinco vezes maior. Nos testes utilizando as linhagens MRC-5 (células fibroblásticas de pulmão humano), HEP-G2 (células de carcinoma hepatocelular) e Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal), é possível notar que, entre as concentrações de $0,98$ e $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o complexo não tem atividade contra as células MRC-5, e induz a morte celular já em concentrações de $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 18). Nas células HEP-G2, é possível observar a queda na viabilidade celular para valores menores que 50% já em concentrações de $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto a viabilidade celular das células MRC-5 não é alterada. Para células da linhagem Caco-2, entre $0,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e valores menores que $15,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os valores da viabilidade celular apresentam uma queda que varia entre 75% e 50%, sendo que em $15,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o valor da viabilidade celular fica abaixo de 50%. Para valores de concentrações acima de $15,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a ação em todas as linhagens é similar, mostrando que nessas concentrações ocorre a morte de todas os tipos de células (normais ou cancerosas).

Tais resultados são interessantes para demonstrar a ação antitumoral do complexo VO(oro) e suas potencialidades. Claramente, a ação do complexo é muito menor que a ação da cisplatina, mas é sabido que íons e complexos de vanádio são muito menos tóxicos ao organismo humano que a cisplatina. Muitos artigos citam o uso de sais e complexos de vanádio para mimetização da insulina

e, mesmo em doses muito elevadas, o vanádio não se mostrou tóxico a longo prazo. A maior dificuldade do uso do vanádio como substituto da insulina foi sua eliminação pelos rins, causando doenças renais devido ao acúmulo do metal (MJOS; ORVIG, 2014; THOMPSON *et al.*, 2009; THOMPSON; ORVIG, 2006).

Figura 18. Teste de viabilidade celular do complexo VO(oro)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. IC₅₀ dos complexos, ligantes e íon metálico de vanádio sobre as linhagens celulares testadas

	MRC-5	HepG2	Caco-2
VOSO₄·3H₂O	26,77 ± 0,70	110,78 ± 32,76	53,55 ± 3,50
VO(α-glu)	70,79 ± 7,50	7,90 ± 1,87	44,56 ± 4,21
VO(γ-glu)	73,72 ± 0,27	14,31 ± 0,05	27,77 ± 0,10
VO(oro)	54,69 ± 0,15	13,32 ± 0,04	19,79 ± 0,05
ácido glutâmico	> 6800	> 6800	> 6800
ácido orótico	> 6400	> 6400	> 4400

Fonte: Elaborado pelo autor.

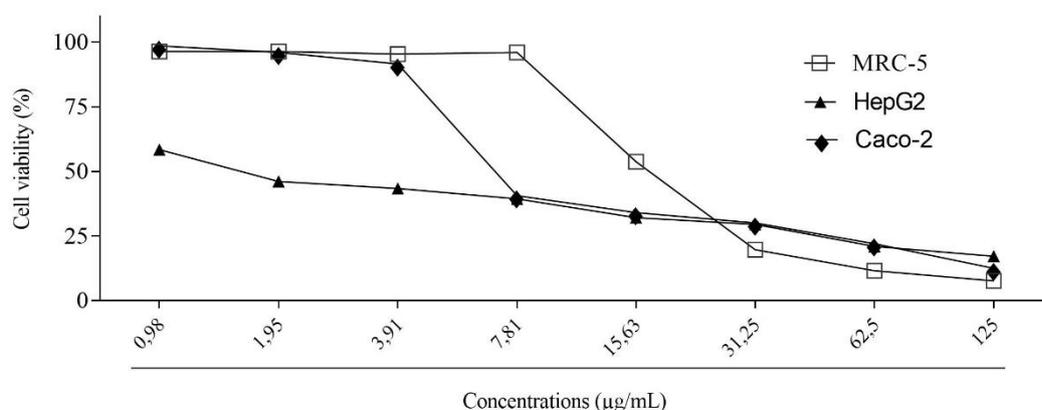
É possível observar na Tabela 6 que o IC₅₀ para células da linhagem normal (MRC-5) é muito maior que do sal de vanádio. Esse resultado indica que

a complexação do íon metálico com os ligantes propostos causou maior seletividade e menor citotoxicidade em células normais. As concentrações para causar a morte de 50% das células é no mínimo duas vezes maior para o VO(oro) e três vezes maior para os outros dois complexos.

A atividade antitumoral do VO(α -glu) em células HepG2 foi quase 15 vezes maior que a atividade do sal de vanádio, ou seja, a concentração de VO(α -glu) necessária para causar a morte de metade das células é quase 15 vezes menor que a concentração de VOSO₄ (Figura 19). Para o VO(γ -glu), é necessária uma concentração 8 vezes menor para alcançar o mesmo efeito, sendo que esse complexo apresenta o melhor índice de seletividade entre os complexos testados. O complexo VO(oro) apresenta um IC₅₀ de 13,32 μ M, ou seja, sua ação é 8 vezes maior que o sal de vanádio. Seu IC₅₀ para as células normais foi de 54,69 sendo esse um valor duas vezes melhor que o sal de vanádio.

Para a linhagem Caco-2, o VO(oro) foi o complexo que apresentou a melhor atividade antitumoral com o valor de IC₅₀ igual a 19,79 μ M, seguido pelo VO(γ -glu) com valor igual a 27,77 μ M e o VO(α -glu) com valor igual a 44,56 μ M. O VOSO₄ apresentou um valor igual a 53,55 μ M, sendo, portanto, quase três vezes maior que o valor do VO(oro) e quase duas vezes maior que o valor do VO(γ -glu).

Figura 19. Teste de viabilidade celular do complexo VO(α -glu)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Levando em conta a diferença entre os valores, é possível propor uma faixa de uso para cada complexo obtido. Já que a citotoxicidade em células tumorais é maior que a citotoxicidade em células normais, é possível calcular os índices de seletividade de cada composto para cada linhagem celular, como mostrado na Tabela 7:

Tabela 7. Índice de seletividade dos complexos para as linhagens celulares testadas

	HepG2	Caco-2
VO(α-glu)	8,96	1,58
VO(γ-glu)	5,15	2,65
VO(oro)	4,10	2,76

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tais resultados são muito promissores e continuarão a ser estudados em projetos futuros. Não é possível propor o mecanismo de ação desses complexos, mas supõe-se que seja similar ao mecanismo de ação de outros complexos de vanádio já citados na literatura.

Serão necessários testes para esclarecer o grau de seletividade entre células normais e células tumorais, mas é possível especular que a complexação dos íons de vanádio favoreça a sua captação, hidrólise intracelular e atividade antitumoral.

4.2.2. Complexos de platina – Pt-ftalato, Pt-mesaconato e Pt-5-FU

Os complexos de platina foram testados em linhagens celulares de câncer de boca (UM-SCC-1), de hipofaringe (UM-SCC-22b) e de laringe (UM-SCC-11A). Os resultados obtidos para os complexos de Pt-ftalato e Pt-mesaconato

foram muito aquém dos esperados. Nesses dois casos, a ação antitumoral foi praticamente inexistente. A cisplatina, que foi usada como controle positivo, causa a morte de aproximadamente 93% das células tumorais da linhagem UM-SCC-1; e a 5-FU, também usada como controle positivo, causa a morte de aproximadamente 54% das células tumorais dessa mesma linhagem. Era de se esperar que a ação desses dois complexos fosse similar à ação da cisplatina, pois tais complexos são análogos à cisplatina e à carboplatina. Os complexos Pt-ftalato e Pt-mesaconato apresentaram uma ação de aproximadamente 30% apenas para as células da linhagem UM-SCC-22b. Para as outras duas linhagens os resultados não foram maiores que 15%.

Durante a análise dos dados, foi possível descobrir que um erro de cálculo acabou por resultar na utilização de uma concentração de 5-FU, como controle positivo, de $307 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ ao invés de $40 \mu\text{mmol.L}^{-1}$. Como não foi possível repetir esses experimentos, a análise feita será comparativa considerando o valor de $307 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ para a 5-FU.

A concentração usada do complexo Pt-5-FU foi de 35 e $70 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ e essas concentrações causaram a morte de aproximadamente: UM-SCC-1 = 28% e 60%; UM-SCC-11a = 20% e 40%; e UM-SCC-22b = 17% e 64%, respectivamente. Comparando com os resultados da 5-FU: UM-SCC-1 = 54%; UM-SCC-11a = 32%; e UM-SCC-22b = 51%, é possível observar que concentrações quase dez vezes menores dos complexos conseguiram apresentar boa atividade antitumoral.

O complexo de Pt-5-FU terá de ser testado novamente para identificar sua ação antitumoral e sua seletividade quando testada com células normais. Os resultados obtidos poderiam ser agrupados em gráficos e, através de uma regressão linear, seria possível encontrar um valor estimado para o IC_{50} , mas tal valor seria simplesmente uma suposição.

4.3. TESTES DE MUTAGENICIDADE (AMES)

As Tabelas 8, 9 e 10 indicam a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) dos diferentes tratamentos com os complexos metálicos Pt-5-FU, Pt-ftalato e Pt-mesaconato, respectivamente, nas linhagens de *S. typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica.

De acordo com os resultados obtidos, o complexo Pt-5-FU se mostrou altamente mutagênico, pois induziu um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes comparado ao controle negativo, em todas as linhagens utilizadas, sendo possível observar que nas maiores concentrações, os índices de mutagenicidade alcançaram valores até 6,0. A mutagenicidade só não foi evidenciada na linhagem TA97a nos experimentos com ativação metabólica.

Resultados semelhantes foram observados após o tratamento com o complexo Pt-ftalato, que também se mostrou mutagênico em todas as linhagens, tanto nos experimentos com S9 quanto sem S9 (Tabela 9), sendo que na linhagem TA100 sem ativação metabólica (-S9), os índices de mutagenicidade na maior concentração avaliada (300 µg/placa) também ultrapassaram 6.

Já o complexo Pt-mesaconato foi o único complexo que não se mostrou mutagênico nas condições testadas, pois não induziu um aumento considerável no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo, tanto nos experimentos quanto na ativação metabólica. Dessa maneira, todos os índices de mutagenicidade obtidos foram menores que 2,0 em todas as concentrações e linhagens utilizadas, sendo que o maior valor encontrado foi de 1,5 nas concentrações de 75 e 100 µg/placa na linhagem TA97a (Tabela 10).

Tabela 8. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* tratadas com o complexo metálico Pt-5FU, em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Pt-5Fu Tratamentos	Número de colônias revertentes(M ± DP)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0.0 ^a	16 ± 3	23 ± 6	116 ± 4	86 ± 12	235 ± 18	333 ± 29	160 ± 25	214 ± 13
3,12	58 ± 6 ^{**} (3,6)	53 ± 4 ^{**} (2,3)	344 ± 54 ^{**} (3,0)	194 ± 22 ^{**} (2,3)	475 ± 31 ^{**} (2,0)	442 ± 40 (1,3)	232 ± 30 [*] (1,5)	239 ± 21 (1,1)
6,25	77 ± 7 ^{**} (4,8)	58 ± 4 ^{**} (2,6)	554 ± 46 ^{**} (4,8)	276 ± 20 ^{**} (3,2)	548 ± 27 ^{**} (2,3)	507 ± 25 [*] (1,5)	320 ± 24 ^{**} (2,0)	284 ± 30 (1,3)
12,5	96 ± 11 ^{**} (6,0)	73 ± 19 ^{**} (3,2)	511 ± 30 ^{**} (4,4)	386 ± 36 ^{**} (4,5)	633 ± 31 ^{**} (2,7)	783 ± 21 ^{**} (2,4)	318 ± 22 ^{**} (2,0)	261 ± 12 (1,2)
18,75	96 ± 5 ^{**} (6,0)	131 ± 14 ^{**} (5,8)	311 ± 47 ^{**} (2,7)	417 ± 18 ^{**} (4,9)	925 ± 44 ^{**} (3,9)	1110 ± 45 ^{**} (3,3)	281 ± 11 [*] (1,8)	228 ± 42 (1,1)
25	100 ± 12 ^{**} (6,2)	69 ± 8 ^{**} (3,0)	286 ± 16 ^{**} (2,5)	518 ± 23 ^{**} (6,0)	1011 ± 39 ^{**} (4,3)	1374 ± 35 ^{**} (4,1)	267 ± 30 [*] (1,7)	265 ± 15 (1,2)
C+	524 ± 33 ^b	1633 ± 110 ^e	1157 ± 62 ^c	1194 ± 83 ^e	1634 ± 92 ^d	2288 ± 118 ^e	1802 ± 78 ^b	1032 ± 94 ^e

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA); M±DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle Negativo: tampão fosfato (pH 7,4) (100 µL/placa); Controle Positivo (C+): ^b4-nitro-o-fenilenodiamino (10,0 µg/placa – TA97a e TA98); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomomicina C (0,5 µg/placa – TA102) em ausência de S9, e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) na presença de S9 para todas as linhagens.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM – valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* tratadas com o complexo metálico Pt-mesaconato, em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Pt-mesaconato		Número de colônias revertentes(M ± DP)/ placa e IM							
Tratamentos	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a		
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	
0.0^a	22 ± 2	28 ± 3	116 ± 4	86 ± 12	235 ± 18	333 ± 29	160 ± 25	214 ± 12	
12,5	23 ± 3 (1,0)	29 ± 2 (1,0)	110 ± 10 (1,0)	74 ± 9 (0,9)	275 ± 21 (1,2)	342 ± 28 (1,0)	183 ± 17 (1,1)	229 ± 25 (1,1)	
25	26 ± 1 (1,2)	30 ± 4 (1,1)	116 ± 14 (1,0)	87 ± 9 (1,0)	230 ± 11 (1,0)	325 ± 27 (1,0)	176 ± 20 (1,1)	230 ± 25 (1,1)	
50	23 ± 8 (1,0)	31 ± 5 (1,1)	123 ± 13 (1,1)	96 ± 15 (1,1)	229 ± 20 (1,0)	375 ± 16 (1,1)	216 ± 13 (1,4)	232 ± 11 (1,1)	
75	27 ± 5 (1,2)	29 ± 1 (1,0)	137 ± 25 (1,2)	91 ± 12 (1,1)	251 ± 17 (1,1)	366 ± 25 (1,1)	242 ± 15* (1,5)	237 ± 12 (1,1)	
100	24 ± 3 (1,1)	30 ± 4 (1,1)	165 ± 12 (1,4)	85 ± 11 (1,0)	298 ± 14 (1,3)	363 ± 17 (1,1)	243 ± 16* (1,5)	239 ± 18 (1,1)	
C+	406 ± 68	1115 ± 56	1157 ± 62	1194 ± 83	1634 ± 92	2288 ± 118	1802 ± 78	1032 ± 94	

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA); M±DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle Negativo: tampão fosfato (pH 7,4) (100 µL/placa); Controle Positivo (C+); ^b4-nitro-o-fenilenodiamino (10,0 µg/placa – TA97a e TA98); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomicina C (0,5 µg/placa – TA102) em ausência de S9, e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) na presença de S9 para todas as linhagens.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM – valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* tratadas com o complexo metálico Pt-ftalato em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Pt-ftalato Tratamentos	Número de colônias revertentes(M ± DP)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µg/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0.0 ^a	22 ± 2	23 ± 6	116 ± 4	86 ± 12	235 ± 18	333 ± 29	160 ± 25	214 ± 12
37,5	26 ± 5 (1,2)	34 ± 2 (1,5)	285 ± 42** (2,5)	130 ± 20* (1,5)	379 ± 19* (1,6)	442 ± 33 (1,3)	213 ± 14 (1,3)	266 ± 22 (1,2)
75	43 ± 7* (1,9)	46 ± 2** (2,0)	416 ± 39** (3,6)	159 ± 21* (1,9)	426 ± 29* (1,8)	615 ± 46* (1,8)	228 ± 11 (1,4)	276 ± 28 (1,3)
150	82 ± 2** (3,7)	59 ± 9** (2,6)	597 ± 47** (5,2)	243 ± 28** (2,8)	456 ± 35* (1,9)	666 ± 39** (2,0)	233 ± 27* (1,5)	353 ± 39* (1,6)
225	105 ± 1** (4,7)	69 ± 19** (3,1)	728 ± 24** (6,3)	244 ± 20** (2,8)	977 ± 51** (4,2)	935 ± 55** (2,8)	295 ± 21* (1,8)	383 ± 28* (1,8)
300	123 ± 7** (5,5)	73 ± 11** (3,2)	758 ± 43** (6,5)	248 ± 16** (2,9)	1090 ± 33** (4,6)	1085 ± 45** (3,3)	337 ± 39** (2,1)	420 ± 11** (2,0)
C+	406 ± 68	1633 ± 110	1157 ± 62	1194 ± 83	1634 ± 92	2288 ± 118	1802 ± 78	1032 ± 94

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA); M±DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle Negativo: tampão fosfato (pH 7,4) (100 µL/placa); Controle Positivo (C+): ^b4-nitro-o-fenilenodiamino (10,0 µg/placa – TA97a e TA98); ^cAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dMitomomicina C (0,5 µg/placa – TA102) em ausência de S9, e ^e2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) na presença de S9 para todas as linhagens.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5. CONCLUSÕES

Foram obtidos compostos de platina e vanádio com ácidos mono- e dicarboxílicos e aminoácidos. Foram utilizados os seguintes ligantes: ácido glutâmico, ácido ftálico, ácido mesacônico, ácido orótico e 5-fluorouracil. Tais compostos foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas, termogravimétricas, análise elementar e difratometria de raio-X. Os compostos tiveram sua atividade antitumoral *in vitro* testada e apresentaram algum grau de atividade antitumoral. No caso dos complexos de vanádio com ácido glutâmico e ácido orótico, os resultados são promissores, pois indicam um considerável grau de seletividade. Os complexos de platina, apesar de serem comprovadamente mutagênicos pelos resultados obtidos no teste de Ames, não tiveram, com exceção do composto Pt-5-FU, atividade antitumoral considerável. Os compostos foram testados em linhagens celulares de câncer de boca, de hipofaringe, de laringe, de mama, de fígado e colorretal.

Os complexos de vanádio com ácido glutâmico e ácido orótico apresentaram índices de seletividade variando entre, aproximadamente, 1,5 e 9; com IC_{50} indo de 7,9 a 44,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. VOSO_4 apresenta um IC_{50} muito menor em células normais de, no mínimo, 1,5 vezes maior para as linhagens tumorais.

O teste de Ames mostrou a capacidade dos complexos Pt-5-FU e Pt-ftalato de induzir mutações gênicas que podem induzir à uma ação antitumoral *in vitro*. Tal ação só foi verificada no complexo Pt-5-FU em testes feitos com linhagens de células de cânceres da região bucal, hipofaringe e de laringe. Não foi possível identificar as causas da ação mutagênica sem a atividade antitumoral e estudos posteriores deverão elucidar tais fatos.

Devido a esses bons resultados com os complexos de vanádio, três novos complexos de ácido orótico na forma aniônica com vanádio (VI), molibdênio (VI) e tungstênio (VI) foram obtidos e parcialmente caracterizados. Com base nas análises elementares e termogravimétricas, os complexos foram formulados como $\text{VO}_2(\text{oro})$, $\text{KMoO}_2(\text{oro})$ e $\text{WO}_2(\text{oro})_2$.

6. REFERÊNCIAS

BANCROFT, D. P.; LEPRE, C. A.; LIPPARD, S. J. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 112, n. 19, p. 6860-6871, 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00175a020>.

BERGAMASCHI, G.; ROSTI, V.; DANOVA, M.; PONCHIO, L.; LUCOTTI, C.; CAZZOLA, M. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. **Leukemia**, v. 7, n. 12, p. 2012-2018, 1993.

BRASIL. Comissão Nacional de Energia Nuclear, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (CNEN). Relatório de Gestão do exercício de 2017. Disponível em: http://www.cnem.gov.br/images/cnen/documentos/aceso_a_informacao/Rel-gestao-2017.pdf.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155674>.

CAVICCHIOLI, M.; PAYOLLA, F. B.; MASSABNI, A. C. Síntese de novos complexos de platina(II) de interesse biológico. Um novo complexo dinuclear de platina(II) com 5-fluorouracil. **Eclet. Química**, v. 40, n. 1, p. 180-185, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v40.1.2015.p180-185>.

CHERRY, S. R.; SORENSON, J. A.; PHELPS, M. E. Physics in Nuclear Medicine. Elsevier Inc. ISBN 978-1-4160-5198-5 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/radiopharmaceuticals>.

CINI, R.; TAMASI, G.; DEFAZIO, S.; CORSINI, M.; ZANELLO, P.; MESSORI, L.; MARCON, G.; PICCIOLI, F.; ORIOLI, P. Study of ruthenium (II) complexes with anticancer drugs as ligands. Design of metal-based phototherapeutic agents. **Inorg. Chem.**, v. 42, n. 24, p. 8038-8052, 2003. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic0349095>.

CUIN, A.; MASSABNI, A. C.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; NEVES, A.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, M. S.; BORTOLUZZI, A. J. Synthesis, X-ray structure and antimycobacterial activity of silver complexes with α -hydroxycarboxylic acids. **J. Inorg. Biochem.**, v. 101, n. 2, p. 291-296, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.10.001>.

DHAMELIN COURT, P.; RAMIREZ, F. J. Polarized micro-Raman and Fourier transform infrared spectra of L-glutamic acid. **Journal of Raman spectroscopy**, v. 22, n. 10, p. 577-582, 1991.

DJORDJEVIC, C.; VULETIC, N.; RENSLO, M. L.; PURYEAR, B. C.; ALIMARD, R. Peroxo heteroligand vanadates(V): Synthesis, spectra-structure relationships, and stability toward decomposition. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 153, n. 1-2, pp. 25-29, 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01075915>.

DJORDJEVIC, C.; VULETIC, N.; RENSLO, M. L.; PURYEAR, B. C.; ALIMARD, R. Peroxo heteroligand vanadates(V): Synthesis, spectra-structure relationships, and stability toward decomposition. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 153, n. 1-2, p. 25-29, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01075915>.

DJORDJEVIC, C.; WAMPLER, G. L. Antitumor activity and toxicity of peroxo heteroligand vanadates(V) in relation to biochemistry of vanadium. **J. Inorg. Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 51-55, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(85\)83007-5](https://doi.org/10.1016/0162-0134(85)83007-5).

EBRAHIMPOUR, S. Y.; SHEIKHSHOAI, I.; KAUTZ, A. C.; AMERI, M.; PASBAN-ALIABADI, H.; RUDBARI, H. A.; BRUNO, G.; JANIYAK, G. Mono- and dioxido-vanadium(V) complexes of a tridentate ONO Schiff base ligand: Synthesis, spectral characterization, X-ray crystal structure, and anticancer activity. **Polyhedron**, v. 93, p. 99-105. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.03.037>.

ENGLISH, L. H.; MACARA, I. G.; CANTLEY, L. C. Vanadium stimulates the (Na⁺,K⁺) pump in friend Erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. **J. Cell Biol.**, v. 97, n. 4, p. 1299-1302, 1983. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2112600/>.

ETCHEVERRY, S. B.; BARRIO, D. A. Vanadium and bone: relevance of vanadium compounds in bone cells. *in* Vanadium: The versatile metal, 1st ed., KUSTIN, K.; PESSOA, J. C.; CRANS, D. C. (Eds.). Ed. Nova York: Oxford University Press, 2007, p. 204-216.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 42, n. 3, p. 249-265, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050018>.

GELF'MAN, M. I.; KUSTOVA, N. A. Complexes of Pt(II) with 5-fluorouracil. **Russ. J. Inorg. Chem.**, v. 15, n. 11, p. 1602-1604, 1969.

GORLICK, R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 4, p. 683-691, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205169>.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Operational guidance on hospital radiopharmacy : a safe and effective approach. — Vienna : International Atomic Energy Agency, 2008. ISBN 978-92-0-106708-1. Disponível em: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1342/Pub1342_web.pdf.

JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalt. Trans.**, n. 2, pp. 183-194, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B712656P>.

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. **Chem. Rev.**, v. 116, n. 5, p. 3436-3486, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865551>.

KIOSEOGLU, E.; PETANIDIS, S.; GABRIEL, C.; SALIFOGLOU, A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. **Coord.**

Chem. Rev., v. 301-302, p. 87-105, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2015.03.010>.

KÖSE, D. A.; B. ZÜMREOĞLU-KARAN, O. ŞAHİN, O. BÜYÜKGÜNGÖR. **Journal of Molecular Structure**, v. 789, n. 1-3, p. 147-151, 2006.

KOSTOVA, I.; V. ATANASOVA, L. TODOROV, M. KONDEVA-BURDINA, V. TZANKOVA. **Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.15761/FDCCR.1000109>.

KREJSA, C. M.; NADLER, S. G.; ESSELSTYN, J. M.; KAVANAGH, T. J.; LEDBETTER, J. A.; SCHIEVEN, G. L. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 17, p. 11541-11549, 1997. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/272/17/11541.full.pdf>.

LEÓN, I. E.; BUTENKO, N.; DI VIRGILIO, A. L.; MUGLIA, C. I.; BARAN, E. J.; CAVACO, I.; ETCHEVERRY, S. B. Vanadium and cancer treatment: Antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. **J. Inorg. Biochem.**, v. 134, p. 106-117, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.009>.

LEÓN, I. E.; PORRO, V.; DI VIRGILIO, A. L.; NASO, L. G.; WILLIAMS, P. A.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; ETCHEVERRY, S. B. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 19, n. 1, p. 59-74, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24233155>.

LIU, W.; CHEN, X.; YE, Q.; HOU, S.; LOU, L.; XIE, C. 3-hydroxycarboplatin, a simple carboplatin derivative endowed with an improved toxicological profile, **Platin. Met. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 248-256, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1595/147106712X654204>.

MAISTRALIS, G.; KOUTSODIMOU, A.; KATSAROS, N. Transition metal orotic acid complexes. **Transit. Met. Chem.**, v. 25, n. 2, p. 166-173, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1007090708084>.

MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coord. Chem. Rev.**, v. 284, pp. 329-350, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854514002070>.

MEHROTRA, R. C.; R. BOHRA. Metal carboxylates. Academic Press Inc. London. 1983.

NAGLAH, A. M., M. A. AL-OMAR, A. A. ALMEHIZIA, M. A. BHAT, W. M. AFIFI, A. S. AL-WASIDI, J. Y. AL-HUMAIDI, M. S. REFAT. **BioMed Research International**, 2018, Article ID 8108713. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/8108713>.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. (Eds.). Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? Lausanne: Frontiers Media. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-482-2>. ISBN 978-2-88945-482-2.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I.; LEITE, S. R.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 10, p. 5099-5107, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875763>.

PAVAN, F. R.; VON POELHSITZ, G.; NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 2, p. 598-601, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.049>.

PEARSON, J. F.; SLIFKIN, M. A. The infrared spectra of amino acids and dipeptides. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 28, n. 12, p. 2403-2417, 1972.

PENG, H.; LIU, Z.; TAO, C. Adsorption kinetics and isotherm of vanadium with melamine. **Water Sci. Technol.**, v. 75, n. 10, p. 2316-2321, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28541939>.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coord. Chem. Rev.**, v. 301-302, p. 24-48, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001085451400335X>.

REHDER, D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. **Future Med. Chem.**, v. 4, n. 14, p. 1823-1837, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043479>.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coord. Chem. Rev.**, v. 251, n. 13-14 p. 1633-1648, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.017>.

ROSENBERG, B. Platinum complexes for the treatment of cancer. **Interdiscip. Sci. Rev.**, v. 3, n. 2, p. 134-147, 1978. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/030801878791926119>.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/205698a0>.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5782119>.

SINHA, A.; BANERJEE, K.; BANERJEE, A.; DAS, S.; CHOUDHURI, S. K. Synthesis, characterization and biological evaluation of a novel vanadium complex as a possible anticancer agent. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 773, p. 34-41, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022328X14004161>

THOMPSON, K. H. ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalt. Trans.**, n. 6, p. 761-764, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437168>.

THOMPSON, K. H.; LICHTER, J.; LEBEL, C.; SCAIFE, M. C.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 4, p. 554-558, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162329>.

WELLS, R.G. Instrumentation in molecular imaging. **J. Nucl. Cardiol.**, v. 23, n. 6, p. 1343-1347, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12350-016-0498-z>.

WILLSKY, G. R.; CHI, L.-H.; GODZALA, M.; KOSTYNIK, P. J.; SMEE, J. J.; TRUJILLO, A. M.; ALFANO, J. A.; DING, W.; HU, Z.; CRANS, D. C. Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 255, n. 19-20, p. 2258-2269, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461829/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diagnostic imaging. Nuclear Medicine. Disponível em: https://www.who.int/diagnostic_imaging/imaging_modalities/dim_nuclearmed/en/.

WORLD NUCLEAR ASSOCIATION (WNA). Radionuclides in medicine. (Updated November 2018). Disponível em: <http://www.world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radionuclides-research/radionuclides-in-medicine.aspx>.