

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAHOANA POSTAL

SÍNTESE, ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLIOXOVANADATOS PSEUDOESFÉRICOS

CURITIBA – PR

MARÇO / 2021

KAHOANA POSTAL

SÍNTESE, ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE POLIOXOVANADATOS PSEUDOESFÉRICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Gioppo Nunes
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jaísa Fernandes Soares
Supervisora no exterior: Prof^a. Dr^a. Debbie Catharina Crans

CURITIBA – PR

MARÇO / 2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P857s Postal , Kahoana
Síntese, estudos de especiação em solução e avaliação da atividade biológica de polioxovanadatos pseudoesféricos [recurso eletrônico] / Kahoana Postal – Curitiba, 2021.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.

Orientadora: Profa . Dra . Giovana Gioppo Nunes
Coorientadora: Profa . Dra . Jaisa Fernandes Soares
Supervisora no exterior: Profa . Dra . Debbie Catharina Crans

1. Vanádio 2. Espectroscopias. 3. Química farmacêutica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nunes, Giovana Gioppo . III. Soares, Jaisa Fernandes. IV. Crans, Debbie Catharina. V. Título.

CDD: 546.522

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de KAHONA POSTAL intitulada: **SÍNTESE, ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO EM SOLUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLIOXOVANÁDATOS PSEUDOSFÉRICOS**, sob orientação da Profa. Dra. GIOVANA GIOPPO NUNES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2021.

GIOVANA GIOPPO NUNES
Presidente da Banca Examinadora

SHIRLEY NAKAGAKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CHRISTIANE FERNANDES HORN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

RONNY ROCHA RIBEIRO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Dedico este trabalho aos meus pais, as minhas irmãs e ao Ricardo.

Com amor, Kahoana.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Cleide e Ademir, às minhas irmãs, Jéssica e Mayara, e aos meus sobrinhos Kurt e Sophie por todo apoio, amor incondicional, compreensão e carinho.

Ao Ricardo Augusto Ferreira Neneve por todo seu amor, carinho, apoio, amizade, compreensão em todos os momentos e por sempre acreditar em mim.

À Profa. Dra. Giovana Gioppo Nunes pela orientação, dedicação e confiança. Agradeço também pela paciência, ensinamentos e conselhos para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Jaísa Fernandes Soares, pelos conselhos, ensinamentos e auxílio na elaboração da minha dissertação e tese.

À minha supervisora no exterior, Profa. Dra. Debbie C. Crans, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, oportunidade, supervisão e auxílio durante meu doutorado-sanduíche na Colorado State University, Estados Unidos.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (DBQ/UFPR) pela disponibilização de espaço e condições para a elaboração dos ensaios biológicos e seu auxílio nas discussões de resultados.

Aos professores doutores Glaucio Valdameri (CF-UFPR) e Daniela Florêncio Maluf (CF-UFPR) pelo treinamento na realização dos ensaios biológicos.

Aos doutores David L. Hughes (Universidade de East Anglia, Inglaterra) e André Luis Rüdiger e mestra Francielli Santana pelas análises de difratometria de raios X de monocristal.

Ao Prof. Dr. Ronny Rocha Ribeiro pelo treinamento no equipamento de RPE e realização das simulações dos espectros.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison e ao Dr. André Luis Rüdiger pelo auxílio nas análises de RMN de ^{51}V .

À Ma. Rubia C. R. Bottini pelas dosagens de vanádio realizadas no LAMAQ (Laboratório Multiusuários de Análise Química) localizado na UTFPR.

Ao técnico Luis Gustavo de Matos dos Santos pelos espectros Raman realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

Aos professores Prof. Dr. Dean Crick e Dra. Deborah A. Roess do departamento de Bioquímica da CSU pelos ensaios biológicos com as células CHO e com as micobactérias.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá pela colaboração e apoio sempre que preciso.

Ao Ms. Zeyad Arhouma, Dra. Duaa Althumairy, Kateryna Kostenkova (CSU) e a Dra. Lidiane Lima (UFRPE) pela colaboração nesse trabalho e auxílio nos ensaios biológicos realizados durante meu doutorado-sanduíche.

Ao Prof. Dr. Fábio Souza Nunes pelas sugestões na correção dos meus relatórios anuais.

Aos professores doutores Ronny Rocha Ribeiro (PPGQ-UFPR), Shirley Nakagaki (PPGQ-UFPR) e Glaucio Valdameri (CF-UFPR) pelas sugestões durante o meu exame de qualificação;

Aos professores doutores Christiane Fernandes Horn (PPGQ-UFSC), Ana Maria da Costa Ferreira (IQ-USP), Shirley Nakagaki (PPGQ-UFPR) e Ronny Rocha Ribeiro (PPGQ-UFPR) pelo aceite do convite para participar da banca de avaliação desta tese.

Aos atuais e antigos colegas e amigos do grupo de pesquisa: Juliana Morais Missina, Rúbia Camila Ronqui Bottini, Gabriel Barros Baptistella, José Severiano Carneiro Neto, Francielli Sousa Santana, Luana Carol de Camargo, Sarita Wisbeck, Stephanie Cristina de Oliveira Rosa, Luiza Budel Paes Leme, Guilherme Augusto Barbosa, Siddhartha Om Kumar Giese e Caprici Matzembacher Fernandes pelas sugestões, convívio e amizade; Agradeço especialmente à Juliana, Rúbia, Guilherme e Siddhartha pelo carinho, pelas palavras de conforto e por todos os cafezinhos maravilhosos.

Aos colegas do Cranslab na CSU pela recepção, acolhimento no meu período de doutorado-sanduíche e auxílio neste trabalho: Zeyad Arhouma, Lidiane Lima, Heide Murakami, Cameron Van Cleave, Kateryna Kostenkova, Allison Haase, Kaitlin Doucette, Sam Zhang.

Aos moradores da casa do Marão, Mara, Andressa, Allen, Patrícia, João Pedro, Janaína e Leociley, pela amizade, convívio, risadas e inúmeros desabafos.

Às minhas roommates Patty Roberts e Erika David pelo acolhimento, amizade, apoio e por me fazerem sentir em casa mesmo tão longe de casa.

À Sonia Maria Ferreira Neneve e Luiz Carlos Neneve pelo acolhimento, apoio e carinho.

Ao Marcelino Câmara e à Fernanda G. D. Pinheiro pelo excelente trabalho desenvolvido na coordenação e pela disposição em sempre tentar solucionar os problemas e facilitar o dia a dia dos estudantes.

A todos os técnicos do Departamento de Química da UFPR, responsáveis pela manutenção da infraestrutura utilizada neste trabalho. Em especial ao técnico Ângelo Roberto dos Santos Oliveira pela realização das análises termogravimétricas.

A todos os professores do Departamento de Química, pela contribuição para a minha formação, pelo auxílio e atenção dispensada sempre que necessário;

Aos professores, técnicos e colegas do departamento de Bioquímica-UFPR por todo auxílio nos ensaios biológicos.

Ao apoio e concessão da bolsa de estudos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e CAPES-PrInt.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

À Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura, formação acadêmica e pessoal.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFPR, junto ao colegiado, pelo acolhimento e suporte para realizar este trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Os polioxovanadatos são uma classe de polioxoânions com uma grande versatilidade estrutural e eletrônica. Dentre estes, o decavanadato $[H_xV^{IV}_{10}O_{28}]^{6-x}$ (**V₁₀**) é o ânion mais estudado em suas aplicações biológicas. Neste trabalho, dois membros de valência mista, $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V^{IV}_{12}V^V_6O_{42}] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$ (**V_{18I}**) e $\{[K_6(OH_2)_{12}V^{IV}_{11}V^V_7O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O]_n\}$ (**V_{18P}**), foram sintetizados e caracterizados por difratometria de raios X de monocristal e espectroscopias de IR, Raman, RMN de ^{51}V , RPE e UV/Vis/NIR. A atividade quimioprotetora do **V_{18I}** e **V_{18P}** frente ao agente alquilante dietilsulfato foi avaliada em culturas de *E. coli*. Um aumento de ca. 35% no crescimento da cultura em comparação com as células tratadas apenas com dietilsulfato foi observado após adição de **V_{18I}** (0,10 a 2,5 mmol L⁻¹), enquanto a combinação de dietilsulfato com **V_{18P}** aumentou a citotoxicidade apresentada pelo dietilsulfato sozinho. Estudos de especiação por RMN de ^{51}V e RPE mostraram que o **V_{18I}** é estável em solução, enquanto o **V_{18P}** sofre quebra parcial formando oxometalatos pouco reativos de vanádio(V) e (IV). A correlação desta química com a de outros polioxovanadatos de valência mista, $[H_6V^{IV}_2V^V_{12}O_{38}PO_4]^{5-}$ (**V₁₄**) e $[V^{IV}_8V^V_7O_{36}(Cl)]^{6-}$ (**V₁₅**), sugere uma relação entre estabilidade em solução e desempenho quimioprotetor. Com o **V_{18I}** e o **V₁₅** como os agentes quimioprotetores mais promissores e estáveis estudados pelo nosso grupo até o momento. Em um estudo paralelo, **V₁₄**, **V₁₅** e **V₁₀** foram avaliados em suas atividades antimicrobianas em culturas de *Mycobacterium smegmatis*. O valor de IC₅₀ de 1,9 μmol L⁻¹ para o **V₁₅** é 2 vezes menor que o valor relatado para o **V₁₀** e mostrou que o **V₁₅** é o POV mais potente avaliado até o momento. A melhor performance do **V₁₅** em comparação ao **V₁₄** foi atribuída a maior estabilidade do **V₁₅** no meio de cultura 7H9. Um terceiro sistema utilizou o receptor do hormônio luteinizante (LHR), um receptor acoplado à proteína G (GPCRs), para avaliar o efeito dos oxometalatos **V₁** (H₂VO₄⁻), **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** em sua interação com os lipídios da membrana e/ ou a interface lipídica da membrana celular das células CHO (ovário do hamster chinês) pela primeira vez. As respostas celulares para o **V₁₄** e **V₁₅** foram melhores do que aqueles observados em células tratadas com o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), usado como referência. Estudos de especiação de RMN de ^{51}V e RPE sugeriram que os efeitos na função celular dependem das espécies de vanádio formadas no meio celular ao longo do tempo.

Palavras-chave: polioxovanadato, vanádio, especiação, espectroscopias, atividade biológica, quimioproteção, agregação de LHR, micobactérias

ABSTRACT

Polyoxidovanadates (POVs) are a class of polyoxoanions with a large structural and electronic variety. Among them, the decavanadate $[\text{H}_x\text{V}^{\text{V}}_{10}\text{O}_{28}]^{6-x}$ (**V10**) is the most studied anion under biological conditions. Herein, two mixed-valence cage-like members, $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}^{\text{IV}}_{12}\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{42}]\cdot\text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**V18I**) and $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}^{\text{IV}}_{11}\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (**V18P**), were synthesized and characterized by single-crystal X-ray diffraction analysis and FTIR, Raman, ^{51}V NMR, EPR and UV/Vis/NIR spectroscopies. The chemoprotective activity of **V18I** and **V18P** towards the alkylating agent diethyl sulfate was assessed in *E. coli* cultures. An enhancement of *ca.* 35% in culture growth as compared to cells treated only with diethyl sulfate was observed upon addition of **V18I** (0.10 to 2.5 mmol L⁻¹), while the combination of diethyl sulfate with **V18P** increased the cytotoxicity presented by diethyl sulfate alone. ^{51}V NMR and EPR speciation studies showed that **V18I** is stable in solution, while **V18P** suffers partial breakage to give poor reactive oxidometalates of vanadium(V) and (IV). The correlation of this chemistry with that of other mixed-valence polyoxidovanadates, $[\text{H}_6\text{V}^{\text{IV}}_2\text{V}^{\text{V}}_{12}\text{O}_{38}\text{PO}_4]^{5-}$ (**V14**) and $[\text{V}^{\text{IV}}_8\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{36}(\text{Cl})]^{6-}$ (**V15**), suggests a relationship between stability in solution and chemoprotective performance. With the **V18I** and the **V15** as the most stable and promising chemoprotective agents studied by our group so far. In a parallel study **V14**, **V15** and **V10** were evaluated in their antimicrobial activity to *Mycobacterium smegmatis* cultures. The IC₅₀ value of 1.9 μmol L⁻¹ for **V15** is 2 times lower than the value reported for **V10** and showed that **V15** is the most potent POV evaluated up until now. The better performance of **V15** in comparison to **V14** was assigned to the higher stability of the former in the 7H9 medium. A third system used the luteinizing hormone receptor (LHR), a G protein-coupled receptor (GPCRs), to evaluate for the first time the effect of the oxidometalates **V1** (H_2VO_4^-), **V10**, **V14**, and **V15** on their interaction with the membrane lipids and/or the cell membrane lipid interface of CHO (Chinese Hamster Ovary) cells. Cell responses for **V14** and **V15** were greater than those seen for cells treated with the human chorionic gonadotropin (hCG) hormone, used as reference. ^{51}V NMR and EPR speciation studies suggested that the effects on cell function depend on the vanadium species formed in the cell medium over time.

Keywords: polyoxidovanadate, vanadium, speciation, spectroscopy, biological activity, chemoprotection, LHR aggregation, mycobacteria

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1.	Química dos polioxovanadatos	25
1.1.1.	<i>Química de polioxovanadatos em solução aquosa</i>	<i>31</i>
1.1.2.	<i>O ânion decavanadato e o interesse na expansão da classe</i>	<i>35</i>
1.2.	Polioxovanadatos com potencial aplicação na terapia do câncer	36
1.2.1.	<i>Potencial de polioxovanadatos na quimioproteção de sistemas biológicos</i>	<i>38</i>
1.3.	Polioxovanadatos para o tratamento de patologias causadas por microorganismos	42
1.4.	Polioxovanadatos em sua capacidade de interação com membranas biológicas	46
1.5.	Objetivos gerais e específicos	50
1.5.1.	<i>Objetivos gerais</i>	<i>50</i>
1.5.2.	<i>Objetivos específicos</i>	<i>50</i>
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1.	Descrição da aparelhagem e técnicas experimentais	51
2.1.1.	<i>Análise elementar</i>	<i>51</i>
2.1.2.	<i>Determinação da valência média por titulometria</i>	<i>51</i>
2.1.3.	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	<i>52</i>
2.1.4.	<i>Espectroscopia de espalhamento Raman</i>	<i>52</i>
2.1.5.	<i>Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)</i>	<i>52</i>
2.1.6.	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN de ⁵¹V)</i>	<i>53</i>
2.1.7.	<i>Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível e infravermelho próximo (UV/Vis/NIR)</i>	<i>53</i>
2.1.8.	<i>Difratometria de raios X de monocristal (DRX-monocristal)</i>	<i>54</i>
2.1.9.	<i>Medida de susceptibilidade magnética</i>	<i>54</i>
2.1.10.	<i>Análise termogravimétrica</i>	<i>54</i>
2.1.11.	<i>Determinação da densidade óptica (DO)</i>	<i>55</i>

2.2. Condições experimentais e generalidades	55
2.2.1. Purificação da água	55
2.2.2. Preparo do material para ensaios biológicos.....	55
2.2.3. Estoque da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5 α	56
2.2.4. Estoque <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	56
2.3. REAGENTES E SOLVENTES	56
2.3.1. Meios de cultura	57
2.3.1.1. Preparo do meio sólido de cultura LB	57
2.3.1.2. Preparo do meio de cultura 7H9	58
2.3.1.3. Preparo do meio de cultura DMEM	58
2.3.2. Reativação da cultura bacteriana de <i>E. coli</i> DH5 α a partir de estoque ..	58
2.3.3. Preparo da solução salina	58
2.4. Sínteses	59
2.4.1. Síntese do produto $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{I}]\cdot\text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (V_{18}I) com manitol (Método I)	59
2.4.2. Síntese do produto $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (V_{18}P) com manitol (Método I) 59	
2.4.3. Síntese do produto $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (V_{18}P) com ácido málico (Método II)	60
2.5. Ensaios biológicos	60
2.5.1. Avaliação da toxicidade e atividade quimioprotetora dos POVs frente agente alquilante dietilsulfato em cultura de <i>E. coli</i>	60
2.5.1.1. Análise da toxicidade do agente alquilante para as culturas de <i>E. coli</i>	62
2.5.1.2. Análise da toxicidade dos POVs para as culturas de <i>E. coli</i>	63
2.5.1.3. Análise da atividade quimioprotetora dos POVs	64
2.5.1.4. Avaliação da reação direta entre os POVs e o agente alquilante	64
2.5.2. Avaliação da toxicidade dos POVs no crescimento de culturas <i>M. smegmatis</i>	64
2.5.2.1. Análise do efeito dos POVs na inibição do crescimento celular de <i>M. smegmatis</i>	

2.5.2.2. Preparo do sobrenadante da cultura micobacteriana para os estudos espectroscópicos	65
2.5.2.3. Estudos da especiação dos POVs em solução aquosa, meio de cultura e sobrenadante	65
2.5.3. Avaliação do efeito dos POVs na camada lipídica de células CHO	66
2.5.3.1. Análise da viabilidade celular dos POVs	66
2.5.3.2. Análise do efeito dos compostos na ordem da membrana lipídica	67
2.5.3.3. Análise do efeito dos compostos na agregação do LHR	67
2.5.3.4. Análise do efeito dos compostos nos níveis de cAMP intracelular	68
2.5.3.5. Estudos da especiação dos POVs no meio de cultura celular	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1. Síntese e caracterização dos POVs do tipo $\{V_{18}O_{42}X\}^{n-}$	71
3.1.1. Difratomia de raios X de monocristal	71
3.1.1.1. Caracterização estrutural do $V_{18}P$	73
3.1.1.2. Caracterização estrutural do $V_{18}I$	78
3.1.1.3. Comparação estrutural entre os polioxovanadatos $V_{18}I$ e $V_{18}P$	80
3.1.2. Caracterização por técnicas de espectroscopias vibracionais (IV e Raman)	82
3.1.3. Caracterização por análises termogravimétricas	84
3.1.4. Caracterização da valência mista do $V_{18}P$ e do $V_{18}I$	86
3.1.4.1. Classificação da intervalência entre os centros de vanádio(IV/V) no $V_{18}P$ e $V_{18}I$	89
3.1.4.2. Determinação das espécies químicas em solução aquosa do $V_{18}P$ e $V_{18}I$	91
3.1.4.3. Estabilidade do $V_{18}I$ em solução aquosa com variação do pH	96
3.2. Estudo da atividade quimioprotetora do $V_{18}I$ e $V_{18}P$ frente ao efeito deletério do agente alquilante dietilsulfato usando <i>E. coli</i> como modelo	97
3.2.1. Avaliação da toxicidade dos POVs	98
3.2.2. Efeito do agente alquilante dietilsulfato sobre as culturas de <i>E. coli</i>	100

3.2.3. Avaliação da atividade quimioprotetora dos POVs frente a ação do dietilsulfato	101
3.2.4. Avaliação da reatividade dos POVs com o dietilsulfato em meio LB ...	105
3.2.5. Considerações sobre o sistema.....	114
3.2.5.1. Síntese de polioxovanadatos de valência mista.....	114
3.2.5.2. Papel de polioxovanadatos de valência mista do tipo $\{V_{18}\}$ como agentes quimioprotetores	116
3.3. Estudo da capacidade inibitória de POVs no crescimento de culturas de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	120
3.3.1. Avaliação da inibição do crescimento de <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	123
3.3.2. Estudo da especiação do V_{14} e do V_{15} em solução aquosa no tempo.	125
3.3.3. Especiação dos polioxovanadatos no meio de cultura 7H9.....	129
3.3.4. Especiação dos polioxovanadatos no sobrenadante da cultura de <i>M. smegmatis</i>	133
3.3.5. Considerações sobre o sistema.....	136
3.3.5.1. Papel de polioxovanadatos de valência mista como agentes antimicrobianos em culturas de <i>M. smegmatis</i>	136
3.4. Estudos de citotoxicidade e avaliação do efeito dos POVs na camada lipídica de células CHO.....	139
3.4.1. Estudo de citotoxicidade do V_1 , V_{10} , V_{14} e V_{15} em células CHO	142
3.4.2. Efeito na ordem lipídica na membrana plasmática de células CHO	144
3.4.3. Estudo dos níveis de agregação do LHR em células CHO.....	146
3.4.4. Estudo da estabilidade dos POVs no meio de cultura DMEM	149
3.4.5. Estudo da estabilidade dos POVs em solução aquosa pH 7,4	154
3.4.6. Considerações sobre o sistema.....	156
3.4.6.1. Efeito dos polioxovanadatos na camada lipídica de células CHO.....	156
3.4.6.2. Correlação entre espécies identificadas nos diferentes meios de cultura para V_{10} , V_{15} e V_{14}	159
4. CONCLUSÃO.....	161

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
APÊNDICE 1	182
APÊNDICE 2	188
ANEXO 1	193
ANEXO 2	195

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação poliédrica dos iso- e heteropolioxometalatos mais comuns descritas. Neste tipo de representação o metal ocupa o centro dos poliedros mostrados em verde e o oxigênio ocupa os vértices. Os poliedros laranja indicam o heteroátomo.....26
- Figura 2** Modos de coordenação do vanádio nos estados de oxidação IV+ e V+: (a) tetraedro, (b) pirâmide de base quadrada, (c) bipirâmide trigonal, (d) e (e) octaedro.....27
- Figura 3** Representação de poliedros de POVs completamente oxidados estruturalmente caracterizados com diferentes topologias. O vanádio ocupa o centro dos poliedros mostrados em lilás e o oxigênio ocupa os vértices é representado pelas esferas vermelhas.28
- Figura 4** Representação bola-bastão (esquerda) e poliedro (direita) do ânion decavanadato (V_{10}). Os hidrogênios e contraíons foram omitidos, mas a fórmula do ânion e sua abreviação é listada na figura. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás e oxigênio em vermelho.....29
- Figura 5** Formação de polioxovanadatos na presença de ânions $X = Cl^-$ ou I^- formando o $[V_{15}O_{36}Cl]^{6-}$ e o $[V_{18}O_{42}I]^{8-}$. Os polioxovanadatos são representados em poliedros lilás, os átomos de oxigênio estão em vermelho, cloro em verde-claro e iodo em verde-azulado.....30
- Figura 6** Mapa de potencial eletrostático projetado em uma isosuperfície de densidade ($\rho = 0,003$) para cada estado de oxidação ($V^{IV}:V^V$) de um agregado do tipo $[V_{18}O_{42}X]^{n-}$. A escala, a direita, mostra a faixa de potenciais.....31
- Figura 7** (a) Representação estrutural das espécies mais comuns encontradas em soluções aquosas de decavanadato. (b) Gráfico relacionando a especiação e predominância das espécies de íons vanadato em duas concentrações e diferentes faixas de pH na em meio aquoso com força iônica de 0,15 NaCl. ⁵¹ .33
- Figura 8** Representação de bola-bastão (esquerda) e poliedro (direita) dos ânions fosfotetradecavanadato (V_{14}), cloropentadecavanadato (V_{15}) e iodo-octadecavanadato (V_{18}). Os átomos de hidrogênio e contraíons foram omitidos, mas as fórmulas dos ânions e suas abreviações são dadas na figura. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho, fosfato em rosa, cloreto em verde-claro e iodeto em verde.34
- Figura 9** Representação dos três estágios da carcinogênese: (i) iniciação, momento em que as células sofrem o efeito dos agentes carcinogênicos; (ii) promoção, as células geneticamente alteradas são transformadas em células malignas, de forma lenta

e gradual; e por fim, (iii) progressão, que leva a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas.....	36
Figura 10 Modelo de alquilação do DNA pelo íon metildiazônio. O ataque nucleofílico da guanina (esquerda) gera o DNA alquilado no O6 dessa base (direita).....	38
Figura 11 Representação das bases do DNA, timina, citosina, adenina e guanina, e dos sítios de alquilação indicados pelas setas.	39
Figura 12 Representação dos decavanadatos (a) $(1,4\text{-C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (I), (b) $(1,3\text{-C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (II), com alguns dos contraíons omitidos para maior clareza. O polioxovanadato é apresentado como estrutura de poliedros lilás, com o vanádio ocupando o centro do poliedro, com os átomos de carbono em azul, nitrogênio em roxo e oxigênio em vermelho. (c) Inibição do crescimento de culturas de <i>E. coli</i> mediante tratamento com I, II e NaV_{10} e (d) Experimento de adesão de uma população de <i>G. intestinalis</i> de uma monocamada de células Vero. ¹⁰⁴	44
Figura 13 (a) Representação do monovanadato (V_1), decavanadato (V_{10}) e dos derivados substituídos de decavanadato $[\text{H}_2\text{PtV}_9\text{O}_{28}]^{5-}$ (V_9Pt) e $[\text{V}_9\text{MoO}_{28}]^{5-}$ (V_9Mo), com contraíons omitidos para maior clareza. Os poliedros lilás contêm o vanádio ocupando o centro do poliedro e oxigênios os vértices; os poliedros amarelo e azul contêm o átomo de platina e molibdênio, respectivamente, no centro. (b) Curva de crescimento da cultura celular para <i>M. smegmatis</i> tratada com V_{10} (cinza), V_9Pt (azul) e V_9Mo (laranja) com concentrações variando de 0,0020 a 1,0 mmol L^{-1} . O desvio padrão é apresentado para os experimentos realizados em triplicata.	45
Figura 14 Representação esquemática da interação de metformina- V_{10} com uma micela reversa. Proposta feita por meio de resultados de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho.....	47
Figura 15 (a) Representação dos compostos de vanádio, <i>bis</i> (maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) e <i>bis</i> (etilmaltolato)oxovanádio(IV) (BEOV). (b) Modelo de mecanismo proposto para interação de compostos de vanádio, BMOV, BEOV e sulfato de vanadila.	49
Figura 16 Curva teórica de crescimento de uma cultura bacteriana em meio líquido.	61
Figura 17 Representação ORTEP e esquema de numeração dos átomos da estrutura dos ânions (a) V_{18}P , contendo um fosfato desordenado encapsulado, e (b) V_{18}I , com iodeto encapsulado. Os contraíons e átomos de oxigênio das moléculas de água foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos foram desenhados de forma a compreender 30% da densidade de probabilidade eletrônica em cada átomo.....	72

- Figura 18** (a) Coordenação dos cátions potássio pelos agregados $V_{18}P$; (b) Representação da estrutura do $V_{18}P$ evidenciando os tipos de vanádio pelos planos que passam através dos oito no anel externo e oito átomos no anel interno arranjados em $(1 \times V):(4 \times V):(8 \times V):(4 \times V):(1 \times V)$. (c) Empacotamento das cadeias do polioxoânion $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ ($V_{18}P$), visto no plano ab , no qual os contraíons e moléculas de água de cristalização foram omitidos para maior clareza. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja, potássio em púrpura e os planos em azul.....74
- Figura 19** (a) Representação do ambiente de coordenação do cátion potássio. Em (b) e (c) é apresentada a estrutura 3D do $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ ($V_{18}P$) em poliedros, formada pelos grupos oxo do POV, íons de potássio e moléculas de água visto nos planos ac e bc , respectivamente. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho e potássio em púrpura.76
- Figura 20** Comparação entre as estruturas estendidas de poliedros do (a) polímero tridimensional $Na_6[V_{18}O_{39}(PO_4)]_2 \cdot H_3PO_4 \cdot 31H_2O$ relatado por Yang, W. (2003) e do (b) $V_{18}P$ ($[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$). ¹⁴⁶.....78
- Figura 21** Representação das estruturas dos POVs (a) $V_{18}P$ e (b) $V_{18}I$ em poliedro, como representação topológica do esqueleto de vanádio dos POVs e a planificação do esqueleto de vanádio mostrada abaixo.81
- Figura 22** Espectros de absorção na região do infravermelho registrados para os produtos $V_{18}P$ (linha preta) e $V_{18}I$ (linha vermelha).....82
- Figura 23** Espectros de espalhamento Raman utilizando laser de Ar^+ , 514 nm registrados para os produtos $V_{18}I$ (linha preta) e $V_{18}P$ (linha vermelha).....83
- Figura 24** Análise termogravimétrica (TGA, linha preta) e DTG (linha vermelha) dos produtos (a) $V_{18}P$ e (b) $V_{18}I$ com variação de temperatura na faixa de 20 a 800 °C.....85
- Figura 25** Espectro de RPE registrado a 77 K para o sólido pulverizado de $V_{18}P$ (linha vermelha) e $V_{18}I$ (linha preta).....87
- Figura 26** Espectro de UV/Vis/NIR da solução aquosa dos produtos (a) $V_{18}I$ e (b) $V_{18}P$ em concentração de 1,5 mmol L⁻¹. No anexo, a linha preta representa o espectro experimental, a azul as bandas obtidas por meio da decomposição do espectro e a vermelha o espectro calculado resultante.....90
- Figura 27** Espectros de RMN de ⁵¹V obtidos a temperatura ambiente para os produtos (a) $V_{18}P$, $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O\}_n]$, e (b) $V_{18}I$, $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V_{18}O_{42}I] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$, em solução de água-d₂ e concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “V₁” = H₂VO₄⁻, “V₁’” = HVO₄²⁻, “V₂” = H₂V₂O₇²⁻, “V₂’” = HV₂O₇³⁻, “V₄” = V₄O₁₂⁴⁻ e “V₅” = V₅O₁₅⁵⁻.....93

- Figura 28** Espectros de RPE obtidos a 77 K para os produtos (a) **V₁₈I** e (b) **V₁₈P** em solução aquosa com concentrações na faixa de 0,10 a 10 mmol L⁻¹.94
- Figura 29** Espectros de RMN de ⁵¹V obtidos a temperatura ambiente para o produto **V₁₈I** em solução de água-d₂, concentração de 5,0 mmol L⁻¹ e variação no pH de 0 a 10. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “V₁” = H₂VO₄⁻, “V₁’ ” = HVO₄²⁻, VO₂⁺, “V₂” = H₂V₂O₇²⁻, “V₂’ ” = HV₂O₇³⁻, “V₄” = V₄O₁₂⁴⁻ e “V₅” = V₅O₁₅⁵⁻96
- Figura 30** Curva de toxicidade em suspensões de *E. coli* tratadas com **V₁₈I** (azul), **V₁₈P** (verde) e **V₁₀** (vermelho) em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. Os valores de DO₅₉₅ foram 0,878±0,044 no controle considerados como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0.0001, ns = não significativo quando comparado ao controle.....99
- Figura 31** Avaliação do crescimento celular das suspensões bacterianas tratadas com concentrações crescentes do agente alquilante dietilsulfato com GI₅₀ = 5,8 mmol L⁻¹. O gráfico expressa os valores de densidade óptica em porcentagem do crescimento celular por concentração avaliada. Valores de viabilidade celular de 0,859±0,053 foram ajustados para 100%. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, ** P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0.0001, ns = não significativo quando comparado ao controle.101
- Figura 32** Curva de atividade quimioprotetora utilizando 6,0 mmol L⁻¹ do agente alquilante, dietilsulfato em suspensões de *E. coli* tratadas com **V₁₈I** (azul), **V₁₈P** (verde) e **V₁₀** (vermelho) em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. Os valores de DO₅₉₅ foram 0,878±0,044, 1,068±0,024 e 0,742±0,043 no controle considerados como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0.0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des.102
- Figura 33** Curva de atividade quimioprotetora utilizando 6,0 mmol L⁻¹ do agente alquilante, dietilsulfato em suspensões de *E. coli* tratadas com **V₁₈I** em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. A DO₅₉₅ 0,878±0,044 do controle foi considerado como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio

padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0,0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des. 103

Figura 34 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para o **V₁₈I** em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 mmol L⁻¹ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0. Para comparação, o espectro em água sem adição de dietilsulfato é mostrado. 106

Figura 35 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para o **V₁₈P** em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 mmol L⁻¹ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0. Para comparação, o espectro em água sem adição de dietilsulfato é mostrado. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “V₁” = H₂VO₄⁻, “PV” = HVPO₇³⁻, “V₂” = H₂V₂O₇²⁻ e “V₄” = V₄O₁₂⁴⁻. 107

Figura 36 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para o **V₁₀** em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 mmol L⁻¹ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato, des) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0, com pH variando de 6,0 a 3,0. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “V₁₀” = H₂V₁₀O₂₈ ou H₄V₁₀O₂₈, “V₁’ ” = HVO₄³⁻ e “V₄” = V₄O₁₂⁴⁻. 109

Figura 37 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K na presença de um marcador de MgO/Cr^{III} para (a) [V₁₈O₄₂]⁷⁻ (**V₁₈I**) e (b) [V₁₈O₄₁(PO₄)]⁶⁻ (**V₁₈P**) em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 mmol L⁻¹ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em uma proporção V:dietilsulfato de 1:0, 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0. 110

Figura 38 Gráfico de contribuição das espécies mononuclear (em vermelho) e a polinuclear (em preto) para a magnetização total das soluções do produto **V₁₈I** na presença de concentrações crescentes do dietilsulfato. Amostras: 1 – solução aquosa 5,0 mmol L⁻¹; 2 a 6 são as soluções em meio LB (pH = 6,0), 5,0 mmol L⁻¹, com adições crescentes de dietilsulfato nas proporções V:dietilsulfato 1:0,05, 1:0,1, 1:0,5, 1:1 e 1:5, respectivamente. 112

Figura 39 Gráfico de contribuição das espécies mononuclear (em vermelho) e a polinuclear (em preto) para a magnetização total das soluções do produto **V₁₈P** na presença de concentrações crescentes do dietilsulfato. Amostras: 1 – solução aquosa 5,0 mmol L⁻¹; 2 a 6 são as soluções em meio LB (pH = 6,0), 5,0 mmol L⁻¹, com adições crescentes de dietilsulfato nas proporções V:dietilsulfato 1:0,05, 1:0,1, 1:0,5, 1:1 e 1:5, respectivamente. 112

Figura 40 Representação da estrutura em poliedros dos compostos [H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]⁵⁻ (**V₁₄**) e [V₁₅O₃₆(Cl)]⁶⁻ (**V₁₅**). 122

Figura 41 Curva de crescimento da cultura celular para *M. smegmatis* tratada com K(NH₄)₄[H₆PV₁₄O₄₂].11H₂O (**V₁₄**, azul) e [Me₄N]₆[V₁₅O₃₆Cl] (**V₁₅**, vermelho) com

concentrações variando de 0,00010 a 2,0 mmol L⁻¹. O desvio padrão é apresentado para os experimentos realizados em triplicata. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0.0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des.....123

Figura 42 Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V₁₄ e (b) V₁₅ em solução aquosa de 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas são V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₁₄-oxidado (V^V₁₄, H₄V₁₄O₄₂P⁵⁻) e V₁₀ (HV₁₀O₂₈⁵⁻).125

Figura 43 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K para V₁₄ e V₁₅ em solução aquosa a 1,0 mmol L⁻¹ com variação no tempo de 0, 1, 5 e 24 h.127

Figura 44 Avaliação da coloração de soluções a 1,0 mmol L⁻¹ do V₁₄ e V₁₅ em solução aquosa nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.....128

Figura 45 Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V₁₄ e (b) V₁₅ em meio 7H9 (pH = 6,6) de 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas foram: V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₄ (V₄O₁₂⁴⁻), PV (HVPO₇³⁻), V₁₀ (HV₁₀O₂₈⁵⁻) e complexo vanádio-citrato (Vcit⁻ e V₂cit³⁻).130

Figura 46 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K para V₁₄ e V₁₅ em meio de cultura 7H9 (pH = 6,6) a 1,0 mmol L⁻¹ com variação no tempo de 0, 1, 5 e 24 h.131

Figura 47 Avaliação da coloração de soluções a 1,0 mmol L⁻¹ do V₁₄ e V₁₅ em meio de cultura 7H9 nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.132

Figura 48 Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V₁₄ e (b) V₁₅ em solução de sobrenadante não aquecido de 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas foram: V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₄ (V₄O₁₂⁴⁻), PV (HVPO₇³⁻), V₁₀ (HV₁₀O₂₈⁵⁻) e complexo vanádio-citrato (Vcit⁻ e V₂cit³⁻).134

Figura 49 Avaliação da coloração de soluções a 1,0 mmol L⁻¹ do V₁₄ e V₁₅ no sobrenadante não aquecido do meio de cultura nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.135

Figura 50 Representação dos modelos biológicos avaliados anteriormente na literatura de culturas de *E. coli*, *G. intestinalis* e *M. smegmatis* com POVs em estado de oxidação V+, como o [V₁₀O₂₈]⁶⁻ (V₁₀), [V₉MoO₂₈]⁵⁻ (V₉Mo), [H₂PtV₉O₂₈]⁵⁻ (V₉Pt) e valência mista (IV/V), como o [H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]⁵⁻ (V₁₄) e [V₁₅O₃₆(Cl)]⁶⁻ (V₁₅).....137

Figura 51 Representação da estrutura em poliedros dos compostos avaliados nessa seção: [H₂VO₄]⁻ (V₁), [V₁₀O₂₈]⁶⁻ (V₁₀), [H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]⁵⁻ (V₁₄) e [V₁₅O₃₆(Cl)]⁶⁻ (V₁₅).141

Figura 52 Efeito dos POVs (a) V₁, (b) V₁₀, (c) V₁₄ e (d) V₁₅ na viabilidade celular das células CHO. A linha pontilhada em 50% de viabilidade foi usada para estabelecer o IC₅₀ desses compostos.142

- Figura 53** (a) Gráfico da ordem dos lipídios da membrana em células CHO tratadas com V_1 , V_{10} e V_{15} . O aumento da emissão em 640 nm em relação à emissão em 545 nm é indicativo de uma diminuição na ordem dos lipídios. Em (b) V_1 e (c) V_{15} , os efeitos da lavagem repetida no tempo inicial (em verde) e 6 h (em azul) na fluidez lipídica para as células foram avaliados. Uma segunda (2x) e terceira (3x) lavagem pareceram aumentar a ordem dos lipídios. Valores próximos aos das células não tratadas não foram observados.145
- Figura 54** (a) Gráfico da anisotropia inicial em células expressando quantidades diferentes de LHR tratadas com V_1 , V_{10} , V_{14} e V_{15} . Valores menores de anisotropia inicial são indicativos de agregação do LHR. (b) Níveis intracelulares de cAMP, modulado pelo efeito do número de LHR por célula tratada com V_1 , V_{10} , V_{14} ou V_{15} . Os dados mostrados são a média e desvio padrão de 25 a 43 medições individuais, dependendo do tratamento. hCG = gonadotrofina coriônica humana, empregada como referência de resposta hormonal. Concentração: hCG = 100 nmol L⁻¹, V_1 = 10 μmol L⁻¹, V_{10} = 2,0 μmol L⁻¹, V_{14} = 4,0 μmol L⁻¹, V_{15} = 6,0 μmol L⁻¹.147
- Figura 55** Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V_{14} , (b) V_{15} em um período de 0, 3, 6 e 24/34 h em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) em concentração de 1,0 mmol L⁻¹. As espécies de vanádio(V) observadas nos espectros foram: V_1 (H₂VO₄⁻), V_2 (H₂V₂O₇²⁻), V_4 (V₄O₁₂⁴⁻), V_5 (V₅O₁₅⁵⁻), PV (HVPO₇³⁻) e V_{10} (H₂V₁₀O₂₈⁴⁻).150
- Figura 56** Espectros de RPE em banda-X a 77K para (a) V_{14} , (b) V_{15} em um período de 0, 3 e 24 h em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) em concentração de 1,0 mmol L⁻¹.153
- Figura 57** Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V_1 , (b) V_{10} , (c) V_{14} e (d) V_{15} em um período de 0, 3, 6 e 24/34 h em solução aquosa com pH ajustado para 7,4 em concentração de 1,0 mmol L⁻¹. As espécies de vanádio(V) observadas nos espectros foram: V_1 (H₂VO₄⁻), V_2 (H₂V₂O₇²⁻), V_4 (V₄O₁₂⁴⁻), V_5 (V₅O₁₅⁵⁻), V_{10} (H₂V₁₀O₂₈⁴⁻) e V_{14} (H₄V₁₄O₄₂P⁵⁻).154
- Figura 58** Modelos de modos de ação alternativos dos POVs nas membranas celulares com baixa densidade de receptores. (a) POV interage com as membranas celulares CHO sem ser internalizado; (b) POV impacta a bicamada lipídica, hidrolisa e a espécie gerada é internalizada; ou (c) POV age através de transferência de elétrons.158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de reagentes utilizados em todas as etapas deste trabalho e especificações do fabricante.....	56
Tabela 2	Componentes dos meios de cultura empregados de acordo com o fabricante para 1,0 L de cada meio líquido.....	57
Tabela 3	Dados cristalográficos e de refinamento para os produtos $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ (V_{18P}) e $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V_{18}O_{42}] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$ (V_{18I}).....	72
Tabela 4	Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ (V_{18P}) com os desvios padrões estimados em parênteses.....	75
Tabela 5	Comprimentos de ligação (Å) envolvendo os cátions potássio e átomos de oxigênio do agregado $[V_{18}O_{41}(PO_4)]^{6-}$ (V_{18P}).....	76
Tabela 6	Resultados de análise elementar e dosagem de metal para o produto V_{18P}	78
Tabela 7	Resultados de análise elementar e dosagem de metal para o produto V_{18I}	79
Tabela 8	Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV e espalhamento Raman dos produtos V_{18P} e V_{18I}	82
Tabela 9	Valores para o somatório da valência de ligação e atribuições dos átomos de vanádio no V_{18P} ^{a 151}	87
Tabela 10	Dados de medida magnética descrita para polioxovanadatos do tipo $\{V_{18}O_{42}(PO_4)\}^{x-}$ na literatura	88
Tabela 11	Valores experimentais e teóricos de largura de banda a meia altura ($\Delta v_{1/2}$) para as bandas de intervalência simuladas para os produtos V_{18P} e V_{18I}	91
Tabela 12	Parâmetros de RPE de banda X para as espécies polinuclear e mononuclear detectadas a 77K em meio LB dos produtos V_{18P} e V_{18I}	111
Tabela 13	Composição proposta para a solução aquosa e em meio LB para o V_{18I} , V_{18P} , V₁₄ ⁵² e V₁₅ ⁵³ na concentração de 5,0 mmol L ⁻¹ (*).	114
Tabela 14	Valores de GI ₅₀ para os compostos V₁₄ , V₁₅ , V₁₀ , e V₁ avaliados em sua atividade inibidora em culturas de <i>M. smegmatis</i>	124

Tabela 15 Resumo das espécies de V ^V e V ^{IV} geradas após 24 h nas soluções em concentração de 1,0 mmol L ⁻¹ de V ₁₄ e V ₁₅ nas condições avaliadas neste trabalho.....	137
Tabela 16 Valores calculados de IC ₅₀ em células CHO tratadas com V ₁ , V ₁₀ , V ₁₄ e V ₁₅ ..	143
Tabela 17 Composição proposta para a solução aquosa (pH = 7,4) e em meio DMEM para o V ₁ , V ₁₀ , V ₁₄ e V ₁₅ na concentração de 1,0 mmol L ⁻¹ no tempo de 0h e 24h (*)	155

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** Esquema geral da ação de oxovanadatos na prevenção da alquilação do DNA.41
- Esquema 2** Ilustração do esquema geral do método adotado para realização dos ensaios de avaliação do crescimento de culturas bacterianas.63
- Esquema 3** Representação das espécies de V^V comumente identificadas em solução “ V_1 ” = HVO_4^{2-} , “ V_1 ” = $H_2VO_4^-$, “ V_2 ” = $H_2V_2O_7^{2-}$, “ V_4 ” = $V_4O_{12}^{4-}$, “ V_5 ” = $V_5O_{15}^{5-}$ e “ V_{10} ” = $[V_{10}O_{28}]^{6-}$. No esquema também estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de ^{51}V92
- Esquema 4** Espécies químicas identificadas em solução aquosa do **$V_{18}P$** e **$V_{18}I$** na menor e maior concentração (0,10 e 10 mmol L^{-1}) empregando as técnicas de RMN de ^{51}V e de RPE.95
- Esquema 5** Equilíbrios gerados para o sistema do **$V_{18}P$** em solução aquosa, meio LB e com adição de dietilsulfato nas condições utilizados para a análise espectroscópica das soluções por RMN de ^{51}V e de RPE. Onde POV-VM = polioxovanadato de valência mista; VO(L) = produto formado das espécies de V^{IV} liberadas após a quebra do agregado e potencial interação com os componentes do meio...113
- Esquema 6** Resumo dos principais resultados do nosso grupo de pesquisa obtidos por meio do estudo da toxicidade e efeito quimioprotetor dos polioxovanadatos **V_{15}** , **$V_{18}I$** , **$V_{18}P$** , **V_{14}** e **V_{10}** em culturas de *E. coli* na presença de dietilsulfato.^{52; 53} Os polioxovanadatos foram agrupados de acordo com o efeito biológico observado e sua estabilidade em solução. Os átomos de vanádio são mostrados em roxo, oxigênio em vermelho, fosforo em laranja, iodeto em verde e o cloreto em verde claro.....117
- Esquema 7** Equilíbrios gerados para os sistemas de **V_{14}** e **V_{15}** em solução aquosa determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com flexa indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.....128
- Esquema 8** Equilíbrios gerados para os sistemas de **V_{14}** e **V_{15}** em solução aquosa determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com flexa indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.....132
- Esquema 9** Resumo dos principais resultados publicados e do nosso grupo de pesquisa obtidos por meio do estudo inibição do crescimento de culturas de *M. smegmatis* dos compostos V_1 , V_{10} , **V_{15}** e **V_{14}** .⁵² Aqui também são apresentadas

as espécies observadas por RMN de ^{51}V e RPE, para os POV-VM, no tempo de 0 h em solução aquosa e meio 7H9 para cada composto. Os átomos de vanádio são mostrados em roxo, oxigênio em vermelho, fosforo em laranja e o cloreto em verde claro.138

Esquema 10 Equilíbrios gerados para os sistemas de V_{14} , V_{15} e V_{10} no meio de cultura DMEM determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com flexa indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.152

Esquema 11 Resumo dos principais resultados de especiação no tempo de 0h em solução aquosa e meios de cultura LB, 7H9 e DMEM publicados e obtidos neste trabalho por RMN de ^{51}V e RPE para os POVs V_{10} , V_{14} e V_{15} . Os átomos de vanádio são mostrados em roxo, oxigênio em vermelho, fosforo em laranja e o cloreto em verde claro.160

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

POM	Polioxometalato
POV	Polioxovanadato
POV-VM	Polioxovanadato de valência mista não identificado
Des	Dietilsulfato
DO	Densidade óptica
DRX	Difratometria de raios X
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
TGA	Análise termogravimétrica
LB	Meio líquido Luria-Bertani
DMEM	Meio Dulbecco modificado (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
GI ₅₀	Inibição de crescimento de 50% (do inglês Growth inhibition 50%)
IC ₅₀	Inibição de 50% do crescimento da cultura celular
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CHO	Células de ovário de hamster chinês (do inglês <i>Chinese Hamster Ovary</i>)
Dmf	Dimetilformamida
Dmso	Dimetilsulfóxido
Thf	Tetrahidrofurano
SHELXS	Programa para refinamento de estruturas obtidas por difração de raios X de monocristal
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot (gráfico de elipsóides térmicas)
ROS	<i>Espécies reativas de oxigênio</i> (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOS	<i>Sistema de reparo de danos ao DNA</i>
Ada	Resposta adaptativa induzida (do inglês <i>Anti-drug antibody</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

ν	Estiramento vibracional
δ	Deformação vibracional
τ	Parâmetro tau
ϵ	Absortividade molar
δ	Deslocamento químico

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química dos polioxovanadatos

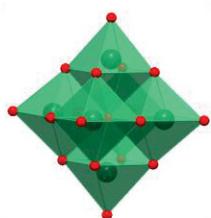
Polioxometalatos (POMs) são uma classe composta por íons poliatômicos carregados negativamente que exibem uma enorme versatilidade composicional, estrutural e eletrônica, bem como uma natureza multifuncional intrínseca, o que torna sua classificação bastante complexa. Os metais que compõem essa classe de compostos estão comumente em estados de oxidação elevado, com configurações eletrônicas d^0 ou d^1 como V^V , V^{IV} , Nb^V , Ta^V , Mo^VI , Mo^V ou W^VI . Esses íons metálicos estão ligados por átomos de oxigênio, comumente via pontes oxo e ocasionalmente por pontes hidroxilo. ^{1; 2}

Existem duas características principais desses metais que os distinguem de outros formadores de polioxoânions, como cromo(VI), silício e fósforo. A primeira é a capacidade do átomo metálico de expandir sua coordenação por pontes oxo de 4 para 5, 6 ou até mesmo 7 no caso de molibdatos e tungstatos. ³ A segunda é a capacidade de se envolver em ligações múltiplas com átomos de oxigênio terminais, uma consequência dos orbitais d vazios e acessíveis do metal. ³ Alguns exemplos de POMs de metal nobre surgiram nos últimos anos, incluindo polioxopaladatos, ^{4; 5} polioxoplatinatos ⁶ e polioxoauratos. ^{7; 8}

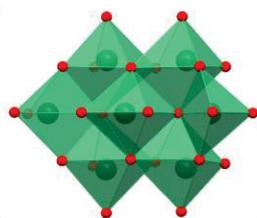
Os POMs descritos na literatura apresentam elevada variedade estrutural com nuclearidade que pode variar de 6 até 368 metais em sua estrutura. Podem formar tanto espécies oligoméricas quanto aglomerados heterometálicos maiores e mais complexos, como macroestruturas (100 – 10000 Å) com tamanhos próximos aos mostrados por algumas proteínas. ^{1; 2} Alguns POM podem ser estáveis em uma ampla faixa de pH, que varia de básico a ácido (pH 1 a 10), enquanto outros são favorecidos apenas em uma faixa estreita de pH (geralmente em meio ácido). ^{9; 10}

Dois grupos principais de POMs podem ser descritos de acordo com a composição estrutural (Figura 1), os isopolioxoânions e os heteropolioxoânions. Os isopolioxoânions possuem fórmula geral $\{M_mO_y\}^{n-}$, contendo apenas um tipo de metal e átomos de oxigênio. ¹¹ A estrutura da maioria dos isopolioxoânions se relaciona com o agregado de origem, um decametalato, pela ausência de algumas subunidades $\{MO_6\}$. ^{3; 9} Essas estruturas são comumente nomeadas pela quantidade de centros metálicos na estrutura como deca- $\{M_{10}O_{28}\}^{n-}$, octa- $\{M_8O_{26}\}^{n-}$, hepta- $\{M_7O_{24}\}^-$ e hexametallato $\{M_6O_{19}\}^{n-}$ mostrados no topo da Figura 1.

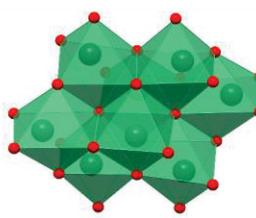
Isopolioxometalato / $[M_m O_y]^{n-}$



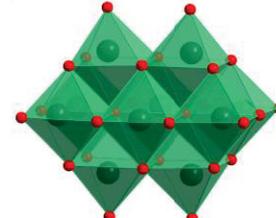
$M_6 O_{18}$
M = W, Mo, V, Ta
Lindqvist



$M_7 O_{24}$
M = W, Mo

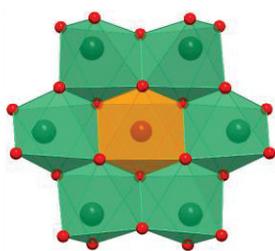


$M_8 O_{26}$
M = Mo

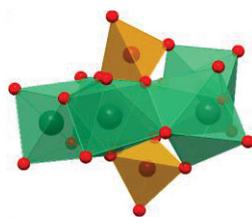


$M_{10} O_{28}$
M = W, Mo, V, Nb

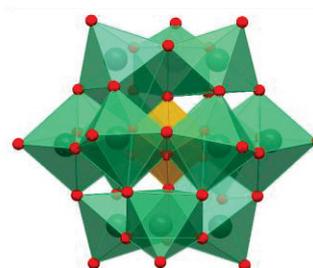
Heteropolioxometalato / $[X_m M_m O_y]^{n-}$



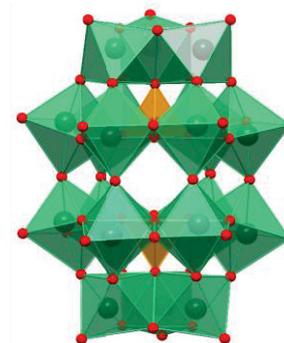
$XM_6 O_{24}$
M = W, Mo, V
X = 1ª série de transição
Anderson-Evans



$X_2 M_5 O_{24}$
M = Mo
X = P
Strandberg



$XM_{12} O_{40}$
M = W, Mo, V
X = P, As, Sb
Keggin



$X_2 M_{18} O_{62}$
M = W, Mo, V
X = P, As, S
Wells-Dawson

Figura 1 Representação poliédrica dos iso- e heteropolioxometalatos mais comuns descritas. Neste tipo de representação o metal ocupa o centro dos poliedros mostrados em verde e o oxigênio ocupa os vértices. Os poliedros laranja indicam o heteroátomo.

Os heteropolioxoânions, $\{XM_m O_y\}^{n-}$, consistem em estruturas formadas por uma combinação de metais e outros heteroátomos (aqui denominados X). A natureza do heteroátomo não é restrita a nenhuma classe de elementos específica. Exemplos típicos incluem ânions do tipo Keggin $[W_{12}O_{36}(XO_4)]^{n-}$ ($n = 3, 4, A = Si, Ge, P$) com um hóspede tetraédrico no centro da estrutura e outros derivados como Wells-Dawson, $[W_{18}O_{54}(AO_4)_2]^{n-}$ ($X = P, As$) e Anderson-Evans, $[M_6O_{20}(XO_4)]$ ($M = Mo, V, W; X =$ metais da primeira série de transição).^{3; 9}

Apesar da vasta diversidade composicional, topológica e estrutural dos polioxometalatos, a maioria destes geralmente exibe algumas propriedades comuns:^{12; 13}

- (i) Os agregados possuem carga, tamanho e simetria elevadas.
- (ii) Os equilíbrios químicos que determinam a formação de uma espécie em detrimento de outra podem ser modificados por diversas variáveis no método de síntese como concentração dos reagentes, pH, força iônica, presença de ligantes, contraíons, temperatura ou pressão.
- (iii) Em geral, as espécies contendo contraíons alcalinos e orgânicos pequenos são solúveis em água, enquanto aquelas contendo aminas orgânicas protonadas ou contraíons volumosos apresentam uma maior solubilidade em solventes orgânicos.
- (iv) Podem ser funcionalizados com ligantes orgânicos ou compostos de coordenação, por meio de ligações com os átomos de oxigênio localizados na superfície do agregado.

Dentre os POMs, os polioxovanadatos (POVs) vêm recebendo destaque, com aplicações englobando os campos de catálise, como na catálise oxidativa de álcoois,¹⁴ na química de materiais,¹⁵ eletrônica,^{16; 17; 18} magnetismo molecular¹⁹ e química medicinal.²⁰ Como característica comum dos POVs, pode-se ressaltar a presença de grupos vanadila terminais (V=O) e oxo em ponte (V–O–V), com centros de vanádio, que combina esferas de coordenação tetraédricas (VO₄), piramidais de base quadrada (VO₅) e octaédricas (VO₆), Figura 2.²¹ Estes podem formar estruturas lineares, cíclicas ou em gaiola e geralmente são identificados pelo número de íons de vanádio presentes em sua estrutura.

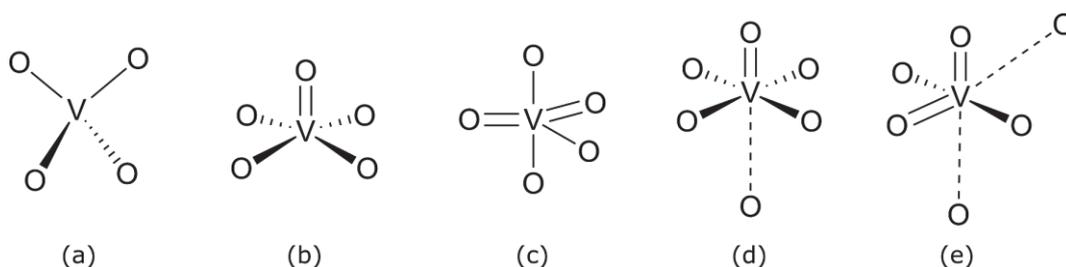


Figura 2 Modos de coordenação do vanádio observados em polioxovanadatos: (a) tetraedro, (b) pirâmide de base quadrada, (c) bipirâmide trigonal, (d) e (e) octaedro.

As estratégias sintéticas empregadas para obtenção de POVs são baseadas na automontagem do composto por meio de protonações consecutivas de vanadatos menores ou de reações de condensação em meio ácido com condições hidrotérmicas, nas quais a reação de eliminação de água leva a uma redução na razão

oxigênio/vanádio.^{9, 21; 22} A combinação de estequiometria e concentração dos reagentes com fatores como a temperatura, tempo de reação e pH do meio permitem a obtenção reprodutível de estruturas que variam desde moléculas discretas até agregados contendo 30 centros metálicos.^{21; 23} A Figura 3 mostra algumas variações possíveis na estrutura de polioxovanadatos nas espécies $[V_4O_{12}]^{4-}$, $[V_5O_{14}]^{3-}$, $[V_{12}O_{32}]^{4-}$ e $[V_{16}O_{42}]^{4-}$.²⁴

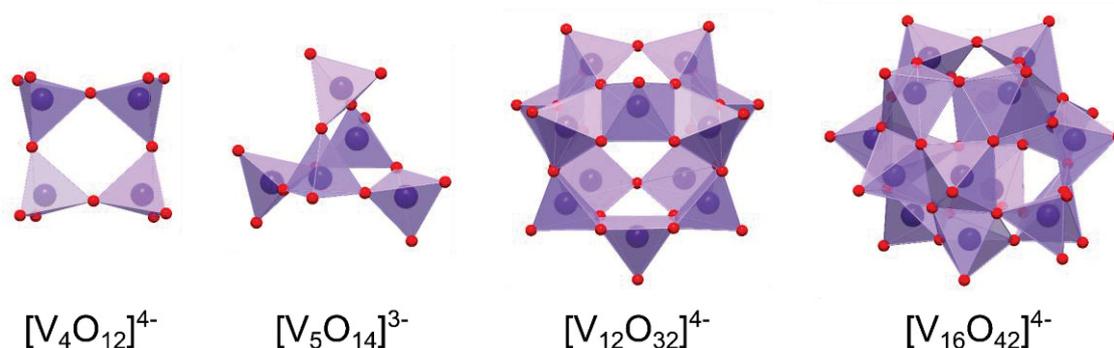
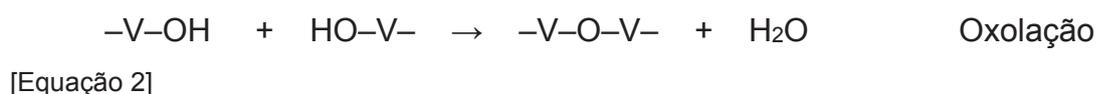
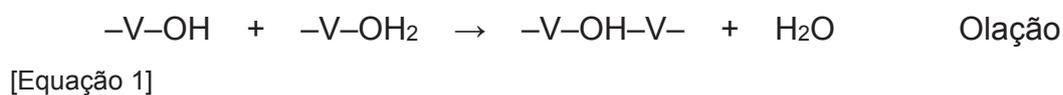


Figura 3 Representação de poliedros de POVs completamente oxidados estruturalmente caracterizados com diferentes topologias. O vanádio ocupa o centro dos poliedros mostrados em lilás e o oxigênio ocupa os vértices é representado pelas esferas vermelhas.

As duas reações principais envolvidas no processo de condensação são olação e oxolação, as quais envolvem adição nucleofílica de grupos OH^- em unidades catiônicas de vanádio (Equações 1 e 2). A formação de POVs, no entanto, ocorre em pH levemente ácido à básico através de reações de oxolação, nas quais há formação de pontes de oxigênio simultânea a liberação de moléculas de água.⁹ A obtenção de vanadatos lamelares ocorre, por vez, a partir de reações de olação com a formação de lacunas na estrutura do óxido metálico²⁵ que podem ser preenchidas com fragmentos do tipo $\{M^{n+}=O\}^{(n-2)+}$ ou grupos orgânicos.



Dentre os POVs, o decavanadato ($[H_xV_{10}O_{28}]^{6-x}$, V_{10} , Figura 4) é o polioxoânion de vanádio(V) mais comumente obtido em meio ácido. Sendo também o mais estável em condições ácidas, pH 3 a 6, com um tempo de meia-vida longo em condições

fisiológicas. ²⁶ Os 10 centros de vanádio(V) do decavanadato apresentam geometria octaédrica distorcida, com pontes oxo do tipo dupla, tripla e sêxtupla, formando um ânion com elevada carga superficial em simetria próxima da D_{2h} .

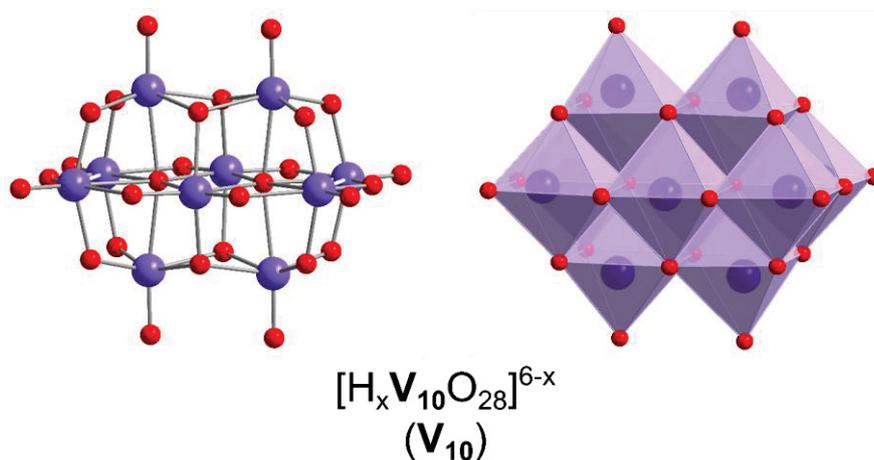


Figura 4 Representação bola-bastão (esquerda) e poliedro (direita) do ânion decavanadato (V_{10}). Os hidrogênios e contraíons foram omitidos, mas a fórmula do ânion e sua abreviação é listada na figura. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás e oxigênio em vermelho.

Os POVs de valência mista (IV/V) são uma subclasse de polioxovanadatos que tem atraído interesse de pesquisadores, comumente com geometria de pirâmide de base quadrada distorcida e uma ampla variedade estrutural. ^{9; 27} A versatilidade estrutural desses compostos é dada pela condensação de subunidades $\{VO_5\}$, podendo apresentar compartilhamento de aresta e, excepcionalmente, de face entre as unidades. Em relação a esses modos de ligação, o compartilhamento de aresta confere flexibilidade ao polioxoânion, enquanto de face resulta em um agregado mais rígido. ²¹

Nos casos em que a condensação de oxovanadatos ocorre em torno de um heteroátomo, um íon, ou até mesmo de uma molécula neutra, há a formação de um POV contendo um hóspede encapsulado em sua estrutura (Figura 5). No processo de formação do POV o hóspede atua como componente direcionador da formação da estrutura pseudoesférica. ^{9; 28} A forma de interação, covalente ou eletrostática, entre a molécula ou ânion encapsulado e os centros de vanádio, assim como o tamanho dessas espécies são determinantes do padrão estrutural e nuclearidade do POV obtido. ²⁹

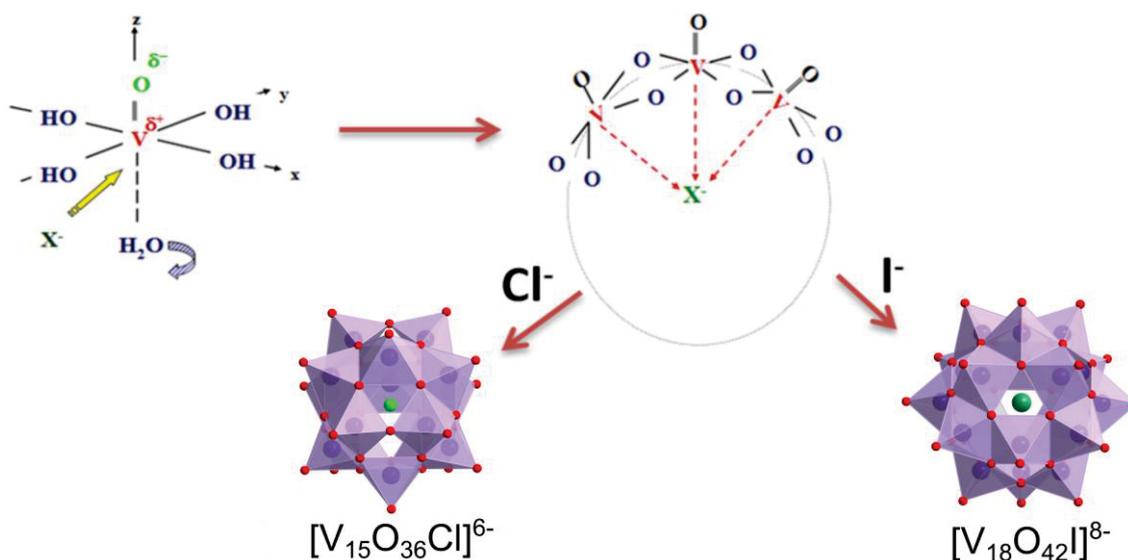


Figura 5 Formação de polioxovanadatos na presença de ânions $X = \text{Cl}^-$ ou I^- formando o $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}]^{6-}$ e o $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{I}]^{8-}$. Os polioxovanadatos são representados em poliedros lilás, os átomos de oxigênio estão em vermelho, cloro em verde-claro e iodo em verde-azulado.

FONTE: Adaptada de Livage (2010) ⁹

A racionalização dos métodos de síntese de agregados contendo um ânion hóspede sugerem que a obtenção destes é favorecida em meio redutor. ³⁰ As interações hóspede-hospedeiro estabilizam a estrutura, com o agregado sendo polarizado de forma que a densidade negativa aponta para fora da estrutura, permitindo que o POV interaja com as espécies catiônicas em solução. ⁹ Os contraíons desempenham um papel secundário na estabilização do agregado, apresentando uma maior influência sobre as propriedades de solubilidade. ^{31; 32}

Estudos de Müller e coautores ²⁹ com diferentes octadecavanadatos ($\{\text{V}_{18}\text{O}_y\text{X}\}$, onde $y = 36-42$ e $X = \text{Cl}^-$, Br^- , I^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , VO_4^{3-} , NO_2^- , NO_3^- , SH^- , HCOO^- , CO_3^{2-} e H_2O) revelaram que esses agregados de elevada nuclearidade são bastante robustos. A obtenção destes compostos sugere uma ampla capacidade de variação nos contraíons e na proporção de $\text{V}^{\text{IV}}:\text{V}^{\text{V}}$ nas estruturas, de 18:0 até 10:8, sem que haja quebra do agregado.

Cálculos de teoria do funcional da densidade (DFT) realizados para avaliar as propriedades estruturais de octadecavanadatos, mostraram que quando em solução os elétrons no agregado tendem a se distribuir uniformemente sobre todos os átomos de vanádio da estrutura. ³³ De forma que, as diferentes cargas relativas à valência mista do composto não se encontrem localizadas em centros de vanádio específicos. Os mapas de potencial eletrostático projetados para diferentes proporções de $\text{V}^{\text{IV}}:\text{V}^{\text{V}}$ na estrutura

do $\{V_{18}O_{42}\}$ (Figura 6) mostram ainda que quanto mais reduzido o POV, maior a nucleofilicidade da superfície.

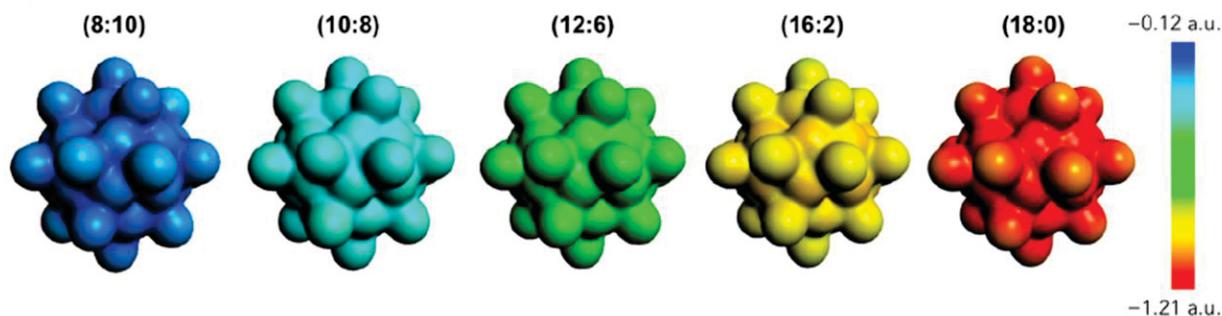


Figura 6 Mapa de potencial eletrostático projetado em uma isosuperfície de densidade ($\rho = 0,003$) para cada estado de oxidação ($V^{IV}:V^V$) de um agregado do tipo $[V_{18}O_{42}X]^{n-}$. A escala, a direita, mostra a faixa de potenciais.

Fonte: adaptada de Solé-Daura (2019).³³

O estudo do potencial eletrostático calculado no centro da cavidade sugere valores constantes e intermediários, passando para potenciais menos negativos ao se aproximar as paredes internas do agregado.³³ Com isso, assume-se que a superfície do POV reflete mais fortemente as variações da carga molecular geradas pelos centros de vanádio e pela variação dos seus estados de oxidação. No entanto, a relação entre a deslocalização e população de elétrons não é simples e ainda são poucos os estudos estruturais sistemáticos com POVs de valência mista.

1.1.1. Química de polioxovanadatos em solução aquosa

A identificação dos padrões de especiação de soluções de compostos de vanádio é vital para o sucesso da aplicação e investigação desses sistemas. A especiação observada nessas soluções é bastante complexa, devido ao estabelecimento de múltiplos equilíbrios entre diferentes espécies de vanádio(IV) e (V) tanto em condições biológicas quanto sintéticas.^{34; 35} Com o aumento do número de compostos de vanádio avaliados em sua potencial atividade antitumoral,³⁶ antiviral,³⁷ anti-HIV,³⁸ antiparasitária³⁹ e antibacteriana⁴⁰ esses ensaios se tornam essenciais.

A fim de obter uma representação clara das espécies presentes em soluções de compostos de vanádio, diferentes técnicas podem ser utilizadas considerando o estado de oxidação do metal. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de vanádio

(RMN de ^{51}V) é particularmente adequada para o estudo de sistemas contendo vanádio(V), ^{41; 42} com os deslocamentos químicos de iso- e heteropolioxovanadatos caindo na faixa de -400 a -600 ppm. Além disso, mesmo variações estruturais relativamente pequenas resultam em picos separáveis, devido a ampla faixa de deslocamentos químicos dos compostos. ¹⁰

A química da solução aquosa de vanadato vem sendo estudada por várias décadas. Pettersson e colaboradores fizeram os primeiros relatos de espécies de vanádio formadas em equilíbrio a $25\text{ }^\circ\text{C}$ para soluções aquosas contendo $3,0\text{ mol L}^{-1}$ NaClO_4 ⁴³ e $0,15\text{ mol L}^{-1}$ NaCl , ⁴⁴ e seus estudos são usados na maioria das pesquisas quando as informações de equilíbrio são necessárias. Desde então, vários outros estudos em diferentes condições, como uso de sais iônicos e concentrações distintas foram relatados. ^{41; 45; 46}

Atualmente, o modelo de especiação aceito na literatura considerada que os equilíbrios entre espécies de vanádio em solução são determinados pela concentração de vanádio, pH e força iônica do meio (Figura 7). O modelo inclui evidências de RMN de ^{51}V para a presença e formação das espécies $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$ (V_1), $[\text{V}_2\text{O}_7]^{2-}$ (V_2), $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^{4-}$ (V_4) e $[\text{V}_5\text{O}_{15}]^{5-}$ (V_5) em condições de pH neutro e básico. ⁴⁷⁻⁴⁹ Em condições de pH ácidas, apenas duas espécies majoritárias são relatadas, o V_{10} e a espécie mononuclear de vanádio(V), VO_2^+ . ⁴² Dentre estas, o ânion V_{10} pode apresentar variação no seu grau de protonação, de $[\text{HV}_{10}\text{O}_{28}]^{5-}$ a $[\text{H}_4\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{2-}$ em função do pH do meio utilizado. Em pH abaixo de 4, o ânion decavanadato sofre hidrólise gerando a espécie VO_2^+ . ⁵⁰

Até o momento, os polioxovanadatos contendo hóspedes em suas estruturas foram menos explorados em sua química em solução. Estudos sistemáticos foram realizados apenas para sistemas de fosfovanadato contendo $\text{H}^+/\text{H}_2\text{V}^{\text{VO}}_4^-/\text{H}_2\text{PVO}_4$ em solução aquosa. ^{10; 45} Os três tipos de fosfovanadato descritos foram $[\text{H}_x\text{PV}^{\text{VO}}_7]^{4-x}$ ($x = 1$ a 4), $[\text{H}_x\text{P}_2\text{V}^{\text{VO}}_{10}]^{5-x}$ ($x = 1, 2$) e $[\text{H}_x\text{PV}^{\text{VO}}_{14}\text{O}_{42}]^{9-x}$ ($x = 3$ a 5), identificados pelo uso de potenciometria e RMN de ^{51}V em uma faixa de pH 1 a 10. ⁴⁵

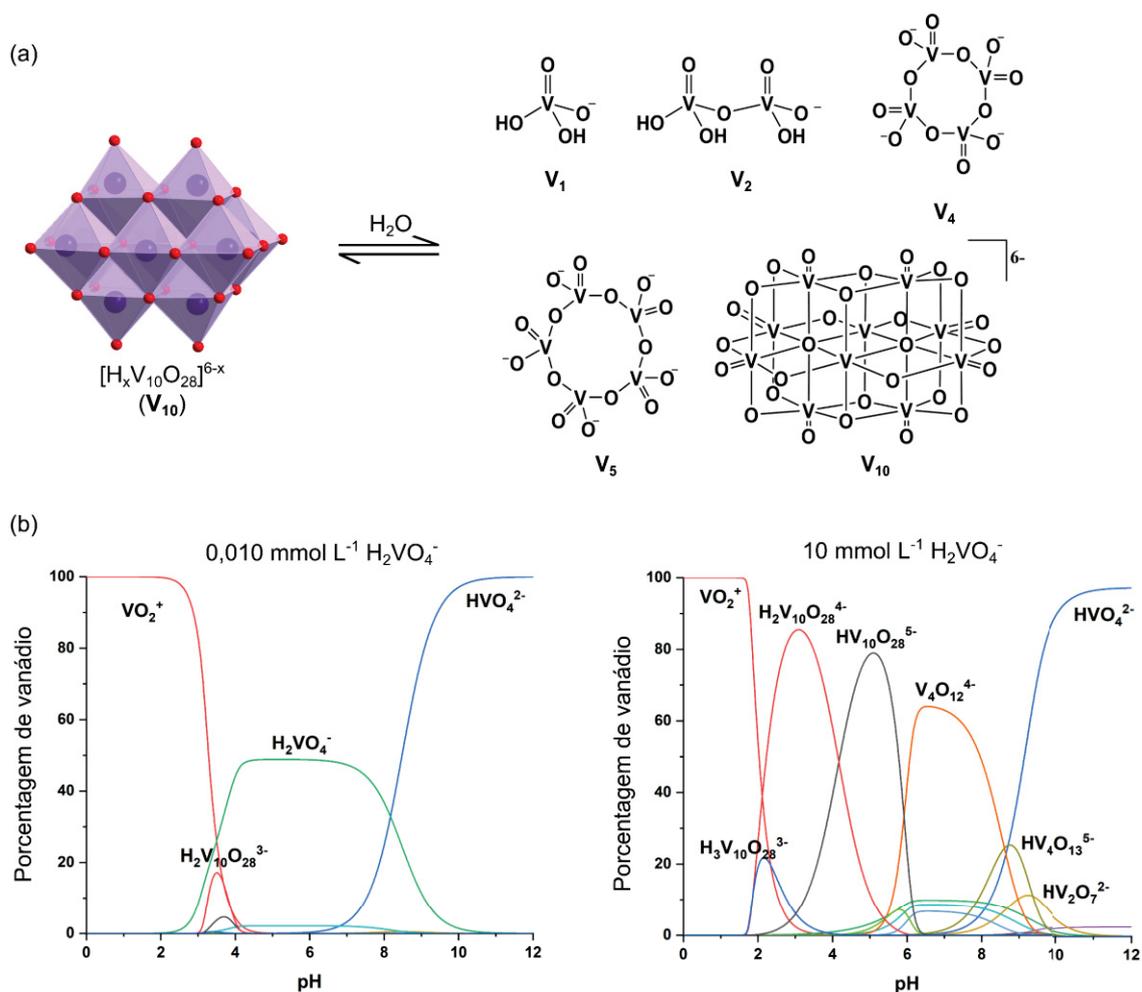


Figura 7 (a) Representação estrutural das espécies mais comuns encontradas em soluções aquosas de decavanadato. (b) Gráfico relacionando a especiação e predominância das espécies de íons vanadato em duas concentrações e diferentes faixas de pH na em meio aquoso com força iônica de 0,15 NaCl. ⁵¹

Dois sistemas de hópede-hospedeiro contendo valência mista foram estudados durante o trabalho de mestrado com $K(NH_4)_4[H_6V^{IV}V_{12}V^{IV}_2O_{38}(P^{VO}_4)] \cdot 11H_2O$ (**V₁₄**) e $[(CH_3)_4N]_6[V^V_7V^{IV}_8O_{36}(Cl)]$ (**V₁₅**) (Figura 8). ^{52, 53} Sabe-se que o estudo de especiação pode ser realizado através do uso combinado da espectroscopia de RMN de ⁵¹V, para detecção de espécies de vanádio(V), e da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) combinada a simulação espectral, para detecção de espécies de vanádio(IV).

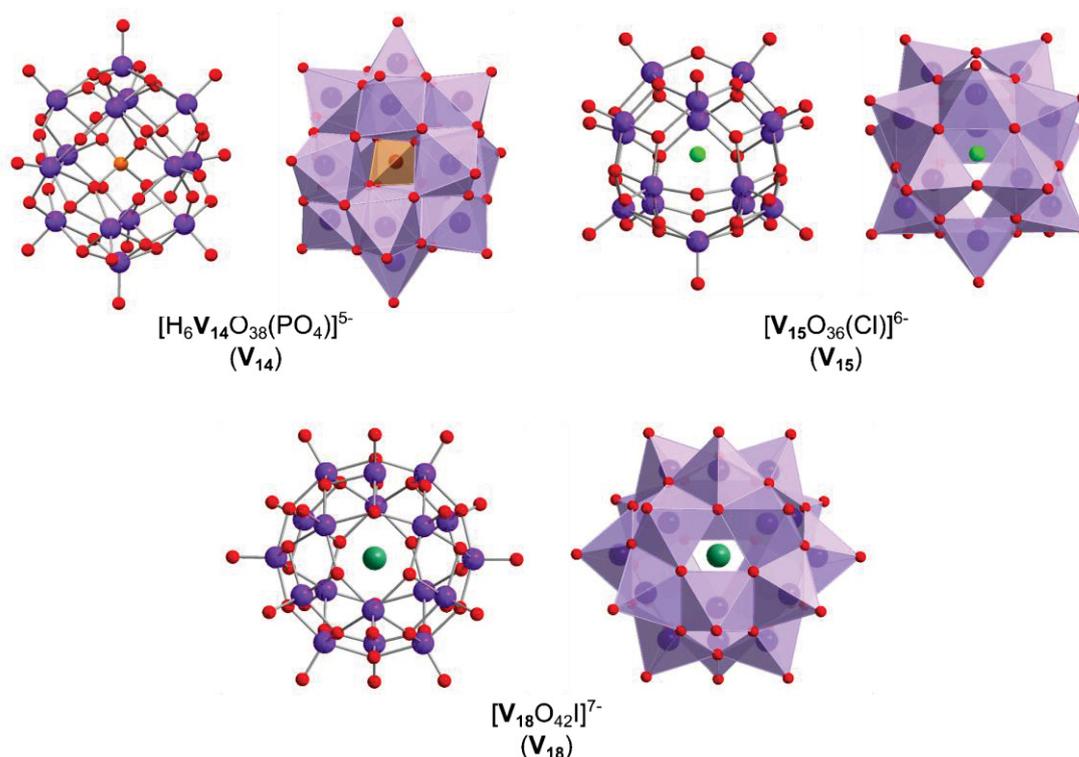


Figura 8 Representação de bola-bastão (esquerda) e poliedro (direita) dos ânions fosfortetradecavanadato (V_{14}), cloropentadecavanadato (V_{15}) e iodo-octadecavanadato (V_{18}). Os átomos de hidrogênio e contraíons foram omitidos, mas as fórmulas dos ânions e suas abreviações são dadas na figura. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho, fosfato em rosa, cloreto em verde-claro e iodeto em verde.

O estudo da especiação do V_{14} em solução aquosa mostrou que as espécies em equilíbrio mudam de acordo com a concentração do composto, o que não foi observado para o V_{15} . Nas menores concentrações de V_{14} ,⁵² foram identificadas as espécies V_1 , V_2 , V_4 e V_5 (Figura 7), enquanto na maior concentração (10 mmol L^{-1}) relatou-se a formação das espécies completamente oxidadas $[\text{H}_4\text{PV}_{14}\text{O}_{42}]^{5-}$ (V_{14} -oxidado) e V_{10} , assim como a presença da espécie mononuclear de oxovanádio(IV), $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$. O mesmo estudo com V_{15} mostrou uma maior estabilidade do agregado, com sua quebra gerando um menor número de espécies, quando comparado ao V_{14} .⁵³

Um terceiro sistema foi descrito recentemente, com um estudo teórico complementando o estudo das características moleculares um ocatadecavanadato do tipo $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]^{5-}$ (Figura 8) em solução por eletroquímica, espalhamento e mecânica molecular,⁵⁴ os quais avaliaram o comportamento em solução aquosa desse POV contendo tetrametilamônio como contraíon.³³ Uma aglomeração elevada das unidades de $\{\text{V}_{18}\}$ com o contraíon foi observada para $\{\text{V}_{18}\}$ com carga menos negativa, enquanto para as unidades $\{\text{V}_{18}\}$ com carga mais negativa foi observada uma maior interação com

as moléculas de água do solvente, reduzindo a aglomeração. Sugere-se que o efeito de aglomeração é dependente da carga total do POV, do contraíon e do solvente. ³³

Considerando outros contraíons, K^+ e Li^+ , para o $\{V_{18}O_{42}\}$ totalmente reduzido, nenhuma interação mediada pelos íons K^+ solvatados foi observada, levando a uma baixa aglomeração dos polioxoânions. ³³ O Li^+ , apesar de ser um cátion menor e mais fortemente solvatado, induziu maior aglomeração entre as unidades $\{V_{18}\}$ do que o K^+ e Cs^+ . ³³ Esse estudo fornece orientações úteis sobre a especiação de um polioxovanadato típico e totalmente inorgânico em solução, mas devem ser utilizados considerando os conhecimentos sobre os equilíbrios em solução comumente observados para vanadatos apresentados neste item.

1.1.2. O ânion decavanadato e o interesse na expansão da classe

Os POVs vem sendo avaliados em seu potencial como medicamentos inorgânicos de baixo custo. O interesse nessa classe é baseado nos resultados biológicos promissores obtidos com o decavanadato ($[H_xV_{10}O_{28}]^{6-x}$, V_{10} , Figura 4) e com o V_1 . O V_{10} tem sido amplamente estudado em sua atividade antidiabética, antibacteriana, antitumoral e em estudos de cristalografia de proteínas, ⁵⁵ proporcionando um bom modelo para o entendimento das interações entre POMs e proteínas. ^{56; 57} No entanto, o número de alvos biológicos para o vanádio é elevado e variável, o que torna o estabelecimento das vias de ação e de metabolismo bastante complexo. ^{58; 59} De modo geral, os alvos propostos incluem a interação do POV com sítios nucleofílicos do DNA, proteínas trans-membrana celulares e proteínas mitocondriais. ^{58; 59}

A variação estrutural dos polioxovanadatos pode levar a uma modificação nas atividades biológicas dos compostos, ampliando as possibilidades de aplicação dos membros da classe. ^{60; 61} Os polioxovanadatos de valência mista (IV/V), que apresentam em sua estrutura os estados de oxidação predominantes em condições fisiológicas, são menos explorados em seu potencial biológico. ⁶² No entanto, a investigação de oxocompostos que contenham o grupo vanadila ($V=O$) e ligantes potencialmente bioativos, podem levar a informações valiosas para o desenvolvimento de meios alternativos no combate e na prevenção de doenças causadas por tumores, bactérias, parasitas, dentre outros. ^{58; 63; 64}

Muitos compostos de vanádio, incluindo os oxocompostos, participam de equilíbrios químicos sendo convertidos em diferentes espécies de vanádio e até mesmo

complexos com ligantes provenientes do próprio organismo.^{58; 65} Todos estes fatores fazem com que seja necessário um estudo detalhado da reatividade dos compostos em solução aquosa e meios de cultura, considerando composição, concentração e pH do sistema, para assim compreender a química e o modo de ação desses compostos.

1.2. Polioxovanadatos com potencial aplicação na terapia do câncer

O papel desempenhado pelo vanádio em sistemas biológicos ainda é considerado controverso. Em geral, os compostos de vanádio avaliados em sua ação biológica têm uma toxicidade relacionada à concentração administrada,⁶⁵ entretanto, até o momento, não foram classificados como carcinogênicos. O que implica em um grande impacto para o estudo de vanadatos como potenciais agentes terapêuticos.⁶⁶

A atividade antitumoral aumentada dos POVs parece ser devida, pelo menos em parte, a inibição de certas enzimas como as fosfatases alcalinas, quinases, ectonucleotidases e P-ATPase.⁶⁷⁻⁷¹ Vanadatos simples apresentam elevado potencial como inibidores de tumores induzidos quimicamente em cobaias e culturas de células *in vitro*.^{66; 72} A atividade observada indica proteção desses compostos contra todos os estágios de carcinogênese – iniciação, promoção e progressão (Figura 9) – quando testado em cobaias.

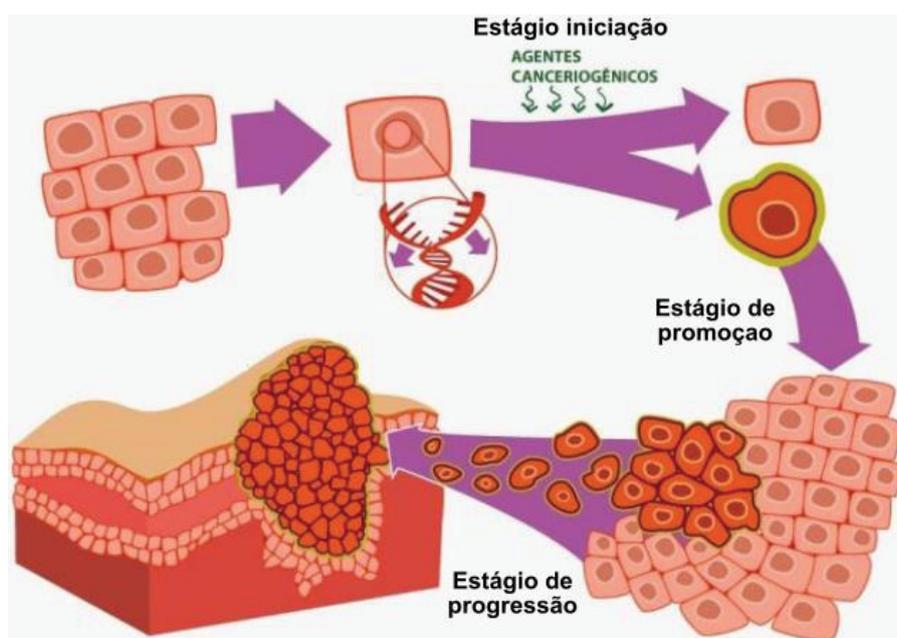


Figura 9 Representação dos três estágios da carcinogênese: (i) iniciação, momento em que as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos; (ii) promoção, as células geneticamente alteradas são transformadas em células malignas, de forma lenta e gradual; e por fim, (iii) progressão, que leva a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas.

O teste de atividade anticâncer *in vitro* do decavanadato, $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (Figura 4), foi feito em linhagens celulares de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e células de leucemia de murino (P388),⁶⁰ nos quais relatou-se dependência da atividade com a estabilidade do agregado e da sua interação com os alvos biológicos. De forma similar, atribui-se a estabilidade do agregado a atividade do decavanadato com carnitina⁷³, 10 vezes mais potente do que o ortovanadato, para linhagens de células tumorais de melanoma de camundongo, adenocarcinoma mamário de camundongo, adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) e pulmão (A549) humano.

O uso de diferentes contraíons também pode modular a atividade do agregado, como relatado para o decavanadato com trietanolamina. O resultado indica atividade antitumoral do POV contra linhagens celulares de carcinoma de laringe humano (HEp-2), câncer de mama humano (MDA-MB-231) e carcinoma de fígado hepatocelular (HepG2). Esse decavanadato apresentou atividade até 10 vezes melhor do que a descrita para a droga quimioterápica 5-fluorouracil.⁷⁴

Devido a sua elevada variabilidade estrutural e composicional, POVs de valência mista constituem uma forma interessante de avaliar o efeito dos diferentes ânions encapsulados e os estados de oxidação do metal na atividade biológica estudada. Os primeiros estudos da atividade biológica dessa classe foram reportados para $[NiV_{13}O_{38}]^7$, sugerem que o $[NiV_{13}O_{38}]^{3-}$ possui potencial como um agente antitumoral de largo espectro. Os resultados incluem potencial antitumoral contra células de carcinoma KB, câncer de cólon humano (HTC) e melanoma murino B16.⁷⁵

Recentemente, a atividade antitumoral de dois octadecavanadatos também foi reportada, mostrando a capacidade do agregado $[V_{18}O_{42}(H_2O)]^{12-}$ como agente antiproliferação em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231 e MCF-7).⁷⁶ O segundo composto, $[V_{18}O_{44}(N_3)]^{10-}$,⁷⁷ apresentou boa eficácia como agente antitumoral em células de mama, melanoma humano, pulmão e câncer cervical. No entanto, estes dois polioxovanadatos de valência mista foram menos explorados em seus estudos biológicos e nenhum estudo de especiação foi relatado.

É provável, porém, que a atividade observada para os polioxovanadatos descritos acima seja causada por diversos mecanismos. Algumas possibilidades levantadas até o momento, envolvem mecanismos como a ativação da produção de radicais livres pelos centros V^{IV}/V^V , a inibição da entrada de glicose nas células, a atividade inibitória de enzimas como ciclooxigenases e/ ou a inibição da transdução de sinal nas células malignas.⁵⁹ Contudo, para determinação das formas de ação e das espécies

responsáveis pelos efeitos observados são necessários estudos mais amplos, com uma maior variedade de polioxovanadatos, hóspedes e proporções de V^{IV}/V^V .

1.2.1. Potencial de polioxovanadatos na quimioproteção de sistemas biológicos

Substâncias nocivas ao organismo podem causar danos via metabolismo oxidativo ou pela transferência de grupos alquila para o DNA, RNA e proteínas, alterando suas estruturas e interrompendo suas funções.⁷⁸ Por exemplo, os agentes alquilantes constituem uma classe de produtos químicos de alta reatividade, mutagênicos e genotóxicos. Podem ser encontrados no ar, na água e nos alimentos ou ser gerados a partir da radiação ionizante e da metabolização de substâncias aparentemente inofensivas, como as nitrosaminas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes na fumaça do cigarro e de automóveis.⁷⁸

Os sítios do DNA mais susceptíveis a reações de alquilação são os átomos de nitrogênio e oxigênio das bases do DNA, assim como os átomos de oxigênio nas porções fosfodiéster.^{79; 80} Embora as células possuam um sistema de defesa natural, este processo não é infalível,⁷⁹ com a replicação do DNA alquilado gerando células mutantes e potencialmente carcinogênicas. Uma representação da reação de alquilação do O^6 da guanina empregando o íon metildiazônio como modelo de agente alquilante é mostrada na Figura 10.

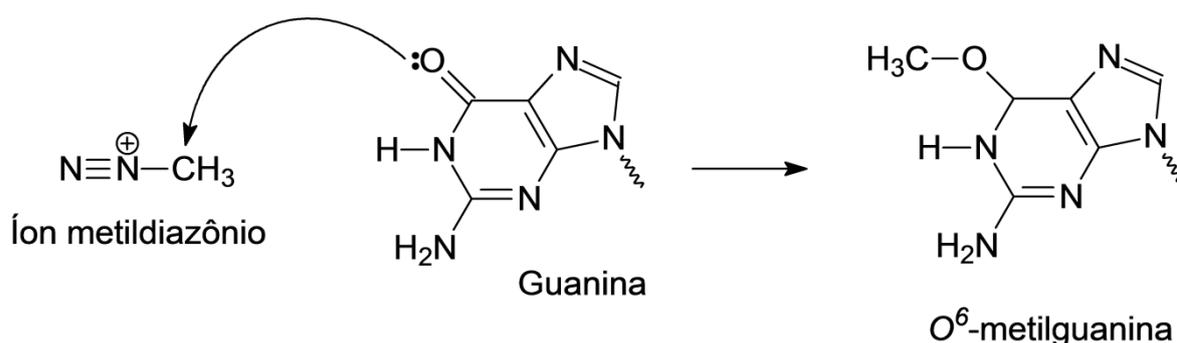


Figura 10 Modelo de alquilação do DNA pelo íon metildiazônio. O ataque nucleofílico da guanina (esquerda) gera o DNA alquilado no O^6 dessa base (direita).
 FONTE: Adaptado de Dragony, F. (2012)⁷⁹

As lesões causadas ao DNA dependem do número de sítios ativos no agente alquilante, do grupo alquila adicionado e da reatividade do sistema (substituição nucleofílica do tipo S_N1 ou S_N2).⁸¹ Os agentes alquilantes do tipo S_N1 , como a *N*-metil-

nitrosureia e o 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina, reagem preferencialmente com os átomos de nitrogênio e oxigênio das bases do DNA (Figura 11).^{79; 82} Para os agentes do tipo S_N2 , como o dimetilsulfato e o iodeto de metila, o alvo principal são os átomos de nitrogênio dessas bases.⁷⁹

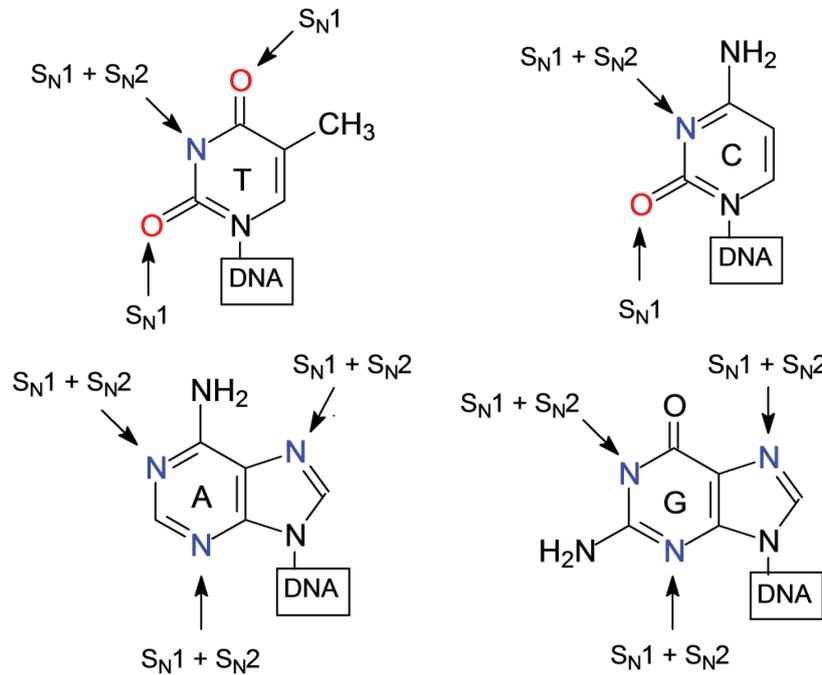


Figura 11 Representação das bases do DNA, timina, citosina, adenina e guanina, e dos sítios de alquilação indicados pelas setas.
 FONTE: Adaptado de Dragony, F. (2012)⁷⁹

A resposta aos agentes alquilantes é diferente em células eucarióticas e procarióticas,^{81; 83} contudo, o uso de modelos simples, como bactérias, tem permitido um progresso significativo no entendimento do processo de alquilação. Assim como, o uso de bactérias no estabelecimento dos mecanismos de defesa natural das células, como a ativação dos sistemas de reparo do DNA (SOS) e da resposta adaptativa induzida (Ada).⁸⁴⁻⁸⁵

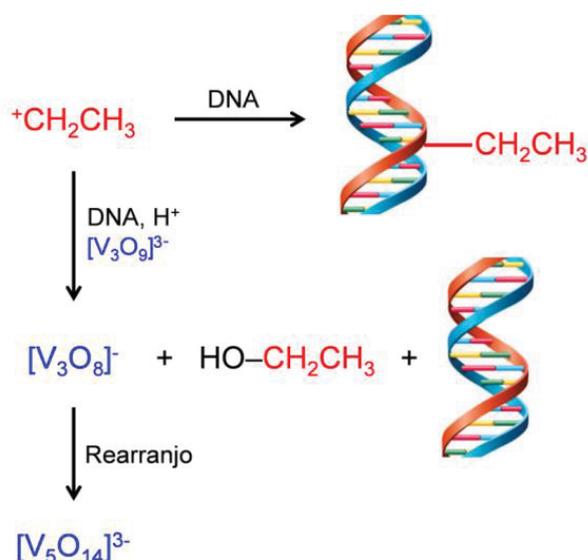
Diferentes estirpes de *E. coli* são classicamente empregadas como modelo no estudo de lesões por alquilação e restauração do material genético,⁸⁶ assim como para o desenvolvimento de estratégias de identificação dos sítios mutagênicos e de bloqueio de replicação do DNA.⁸⁷ Por exemplo, sabe-se que a *E. coli* possui diversos mecanismos de reparação de danos causados por agentes alquilantes, que envolvem um elevado número de enzimas e vias associadas aos genes *ada*, *alkB*, *alkA* e *aidB*.⁷⁹ Porém se não reparados, os danos causados podem comprometer a célula, causando a quebra de fitas de DNA, o qual é letal para grande parte das células.⁸⁸

A investigação de alternativas ao reparo enzimático dos sítios alquilados do DNA tem expandido rapidamente. A descoberta do envolvimento de vanádio em sistemas de reparo do DNA,⁷² tem aumentado o interesse nesses compostos para uso como agentes de prevenção atuando no estágio de iniciação da carcinogênese (Figura 9). Compostos de vanádio são descritos como sendo capazes de exercer ação natural de prevenção à instabilidade genômica, atuando assim como agente indireto de proteção do material genético.⁸⁹

Estudos de compostos de vanádio em diferentes linhagens celulares tem demonstrado que o efeito protetor pode estar relacionado com a modificação de enzimas que inibem à ação de metabólitos carcinogênicos.^{89; 72} O uso de suplementação alimentar combinando NH_4VO_3 e vitamina D3 para o tratamento de câncer de cólon induzido em ratazanas por 1,2-dimetil-hidrazina também mostrou que esses compostos apresentam potencial efeito antitumoral sinérgico.⁹⁰ O efeito observado para os compostos combinados foi melhor do que quando analisados separadamente e atribuído à inibição da alquilação do DNA, a redução da proliferação das células cancerígenas e a indução de apoptose.

Um estudo desenvolvido por Hamilton e Wilker⁹¹⁻⁹³ evidenciou que, entre diferentes sais inorgânicos de metais do bloco principal e de transição, apenas aqueles contendo oxigênio como átomo doador de elétrons foram capazes de inibir à alquilação do DNA plasmidial de *E. coli* por dietilsulfato.^{91; 93} Dentre os compostos empregados, foi observada maior eficiência protetora com selenatos, vanadatos e molibdatos.⁹¹ No entanto, em proporção de 1:1 do Na_3VO_4 para agente alquilante, o vanadato apresentou atividade superior aos demais, com 40% do DNA plasmidial permanecendo não alquilado.¹⁴⁰

O mecanismo de ação proposto por Hamilton e colaboradores não considera as diferentes espécies que podem coexistir em solução, sugerindo que quando a afinidade do agente alquilante pelo oxometalato é maior do que pelo DNA, a toxina é oxidada ao álcool (ou derivado) correspondente, então liberado em solução.^{91, 92} O mecanismo chamado de “interceptação do carcinógeno”, propõe que esses compostos atuam como nucleófilos frente aos agentes alquilantes (eletrófilo), competindo pelo agente alquilante com o DNA (Esquema 1).^{91, 92}



Esquema 1 Esquema geral da ação de oxovanadatos na prevenção da alquilação do DNA.
 FONTE: Adaptado de Hamilton (2006) ⁹¹

Dentre os oxovanadatos avaliados anteriormente – $[V_3O_9]^{3-}$, $[HV_4O_{12}]^{4-}$, $[V_5O_{14}]^{3-}$, $[V_{10}O_{26}]^{4-}$ e $[H_3V_{10}O_{28}]^{3-}$ – aqueles com elevada carga negativa foram mais reativos, ^{90; 91} o que indica um rearranjo das espécies em solução após a reação entre o vanadato e o agente alquilante. O rearranjo resulta em um novo agregado deficiente em um átomo de oxigênio em relação do vanadato de origem e os vanadatos formados podem ainda sofrer novos rearranjos, formando espécies mais estáveis. ^{91; 92} Devido ao caráter mais nucleofílico de POVs reduzidos contendo apenas centros de vanádio(IV) ou de valência mista (V^{IV}/V^V), ²¹ há um maior interesse em seu potencial para aplicação na quimioproteção do material genético via mecanismo de interceptação do carcinógeno.

Uma abordagem empregada pelo nosso grupo de pesquisa explora o potencial de espécies polinucleares de valência mista na quimioproteção frente aos agentes alquilantes para auxiliar no desenvolvimento de drogas mais efetivas e seletivas. O POV de valência mista $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ (**V₁₅**, Figura 8) foi empregado na prevenção do dano ao DNA plasmidial pUC19 de *E. coli* frente à alquilação por dimetilsulfato e dietilsulfato. A quimioproteção observada foi de até 70% com o uso do dietilsulfato. ⁵³

Durante o trabalho de mestrado foram realizados pela primeira vez estudos de quimioproteção utilizando culturas de *E. coli* como um modelo de célula completa e dietilsulfato como agente alquilante. ⁵² Avaliou-se a atividade quimioprotetora dos oxoânions **V₁₅** e $[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)]^{5-}$ (**V₁₄**, Figura 8), ^{52, 53} apresentando efeitos antagônicos. O polioxoânion **V₁₅** levou a um aumento na viabilidade celular de até 40%, quando

comparado com o controle, enquanto o **V₁₄** potencializou a ação deletéria do agente alquilante.

Os estudos de especiação do **V₁₄** e **V₁₅** foram realizados no meio de cultura Luria-Bertani (LB), para o entendimento da química em solução e seu papel na atividade quimioprotetora.⁵² O **V₁₅** se mostrou mais estável em LB do que em água, sendo capaz de reagir com o agente alquilante. O **V₁₄**, no entanto, decompôs-se rapidamente no meio LB, indicando baixa reatividade com o agente alquilante, o que corrobora a ausência de efeito quimioprotetor. Adicionalmente, os principais produtos de decomposição do **V₁₄**, $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ e o ânion **V₁₀**, são relatados como pouco reativos com o dietilsulfato.

Os resultados apresentados pelo grupo concordam com a hipótese formulada por Hamilton e Wilker,^{90; 91} com a proposta de um mecanismo de proteção do DNA que envolve a transferência preferencial do grupo alquila do agente alquilante para a espécie contendo vanádio, ao invés de para o DNA (Esquema 1). No entanto, a presença ou ausência de atividade quimioprotetora contra a ação do agente alquilante parece ser claramente dependente da natureza química e estabilidade das espécies em solução aquosa e no meio de cultura após a adição do agente alquilante.⁵²

1.3. Polioxovanadatos para o tratamento de patologias causadas por microorganismos

Doenças infecciosas podem ser causadas por diferentes classes de organismos patogênicos, os quais consistem em vírus, bactérias, protozoários e fungos. Estas doenças são uma das principais causas de morte no mundo todo, particularmente em países em desenvolvimento e em crianças. Três destas estão na lista das 10 doenças mais mortais do mundo publicada em 2018 pela organização de saúde mundial (World Health Organization),⁹⁴ sendo elas, infecções respiratórias, doenças causadoras de diarreia e tuberculose.

Uma das frentes recentemente explorada para desenvolvimento de terapia combinada emprega complexos de metais de transição associados a compostos orgânicos derivados de isoniazida, tiosemicarbazonas, quinolonas, dentre outros.⁹⁵ Até o momento, há evidências de atividade antituberculose de vários modelos contendo metais de transição,⁹⁵⁻⁹⁸ nos quais a lipofilicidade, os estados de oxidação e a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio podem ser aliados na busca por medicamentos alternativos.

O potencial de complexos de vanádio no tratamento de patologias causadas por microorganismos tem sido cada vez mais explorado, no entanto, os dados reportados ainda são bastante preliminares. O V_{10} foi detectado em organelas ácidas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio contendo vanádio.³⁴ Por outro lado, propõe-se que o V_{10} pode interagir com proteínas de membrana, podendo afetar o metabolismo, mesmo que, quantidades significativas do elemento não entrem na célula.³⁴

Relatos de atividade antimicrobiana do V_{10} permanecem escassos na literatura, quando comparados a estudos de atividade antitumoral, antidiabética e de interação com proteínas.³⁴ No entanto, a descrição da ação antibacteriana do V_{10} com sais orgânicos pode ser encontrada para bactérias gram-positivas e/ou gram-negativas. Bons resultados foram obtidos no estudo de membranas de quitosana- $Ca_3V_{10}O_{28}$ contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (*E. coli*),⁹⁹ com toxicidade atribuída a combinação da atividade antimicrobiana da quitosana e a capacidade de inibição de bombas de íons pelo decavanadato.

Atividade inibitória de culturas bacterianas de *Streptococcus pneumonia* também foi observada para soluções de V_{10} com 4-metoxibenzilamônio e *tert*-butilamônio. O sistema apresentou resposta dependente da natureza do composto de vanádio, onde o V_{10} mostrou um melhor resultado do que o Na_3VO_4 .¹⁰⁰ Com o uso do ligante 4-picolina, por vez, foi observada uma toxicidade moderadamente maior que a do decavanadato de sódio para *Bacillus cirroflagellosus* e duas espécies de fungo, *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum*.¹⁰¹

Estudos envolvendo protozoários também foram relatados, em que o $(NH_4)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 5H_2O$ levou a redução de 50% da viabilidade de promastigotas de *Leishmania tarentolae*¹⁰² e a inibição da fosfatase ácida secretada por essa.¹⁰³ Foi observado ainda uma atividade dependente do tempo considerando a especiação dos compostos. O V_{10} foi o mais efetivo em sua atividade, especialmente em menores razões de substrato:oxovanadato, indicando um efeito maior da espécie polinuclear.^{102; 103}

Recentemente, nosso grupo relatou o efeito tóxico de sais de decavanadato associados a moléculas orgânicas, nicotinamida e isonicotinamida, em culturas de *E. coli*, *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*).¹⁰⁴ Os compostos $(1,4-C_6H_7N_2O)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2C_6H_6N_2O$ e $(1,3-C_6H_7N_2O)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2H_2O \cdot 2C_6H_6N_2O$ (Figura 12) foram eficazes na redução do crescimento da *E. coli*, sendo o decavanadato associado aos ligantes orgânicos cerca de 3 vezes mais efetivo que o V_{10} , $[Na_6(H_2O)_{20}V_{10}O_{28} \cdot 4H_2O]_n$ (V_{10}).

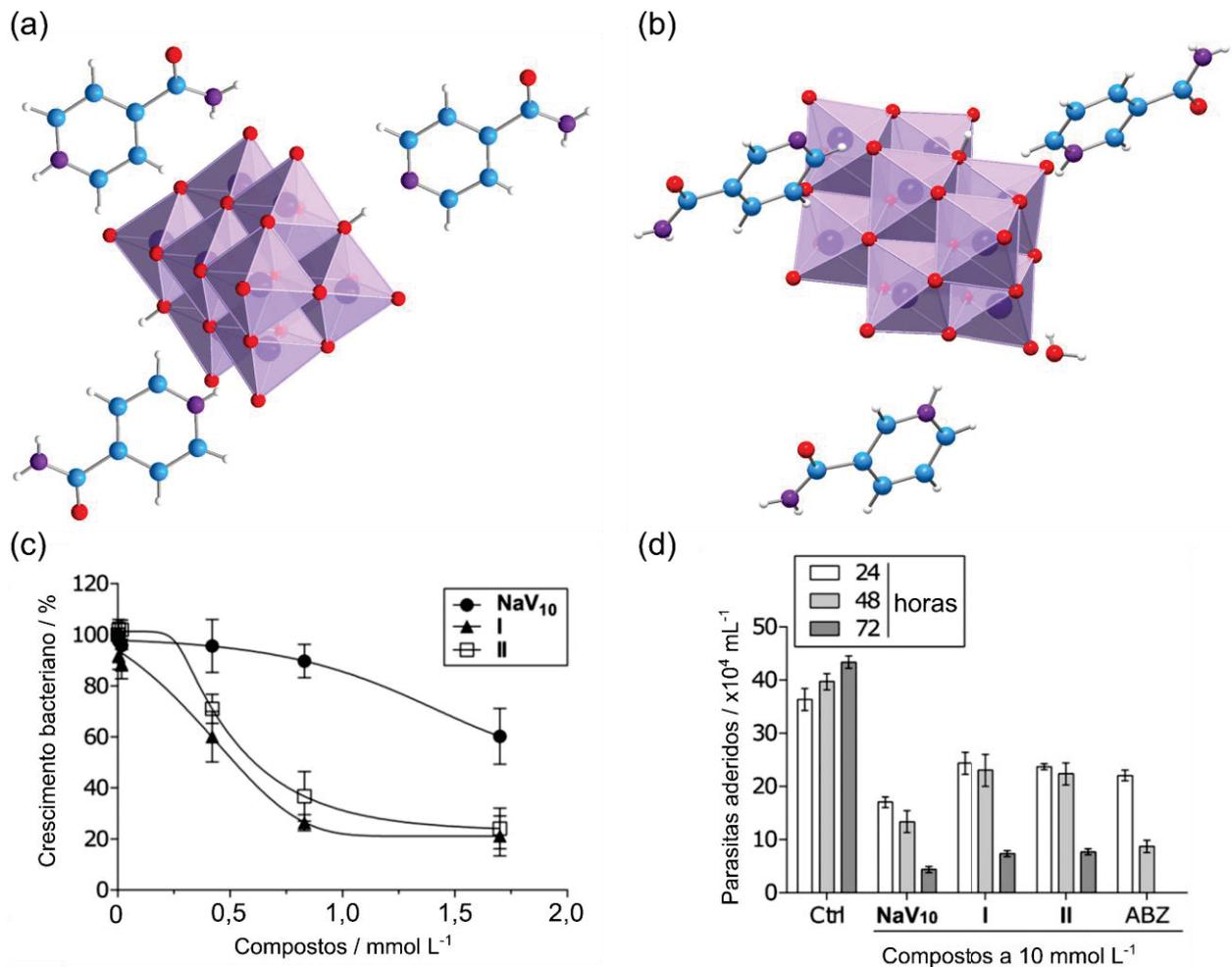


Figura 12 Representação dos decavanadatos (a) $(1,4\text{-C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (I), (b) $(1,3\text{-C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (II), com alguns dos contraíons omitidos para maior clareza. O polioxovanadato é apresentado como estrutura de poliedros lilás, com o vanádio ocupando o centro do poliedro, com os átomos de carbono em azul, nitrogênio em roxo e oxigênio em vermelho. (c) Inibição do crescimento de culturas de *E. coli* mediante tratamento com I, II e NaV₁₀ e (d) Experimento de adesão de uma população de *G. intestinalis* de uma monocamada de células Vero.¹⁰⁴

As hipóteses levantadas sugerem que os contraíons atuam facilitando a captação de espécies de vanádio pelas células bacterianas ou perturbando a membrana celular bacteriana.¹⁰⁴ Os V₁₀ levaram ainda à redução na viabilidade e na capacidade de adesão dos trofozoítos da *G. intestinalis*, sendo cerca de 30% menos tóxicos para as células Vero (*Cercopithecus aethiops*, linhagem de células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano) do que o medicamento de referência, albendazol, empregado no tratamento da giardíase.¹⁰⁴

Concomitantemente, Crans e colaboradores relataram a atividade inibidora do crescimento celular de culturas micobacterianas, *Mycobacterium smegmatis* (*M.*

smegmatis) e *Mycobacterium tuberculosis*, causada pelo uso de decavanadato ou metavanadato de sódio (NaVO_3 , Figura 13).¹⁰⁵ O uso de estudos de especiação combinados com os ensaios biológicos mostrou que as duas espécies tiveram efeitos diferentes no crescimento das micobactérias, onde o V_{10} foi 100 vezes mais efetivo que o NaVO_3 na inibição do crescimento das bactérias. Os estudos de especiação em solução mostram a formação de espécies monoméricas de vanádio na presença das células, o que não interfere na atividade observada.¹⁰⁵ Estes resultados sugerem que POVs com diferentes características estruturais devem ser avaliados em sua capacidade de inibir o crescimento de micobactérias e outros patógenos.

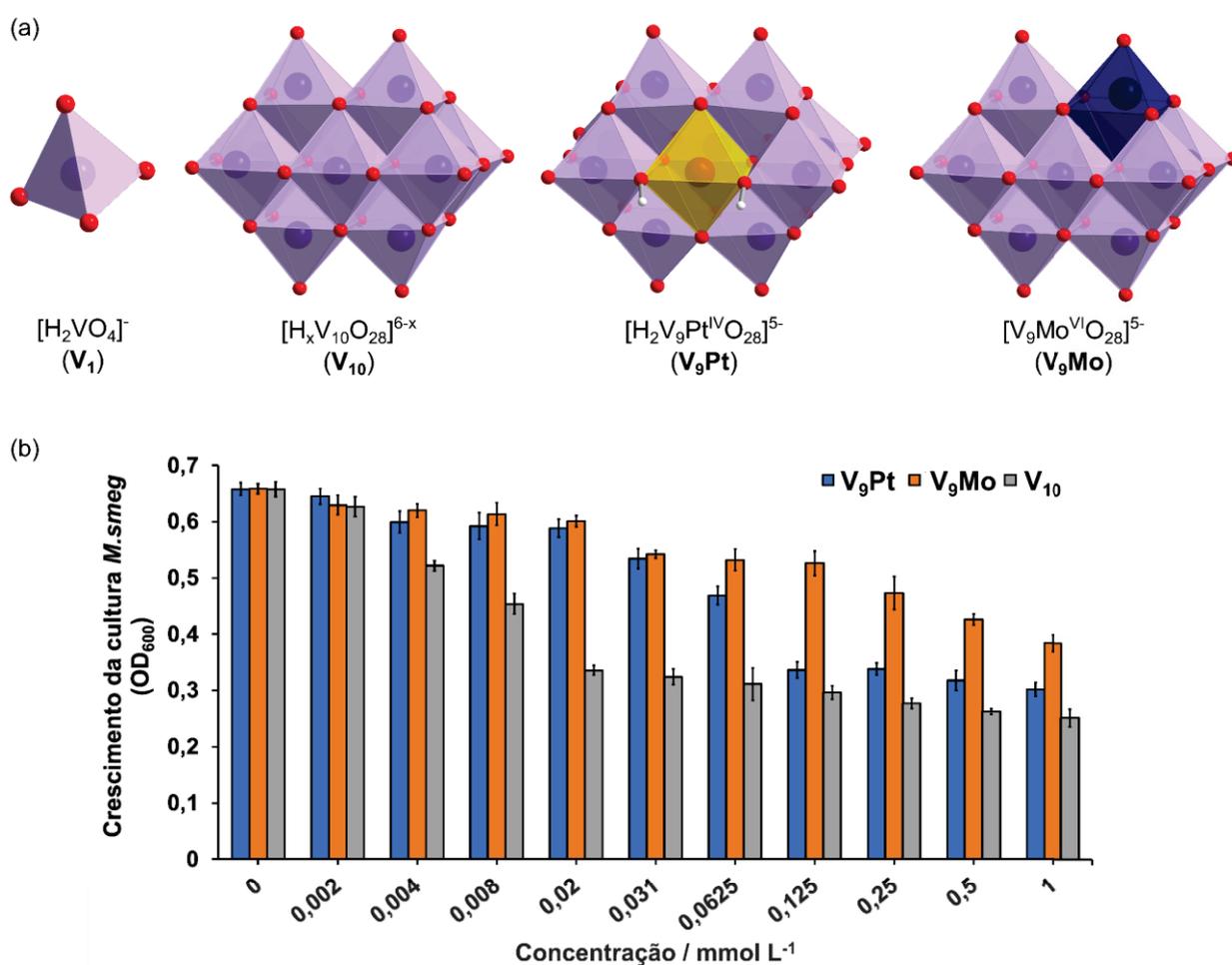


Figura 13 (a) Representação do monovanadato (V_1), decavanadato (V_{10}) e dos derivados substituídos de decavanadato $[\text{H}_2\text{PtV}_9\text{O}_{28}]^{5-}$ (V_9Pt) e $[\text{V}_9\text{MoO}_{28}]^{5-}$ (V_9Mo), com contrações omitidas para maior clareza. Os poliedros lilás contêm o vanádio ocupando o centro do poliedro e oxigênios os vértices; os poliedros amarelo e azul contêm o átomo de platina e molibdênio, respectivamente, no centro. (b) Curva de crescimento da cultura celular para *M. smegmatis* tratada com V_{10} (cinza), V_9Pt (azul) e V_9Mo (laranja) com concentrações variando de 0,0020 a 1,0 mmol L⁻¹. O desvio padrão é apresentado para os experimentos realizados em triplicata.

Como parte do doutorado-sanduíche, um novo estudo foi desenvolvido e publicado em janeiro de 2021 ¹⁰⁶ avaliando a expansão da classe de POVs com dois derivados substituídos de decavanadato em culturas de *M. smegmatis* apresentados na Figura 13. Os resultados mostram que o ânion decavanadato possui o maior potencial inibidor com $IC_{50} = 3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, no entanto, o $V_9\text{Pt}$ foi o agregado mais estável nas condições de cultura da micobactéria *M. smegmatis*. ¹⁰⁶ Já o $V_9\text{Mo}$ foi 4 vezes menos potente que o $V_9\text{Pt}$, assim como o menos estável no meio de cultura 7H9, com a formação de um maior número de espécies de menor nuclearidade de vanádio formados.

As modificações estruturais em relação ao decavanadato alteram o efeito inibitório observado, assim como a estabilidade do agregado nas condições de crescimento micobacteriano. Os estudos do potencial de polioxovanadatos no tratamento de patologias causadas por microrganismos ainda é bastante escasso. Dentre os POVs avaliados, o decavanadato ainda ganha destaque nos estudos com uma atividade promissora, a qual abre o caminho para outros membros da classe, contendo cargas, estruturas e comportamento em solução diferentes.

1.4. Polioxovanadatos em sua capacidade de interação com membranas biológicas

A presença de atividade biológica implica que um material é absorvido por uma célula ou que o material interage com os receptores de membrana plasmática dessa célula. ¹⁰⁷ Devido ao grande tamanho e elevada carga negativa dos polioxovanadatos, não é trivial prever como um ânion tão grande pode interagir com as membranas, se ele atravessa a membrana ou se é absorvido pelas células. Portanto, torna-se importante investigar como o ânion interage com membranas e sistemas modelo de membrana.

Muitos esforços têm sido feitos para o entendimento dos modos de interação de vanadatos com modelos de membrana celular. ¹⁰⁷ Combinados, esses modelos permitem avaliar as interações de vários sistemas de vanádio com modelos de natureza química diferente. ¹⁰⁷ O sistema de micelas reversas, por exemplo, é considerado o mais simples e frequentemente utilizado, formadas pela combinação de surfactantes, solventes orgânicos apolares e pequenas quantidades de água. ¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Grande parte dos oligovanadatos com ligantes orgânicos investigados em modelos de membrana foram capazes de interagir com os surfactantes lipídicos apresentando interação forte, penetrando parcial ou totalmente na interface lipídica. ¹¹¹

¹¹² No entanto, o V_{10} permanece localizado na fase aquosa de sistemas modelo baseados em bicamadas lipídicas e micelas reversas de OAT (bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio). ^{107; 108-110} Sugerindo uma limitação das interações do V_{10} com moléculas lipídicas hidrofóbicas nas membranas celulares.

Dentre os estudos com POVs, a associação de metformina- V_{10} com a superfície de micelas reversas (Figura 14) de AOT foi um dos modelos. ¹¹³ As análises espectroscópicas apontam para um rearranjo das moléculas de água em torno da superfície carregada negativamente da micela. O resultado foi reforçado recentemente por uma revisão sobre o papel dos cátions de sódio em estruturas no estado sólido comparado à micela reversa Na^+ -AOT contendo V_{10} . ¹¹⁴

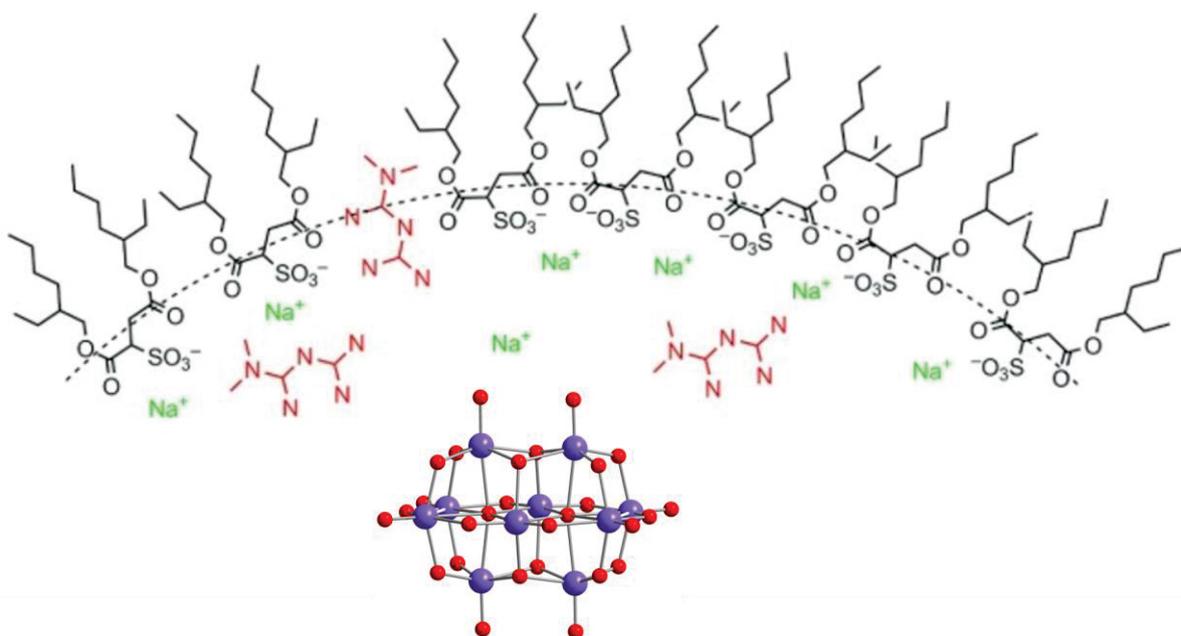


Figura 14 Representação esquemática da interação de metformina- V_{10} com uma micela reversa. Proposta feita por meio de resultados de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho.

FONTE: Adaptada de Chatkon, A. (2013) ¹¹³

Estudos do decavanadato com micela reversa não-iônica de Igepal (octilfenoxipolietoxietanol), mostraram que a afinidade da interface por prótons não requer uma superfície carregada negativamente. ^{108; 115} Ambas as interfaces carregadas negativamente e neutras mostraram um comportamento semelhante, onde o ânion V_{10} se localiza junto às moléculas de água nas proximidades da micela. Esse posicionamento do V_{10} indica que o uso de compostos de cargas distintas ou diferentes contraíons podem levar a uma grande diferença no comportamento observado.

Mesmo com os grandes avanços realizados na área, uma questão que ainda persiste é se espécies volumosas e de alta densidade de carga negativa como os POVs, são capazes de passar pela membrana celular, lipofílica e de potencial negativo, a fim de exercer seus efeitos. ^{107; 116; 117} Além disso, sistemas de membranas são heterogêneos e não triviais de serem estudados, especialmente com compostos como os polioxovanadatos.

Existem diferentes propostas e há controvérsias sobre se o polioxoânion age sobre o domínio extracelular ou intracelular de proteínas de membrana. ¹¹⁸ Em células eucarióticas, compostos de vanádio são relatados na interação com a bicamada lipídica da membrana plasmática e iniciam sinalização por meio de proteínas de membrana que funcionam como receptores de hormônios. ¹¹⁹⁻¹²¹ Receptores representam aproximadamente 40% dos alvos biológicos para tratamento com drogas. ¹²² Logo, receptores têm sido utilizados para examinar os efeitos biológicos de potenciais drogas em células intactas e, mais especificamente, em proteínas de membrana envolvidas na transdução do sinal extracelular para o interior da célula. ^{122; 123}

As proteínas da família de receptores de proteína-G acoplados, ¹²³ composta por aproximadamente 1000 receptores que mediam a resposta a luz, odor, hormônios e neurotransmissores, como o receptor hormonal luteinizante (do inglês, *luteinizing hormonal receptor*, LHR). O LH (hormônio luteinizante) é, por sua vez, produzido pela hipófise e regula a atividade dos ovários e testículos. Em um estudo recente desenvolvido pelo grupo de Crans, foi avaliado o efeito do bis(maltolato)oxovanádio(IV), bis(etilmaltolato)oxovanádio(IV) e $VOSO_4$ nesses receptores, mais especificamente LHR de células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *chinese hamster ovary*). ¹²⁰ Observou-se que perturbações na ordem dos lipídios causadas pelos compostos de vanádio, induzem indiretamente a sinalização celular gerada pelo hormônio LHR. Que, por sua vez, se agrega na membrana plasmática em resposta a mudança na ordem dos lipídios (Figura 15). É importante ressaltar que essa resposta ocorre sem interações diretas ou ligação do composto ao receptor. ¹²⁰ No entanto, uma vez que os efeitos de BMOV e $VOSO_4$ foram diferentes, o estudo dos efeitos de especiação nesse tipo de sistema se torna ainda mais importante. ¹²⁰

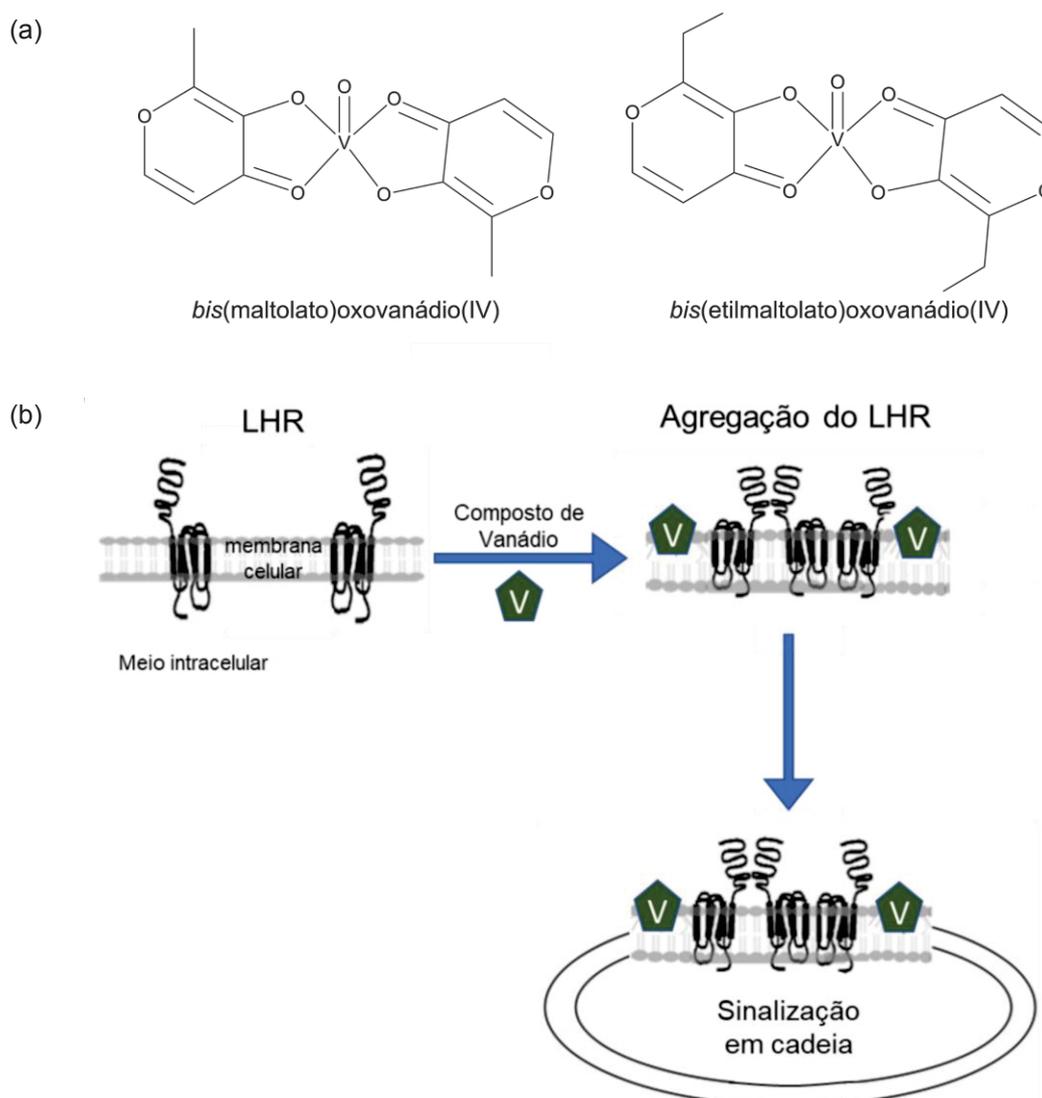


Figura 15 (a) Representação dos compostos de vanádio, *bis(maltolato)oxovanádio(IV)* (BMOV) e *bis(etilmaltolato)oxovanádio(IV)* (BEOV). (b) Modelo de mecanismo proposto para interação de compostos de vanádio, BMOV, BEOV e sulfato de vanadila.

Os resultados biológicos obtidos com polioxovanadatos sugerem a necessidade de maiores investigações sobre sua atividade e modo de ação, buscando correlacionar a atividade observada com fatores como a nuclearidade, a presença de heteroátomos na estrutura dos agregados e a reatividade dos POVs nos diferentes meios biológicos empregados. Desta forma, neste trabalho de tese, buscou-se ampliar o número de polioxovanadatos estudados sobre três modelos biológicos distintos: (i) atividade quimioprotetora em culturas de *Escherichia coli* frente a ação de agentes alquilantes, (ii) atividade de inibição do crescimento micobacteriano em culturas de *Mycobacterium smegmatis* e (iii) uso do LHR para detecção indireta da perturbação da camada lipídica de células CHO pelos compostos de vanádio.

1.5. Objetivos gerais e específicos

1.5.1. Objetivos gerais

Compreender os sistemas químicos baseados em vanádio, em sua relação estrutura-reatividade-atividade, que levam ao seu modo de ação com diferentes sistemas biológico modelo, através de contribuições para o entendimento do papel de cada polioxovanadato e das espécies geradas em solução.

1.5.2. Objetivos específicos

- (i) Preparar polioxovanadatos de diferentes nuclearidades e proporção entre os diferentes estados de oxidação (V^{IV}/V^V), na presença de ânions encapsulados;
- (ii) Caracterizar os compostos obtidos, no estado sólido e em solução aquosa, por técnicas espectroscópicas, análises termogravimétricas e difratometria de raios X de monocristal, onde cabível;
- (iii) Avaliar o efeito dos POVs sintetizados sobre a viabilidade celular de culturas de *Escherichia coli*;
- (iv) Avaliar a atividade quimioprotetora dos POVs sintetizados em culturas de *Escherichia coli*, na presença do agente alquilante dietilsulfato;
- (v) Promover reações diretas entre os POVs que se mostrarem mais promissores e os agentes alquilantes. Para tal estudo, empregar técnicas espectroscópicas como RPE e RMN de ^{51}V ;
- (vi) Avaliar a inibição do crescimento da *Mycobacterium smegmatis* causado pelos POVs de valência mista $K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ (**V₁₄**) e $[(CH_3)_4N]_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ (**V₁₅**);
- (vii) Estudar o efeito do $H_2VO_4^-$ (**V₁**), $[(Na_6(H_2O)_{20}V_{10}O_{28} \cdot 4H_2O)_n]$ (**V₁₀**), **V₁₄** e **V₁₅** na perturbação da camada lipídica de células CHO, empregando técnicas espectroscópicas (RPE e RMN de ^{51}V);
- (viii) Estudar a reatividade dos POVs nos diferentes meios de cultura empregados, utilizando técnicas espectroscópicas (RPE e RMN de ^{51}V);

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição da aparelhagem e técnicas experimentais

As técnicas e análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR), exceto quando citado.

2.1.1. Análise elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio em cada produto foram determinadas por análises de combustão em um equipamento Thermal Scientific Flash EA 1112 Series Elemental Analyser ou analisados na Central Analítica do Instituto de Química da USP em um equipamento Analisador elementar – Perkin Elmer 2400 series II.

O teor de vanádio do **V₁₈I** foi obtido por Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) com um sistema Varian Vista MPX ICP-OES realizada pelo MEDAC Laboratories Ltd. (Chobham, Surrey, UK); O teor de vanádio do **V₁₈P** foi determinado em um espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) da Perkin Elmer modelo Optima série 8300 com visão axial e radial no LAMAQ (Laboratório Multiusuários de Análise Química) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

2.1.2. Determinação da valência média por titulometria

A determinação da valência média dos produtos foi realizada por meio de titulação redox, conforme método descrito na literatura.¹²⁴ A determinação do teor de vanádio(V) foi realizada utilizando o sulfato ferroso amoniacal ((NH₄)₂[Fe(SO₄)₂].6H₂O), e para vanádio(IV) foi utilizado o permanganato de potássio (KMnO₄), conforme representado nas Equações 3 e 4. Foram empregados sais de [VO(acac)₂] e NH₄VO₃ como padrões de vanádio(IV) e vanádio(V), respectivamente. As amostras foram preparadas a partir de soluções em ácido sulfúrico (1,0 mmol L⁻¹) a 80°C resfriadas a temperatura ambiente.



[Equação 3]



[Equação 4]

2.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV) na região de 400 a 4000 cm^{-1} foram registrados em um instrumento BIORAD FTS 3500GX em pastilhas de KBr, com 32 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} . Para o preparo das pastilhas foram utilizadas aproximadamente 200 mg de KBr e 2 mg de amostra. A mistura foi macerada e prensada para a formação de uma pastilha transparente.

2.1.4. Espectroscopia de espalhamento Raman

Os espectros Raman foram obtidos em um equipamento Renishaw Raman Image acoplado a um microscópio ótico Leica, este último foca a radiação incidente em uma área de amostra de 1 μm^2 . Os espectros foram registrados usando laser de He-Ne (633,120 nm), na região de 200 a 2000 cm^{-1} e com potência de 0,2 mW.

2.1.5. Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram registrados nas amostras sólidas pulverizadas, em solução aquosa ou em meio de cultura, a temperatura ambiente e a 77 K. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker EMX-Micro operando em banda X (9,5 GHz). O tratamento dos dados de RPE e a simulação dos espectros foram realizados pelo Prof. Dr. Ronny Rocha Ribeiro (DQUI-UFPR) com o auxílio do programa EASYSpin.¹²⁵

2.1.6. Ressonância magnética nuclear (RMN de ^{51}V)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de vanádio (^{51}V) foram realizadas a 295 K em um equipamento Bruker AVANCE 400 MHz equipado com uma sonda de detecção multinuclear (5 mm), utilizando pulsos de 90° calibrados, 4096 e 2048 scans, tempo de repetição (*recycling delay*) de 0,100 s, tempo de aquisição de 0,16 s e uma janela espectral de 990 ppm (+44 a -946 ppm). Os espectros foram registrados em soluções aquosas contendo 10% de água deuterada (D_2O). Os deslocamentos químicos (δ) das amostras foram referenciados empregando VOCl_3 puro como padrão externo, em capilar, para o núcleo de ^{51}V com o seu sinal fixado em 0,00 ppm.

Na CSU as análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{51}V foram realizadas em um equipamento Bruker Avance 400 MHz (78,9 MHz para ^{51}V). Os espectros foram registrados utilizando 4096 scans, tempo de repetição (*recycling delay*) de 0,100 s, pulsos de 90° calibrados e uma janela espectral de -53 a -1043 ppm. Os sinais das amostras foram referenciados empregando Na_3VO_4 (100 mmol L^{-1} , pH 12,8, sinais em -535 e -559 ppm) como padrão externo, em capilar, para o núcleo de ^{51}V .¹²⁶ Os sinais foram omitidos para maior clareza dos espectros. O equipamento foi calibrado para vanádio utilizando VOCl_3 puro como padrão fixado em 0,00 ppm. O espectro de RMN de ^1H relatado na literatura para o agente alquilante dietilsulfato mostra sinais em 1,18 (t) e 3,84 ppm (q).⁹¹

2.1.7. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível e infravermelho próximo (UV/Vis/NIR)

Os espectros eletrônicos UV/Vis/NIR foram adquiridos à temperatura ambiente em uma faixa de comprimento de onda de 250-2000 nm em um espectrofotômetro PerkinElmer LAMBDA 1050 UV/Vis/NIR equipado com três detectores de PMT/InGaAs/PbS. As medidas foram realizadas empregando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,0 mm e concentração dos compostos de 1,5 mmol L^{-1} .

2.1.8. Difractometria de raios X de monocristal (DRX-monocristal)

A análise de difratometria de raios X de monocristal foi realizada em um difratômetro Bruker modelo D8 Ventur equipado com detector de área Photon100 com tecnologia CMOS (do inglês, *complementary metal oxide semiconductor*), duas fontes de radiação monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) e sistema de controle de temperatura na amostra com dispositivo Kryoflex II, para a realização de coletas de dados a temperaturas de 100 K.

As coletas de dados e integrações foram realizadas utilizando o software APEX 2 da Bruker com a fonte de Mo-K α . O refinamento dos dados foi realizado nos softwares WinGX e SHELXS,^{127; 128} utilizando todas as reflexões. O refinamento das estruturas foi realizado pela Ma. Francielli S. Santana e pelo Dr. David L. Hughes. As figuras foram geradas com uso dos programas ORTEP 3 e Diamond 4.

2.1.9. Medida de susceptibilidade magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas no estado sólido a 296 K através do método de Gouy modificado,^{129; 130} utilizando uma balança de susceptibilidade magnética Johnson-Matthey MKII. Os compostos $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ foram utilizados como padrão para calibração, assim como água ultrapura. As correções para o diamagnetismo dos ligantes foi feita utilizando constantes de Pascal.¹³¹

2.1.10. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em fluxo de N_2 gasoso, 50 mL min^{-1} , em um equipamento Netzsch STA449 F3 Júpiter, com um forno de carbetto de silício. Uma amostra de aproximadamente 4 mg foi aquecida em cadinho de alumínio, utilizando de uma rampa de temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em um faixa de 20 a $800 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.1.11. Determinação da densidade óptica (DO)

As leituras de densidade óptica, relativa à absorbância, das culturas bacterianas foi realizada visando estimar o crescimento e atividade metabólica de células, não havendo distinção entre células viáveis e mortas. Os comprimentos de onda comumente utilizados para a medida da DO de suspensões bacterianas ou leveduras incluem 540, 600 e 640 nm.

Neste trabalho, foi utilizado um leitor de microplacas Berthold Technologies TriStar LB 941 e placa de 90 poços em um comprimento de onda de 595 nm com a *Escherichia coli* (*E. coli*) e 600 nm com a *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), chamados DO₅₉₅ e DO₆₀₀, respectivamente.

2.2. Condições experimentais e generalidades

2.2.1. Purificação da água

As sínteses e procedimentos experimentais apresentados neste trabalho foram realizados ao ar utilizando água ultrapura (MilliQ, Millipore tipo 1, resistividade 18,2 MΩ·cm a 25 °C).

2.2.2. Preparo do material para ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados em câmaras de fluxo laminar. Todos os materiais, soluções e meios de cultura empregados nos ensaios biológicos foram esterilizados antes do uso em autoclave modelo HA, SERCON. As culturas bacterianas foram incubadas em estufa de cultura Modelo 002 CB, Fanem Ltda, a 37 °C e centrifugadas em uma ultracentrifuga MiniSpin Eppendorf. As culturas bacterianas foram posteriormente incubadas em incubadores rotatórios para crescimento de microrganismos New Brunswick Scientific C25 Incubator Shaker sob agitação de 120 rpm e temperatura de 37 °C.

2.2.3. Estoque da bactéria *Escherichia coli* DH5 α

A estocagem da estirpe de *E. coli* DH5 α foi mantida em suspensão em uma solução de glicerol-água 50% a uma temperatura de -20 °C.

2.2.4. Estoque *Mycobacterium smegmatis* mc² 155

A estocagem da estirpe de *M. smegmatis* mc² 155 foi mantida em suspensão em uma solução de glicerol-água 50% a uma temperatura de -20 °C.

2.3. Reagentes e solventes

Todos os reagentes foram utilizados conforme recebido do fornecedor. A Tabela 1 lista a procedência e pureza dos reagentes. As células CHO foram fornecidas pelo Dr. Takamitsu Kato da Colorado State University.

Tabela 1 Lista de reagentes utilizados em todas as etapas deste trabalho e especificações do fabricante

Nome	Fórmula	Grau de pureza (%)	Fabricante
Metavanadato de amônio	NH ₄ VO ₃	99,0	Vetec
Acetilacetato de vanádio	VO(acac) ₂	–	Alfa Aesar
Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	99,2	USB
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	99,0	Aldrich
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	99,5 – 100,5	Merck
Iodeto de tetrametilamônio	(CH ₃) ₄ NI	≥98,0	Merck
Cloreto de tetrametilamônio	(CH ₃) ₄ NCl	≥98,0	Aldrich
Permanganato de potássio	KMnO ₄	99,0 – 100,5	Merck
Sulfato ferroso amoniacal hidratado	(NH ₄) ₂ [Fe(SO ₄) ₂]·6H ₂ O	99,0	Vetec
Sulfato férrico amoniacal hidratado	NH ₄ [Fe(SO ₄) ₂]·12H ₂ O	98,5 – 101,5	Synth
Difenilamina sulfonato de bário	C ₂₄ H ₂₀ BaN ₂ O ₆ S ₂	–	Merck
Dietilsulfato	(C ₂ H ₅ O) ₂ SO ₂	98,0	Aldrich
Ácido nalidíxico	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	≥98,0	Aldrich
Cloreto de sódio	NaCl	≥99,5	Merck
Extrato de levedura	–	–	Acumidia
Tripton (caseína hidrolisada)	–	–	Merck
Ágar	–	–	Acumidia
Glicerol	C ₃ H ₅ (OH) ₃	99,8	J. T. Baker

2.3.1. Meios de cultura

O meio Dulbecco modificado (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* ou DMEM) e geneticina foram adquiridos da Corning Cellgro. Penicilina, estreptomicina e L-glutamina foram adquiridas da Gemini Bio-Products. O soro bovino fetal (FBS) foi adquirido de Atlas Biologicals. Solução 100× meio essencial mínimo de amino ácido não essencial e albumina bovina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Tripsina-EDTA (0,25%) foi adquirido da Fisher Scientific CO. Meio opti-MEM foi adquirido da Life Technologies. A composição dos meios de cultura Luria-Bertani (LB), ¹³² 7H9 Middlebrook ¹³³ e DMEM ¹³⁴ é relatada na Tabela 2.

Tabela 2 Componentes dos meios de cultura empregados de acordo com o fabricante para 1,0 L de cada meio líquido

LB		7H9 Middlebrook		DMEM	
Componentes	g L ⁻¹	Componentes	mg L ⁻¹	Componentes	mg L ⁻¹
Extrato de levedura	5,0	Sulfato de amônio	500	Glicose	1400
Triptona	10	Fosfato dissódico	2500	Piruvato de sódio	110
Cloreto de sódio	10	Fosfato monopotássico	1000	Vermelho de fenol	8,15
		Citrato de sódio	100	Hipoxantina	2,0
		Sulfato de magnésio	50	Ácido tióico	0,1
		Cloreto de cálcio	0,50	Ácido lipóico	0,042
		Sulfato de zinco	1,0	Putrescina HCl	0,161
		Sulfato de cobre	1,0	Timidina	0,73
		Citrato de ferro(III) amoniacal	40,0	Ácido linoleico	0,042
		Ácido glutâmico	500	Sais inorgânicos*	3466
		Piridoxina	1,0	Vitaminas**	7061
		Biotina	0,50	Aminoácidos***	1141

* CaCl₂·H₂O, KCl, KH₂PO₄, CuSO₄·H₂O, FeSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O, Na₂HPO₄, Fe(NO₃)₃·9H₂O, NaHCO₃ e MgCl₂·6H₂O.

** Biotina, pantetonato de cálcio, cloreto de colina, ácido fólico, inositol, nicotinamida, niacinamida, piridoxal·HCl, NaCl, piridoxina·HCl, riboflavina, tiamina·HCl e vitamina B12.

*** Alanina, arginina·HCl, asparagina·H₂O, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina·HCl, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

2.3.1.1. Preparo do meio sólido de cultura LB

O meio de cultura utilizado para inóculo das culturas bacterianas foi preparado dissolvendo os componentes do LB listados na Tabela 2, em água destilada, sendo posteriormente esterilizado por 20 min em autoclave.

2.3.1.2. Preparo do meio de cultura 7H9

O meio de cultura 7H9 foi preparado dissolvendo 4,7 g de Difco™ Middlebrook 7H9 Broth (BD) em 900 mL de água ultrapura, sendo posteriormente esterilizada em autoclave. Em seguida, adicionou-se ao meio 100 mL de Middlebrook ADC Enrichment. O pH final do meio é $6,6 \pm 0,2$.

2.3.1.3. Preparo do meio de cultura DMEM

O meio de cultura foi preparado dissolvendo 13,4 g de DMEM em 950 mL de água em temperatura ambiente com agitação lenta. Quando completamente dissolvido, o pH foi ajustado para 4,1 com HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e autoclavado por 15 min. Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado 30 mL de uma solução 7,5 % NaHCO_3 , L-glutamina, antibiótico, sêrum e suplementos. O pH final do meio de cultura foi ajustado para 7,2-7,4 adicionando lentamente soluções de NaOH ou HCl diluídos.

2.3.2. Reativação da cultura bacteriana de *E. coli* DH5 α a partir de estoque

O meio sólido de cultura LA foi utilizado na reativação de 10 μL do estoque de *E. coli* DH5 α . Preparado por meio de uma dissolução de $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de triptona, 10 g L^{-1} de cloreto de sódio e 10 g L^{-1} de ágar em 1,0 L de água destilada, sendo posteriormente esterilizado por 20 min em autoclave.

2.3.3. Preparo da solução salina

A solução salina 0,9% foi preparada dissolvendo 9,0 g de NaCl em 1,0 L de água destilada, sendo posteriormente esterilizada em autoclave.

2.4. Sínteses

O $[\{\text{Na}_6(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (**V₁₀**), ¹³⁵ o $\text{K}(\text{NH}_4)_4[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)]\cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (**V₁₄**) ⁵² e o $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ (**V₁₅**) ⁵³ foram preparados conforme descrito na literatura e estão apresentados na Figura 4 e 9.

2.4.1. Síntese do produto $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]\cdot \text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**V_{18I}**) com manitol (Método I)

Em um balão de fundo redondo foi introduzindo NH_4VO_3 (0,84 g, 7,2 mmol), manitol (0,66 g, 3,6 mmol) e $(\text{Me})_4\text{NI}$ (0,67 g, 3,3 mmol) com 50 mL de água. O sistema foi mantido em refluxo sob agitação magnética por 24 h. A coloração da solução mudou de amarelo para verde-escuro na primeira hora de reação. A solução resultante foi mantida em repouso por quatro dias à 4 °C, formando cristais verde-escuros (**V_{18I}**) como único produto de reação com rendimento de 64,5% baseado em vanádio. O produto foi solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos polares e não polares.

Formulação: $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]\cdot \text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Rendimento baseado em vanádio: 64,5%

2.4.2. Síntese do produto $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (**V_{18P}**) com manitol (Método I)

Em um balão de fundo redondo foram introduzidos NH_4VO_3 (0,84 g, 7,2 mmol), manitol (0,66 g, 3,6 mmol) e KH_2PO_4 (0,11 g, 1,1 mmol) em 30 mL de água. A mistura foi aquecida até ebulição e em seguida, resfriada a temperatura ambiente para o ajuste do pH para 9,4 utilizando KOH (3,0 mol L⁻¹). A reação foi conduzida em refluxo e agitação magnética durante 24 h. A solução mãe foi então mantida em repouso a 4 °C por 7 dias, gerando cristais verde-escuros (**V_{18P}**, rendimento 30%), os quais foram filtrados da solução mãe e secos ao ar.

Formulação: $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$

Rendimento baseado em vanádio: 30%

2.4.3. Síntese do produto $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O\}_n]$ (V₁₈P**) com ácido málico (Método II)**

A reação foi realizada utilizando metodologia semelhante à descrita no item anterior, substituindo o uso do manitol pelo ácido málico (0,482 g, 3,6 mmol) e mantendo os demais reagentes, NH_4VO_3 e KH_2PO_4 , em 30 mL de água. A mistura foi solubilizada com auxílio de aquecimento até ebulição e em seguida, resfriada até a temperatura ambiente para o ajuste do pH para 9,4 com KOH ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi conduzida em refluxo, com agitação magnética, durante 24 h. Sendo observada mudança de coloração de amarelo, para incolor e finalmente para verde-escuro. A solução mãe foi mantida em repouso a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por dois dias, gerando cristais verde-escuros (Produto **V₁₈P**, rendimento 59%), lavados com isopropanol e secos ao ar. O produto **V₁₈P** foi solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos polares e não polares.

Formulação: $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O\}_n]$

Rendimento baseado em vanádio: 59%

2.5. Ensaios biológicos

2.5.1. Avaliação da toxicidade e atividade quimioprotetora dos POVs frente agente alquilante dietilsulfato em cultura de *E. coli*

Estes estudos foram integralmente realizados pela doutoranda no Laboratório de Biologia Molecular da UFPR, em colaboração com o Prof. Emanuel Maltempi de Souza. O efeito de quimioproteção dos POVs contra a ação do dietilsulfato sobre o crescimento de culturas de *E. coli*/DH5 α foi avaliado por meio da adaptação de protocolos padrões pelo nosso grupo de pesquisa.

As células escolhidas como modelo foram a *E. coli* DH5 α , as quais são células de *E. coli* modificada para maximizar a eficiência de transformação/mutação da célula.¹³⁶ No entanto, diferente de outras estirpes não possuem mutações que a tornam mais resistentes a processos de alquilação, o que as torna interessantes no âmbito dos nossos estudos.

Nos ensaios foi considerada a população de células bacterianas suspensas no meio de cultura. A atividade dos compostos foi avaliada por meio da turbidez das suspensões bacterianas e da determinação da densidade óptica a 595 nm (DO_{595}), chamada também de avaliação da turbidimetria. A medida é feita com auxílio de um espectrofotômetro, onde um feixe de luz é parcialmente desviado pelas células presentes no meio e, portanto, a luz não desviada é medida. Essa avaliação permite obter um valor de DO que pode ser correlacionado ao crescimento bacteriano, uma vez que quanto maior o número e/ou tamanho das células em suspensão, maior a turbidez observada.

A curva de crescimento de uma cultura bacteriana, exemplificada na Figura 16, consiste em quatro fases: ¹³⁷

- (i) lag – período de adaptação e atividade metabólica intensa, sem divisão celular;
- (ii) log – processo de divisão com aumento logarítmico;
- (iii) estacionária – número de morte equivale ao número de células novas;
- (iv) morte – a população celular reduz em taxa logarítmica.

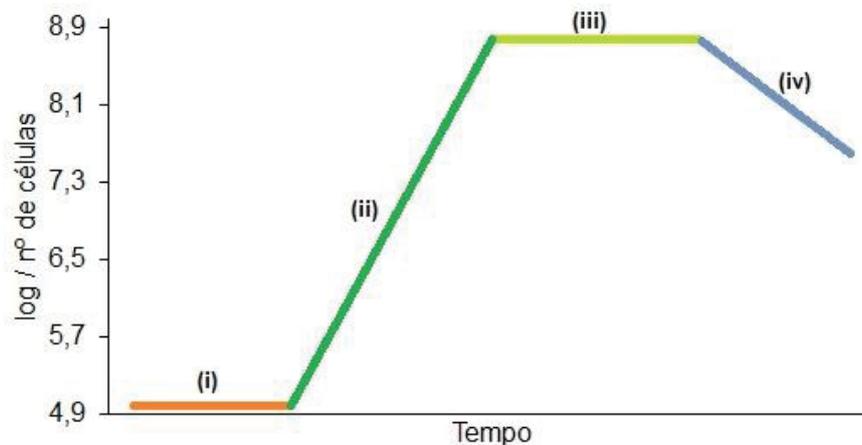


Figura 16 Curva teórica de crescimento de uma cultura bacteriana em meio líquido.
 FONTE: Adaptado de Zwietering, M. H. (1990) ¹³⁷

A medida da DO é realizada ainda na fase log de crescimento exponencial da bactéria, relatada em valores entre 0,60 e 1,0 de densidade óptica. Esse cuidado é necessário, uma vez que, após este ponto o número de células mortas tende a aumentar, gerando imprecisão na medida. Somado a isso, este método não permite distinção entre células viáveis e mortas, fornecendo apenas valores absolutos de células presentes na solução e por esse motivo é utilizada especialmente para confirmar o crescimento de uma cultura celular com base no aumento da DO. ¹³⁸

O comprimento de onda selecionado para determinação da DO corresponde à região em que não há sinais de absorção nos espectros de UV/Vis dos produtos e do meio de cultura. No entanto, foram utilizadas soluções aquosas dos produtos em condições semelhantes às dos ensaios biológicos como controle da densidade óptica. Minimizando, desta forma, a sobreposição entre a absorção da cultura de *E. coli* e as bandas de absorção no espectro eletrônico dos polioxovanadatos.

Os procedimentos foram conduzidos em meio de cultura LB, composição listada na Tabela 1, utilizando alíquotas do estoque da bactéria. As amostras de controle consistem na cultura de *E. coli* em solução salina e meio LB. Os valores de inibição de crescimento (GI_{50}) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows. GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com.

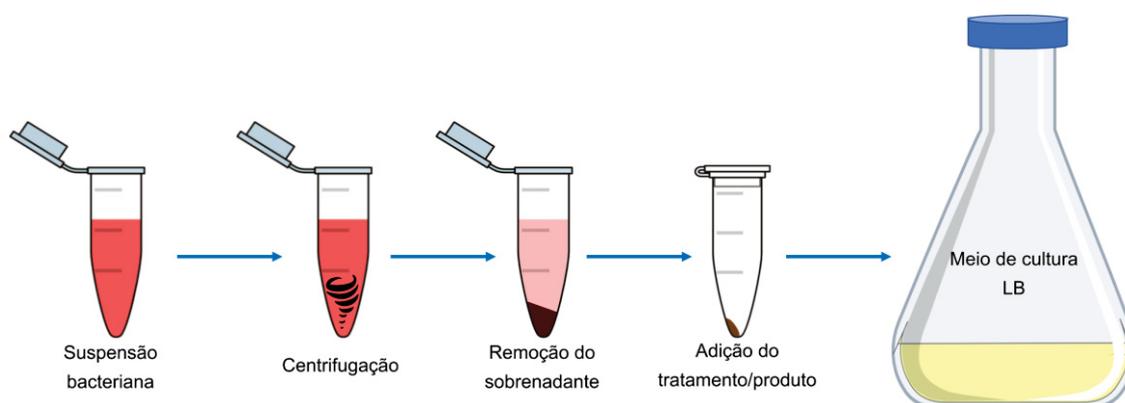
Os valores de crescimento bacteriano foram expressos como médias aritméticas, com desvio padrão calculado para três experimentos independentes. As diferenças entre os múltiplos grupos e os controles, na presença e ausência de dietilsulfato, foram detectadas por *one-way ANOVA* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey usando o GraphPad Prism. Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As formulações dos compostos **V₁₈I** e **V₁₈P** utilizadas para os ensaios biológicos foram selecionadas considerando a junção de todos os resultados de caracterização, apresentados na Seção 4.1, sendo elas $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V_{18}O_{42}I] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$ e $[K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O]_n$, respectivamente.

2.5.1.1. Análise da toxicidade do agente alquilante para as culturas de *E. coli*

Em um procedimento típico, resumido no Esquema 2, o crescimento da bactéria se deu a 37 °C sob agitação (120 rpm) em frascos contendo 10 mL de meio LB e o antibiótico ácido nalidíxico 10 µg mL⁻¹ (armazenado a -20 °C). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi removido e adicionado 1,0 mL de solução salina (0,90% NaCl) ao pellet (aglomerado de partículas gerado pela compressão da suspensão de bactérias após a centrifugação).

As amostras foram incubadas por 15 min e transferidas para frascos com 10 mL de meio LB. Em seguida, as suspensões foram novamente incubadas com agitação a 37 °C e alíquotas foram coletadas de hora em hora e analisadas por turbidimetria.



Esquema 2 Ilustração do esquema geral do método adotado para realização dos ensaios de avaliação do crescimento de culturas bacterianas.

As curvas de inibição do crescimento bacteriano na presença do dietilsulfato (des) também foram preparadas durante o trabalho de mestrado,⁵² conforme descrito acima, incluindo a adição de quantidades crescentes do agente alquilante (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mmol L⁻¹) em suspensão salina. Esse estudo foi realizado para a obtenção da GI₅₀ do agente alquilante para uso como controle nos ensaios de quimioproteção e apresentado na Seção 3.4.1.1.

2.5.1.2. Análise da toxicidade dos POVs para as culturas de *E. coli*

Em um procedimento típico, o crescimento da cultura bacteriana é feito a 37 °C sob agitação (120 rpm) em 10 mL de meio LB e 10 µL do antibiótico ácido nalidíxico 10 µg mL⁻¹ (Na/10). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 2000×g por 2 min, o sobrenadante foi removido e adicionado 1,0 mL de solução salina (0,90% NaCl) ao pellet, que são pequenas partículas criadas pela compressão da suspensão de bactérias.

As curvas de toxicidade foram avaliadas partindo de soluções aquosas dos polioxovanadatos **V₁₈I**, **V₁₈P** e **NaV₁₀** (solução estoque 20 mmol L⁻¹) diluídas diretamente sobre as suspensões salinas da bactéria (0,10; 1,0; 5,0; e 10 mmol L⁻¹). Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 min e transferidas para frascos contendo 5,0 mL de meio LB. Estes foram novamente incubados a 37 °C sob agitação. A DO₅₉₅ foi medida após 3 h.

2.5.1.3. *Análise da atividade quimioprotetora dos POVs*

A análise da atividade quimioprotetora do POV por meio do crescimento celular da suspensão bacteriana foi conduzida de forma similar à mostrada na Seção 3.5.1.1.

Os ensaios de quimioproteção foram realizados a partir de uma suspensão das bactérias em solução salina contendo uma concentração fixa de des (6,0 mmol L⁻¹, GI₅₀) e quantidades crescentes do **V_{18I}**, **V_{18P}** e **V₁₀** (0,10; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; e 10 mmol L⁻¹). As amostras foram incubadas por 15 min e transferidas para frascos contendo 5,0 mL de meio LB. Os quais foram novamente incubados por um período de 3 h a 37 °C com agitação. A DO₅₉₅ foi medida após 3 h para obtenção da curva de crescimento.

2.5.1.4. *Avaliação da reação direta entre os POVs e o agente alquilante*

Estudos da reação direta entre os POVs e o dietilsulfato em água e meio de cultura LB foram realizados para o produto **V_{18I}**, **V_{18P}** e **V₁₀**. Essa etapa visa obter maiores informações sobre o comportamento dos agregados em sistemas complexos, assim como, sobre a forma de ação dessa classe. As amostras foram avaliadas em condições semelhantes às utilizadas nos ensaios biológicos com o auxílio de técnicas espectroscópicas como RPE e RMN ⁵¹V. As amostras foram preparadas solubilizando os compostos selecionados no solvente apropriado em concentração de 5,0 mmol L⁻¹, seguida da adição de quantidades crescentes do agente alquilante.

2.5.2. **Avaliação da toxicidade dos POVs no crescimento de culturas *M. smegmatis***

2.5.2.1. *Análise do efeito dos POVs na inibição do crescimento celular de *M. smegmatis**

O estudo dos polioxovanadatos **V₁₄** e **V₁₅** no crescimento de culturas de *M. smegmatis* foram realizados pelo doutorando Zeyad Arhouma, orientado pela Profa. Debbie C. Crans na CSU, conforme descrito abaixo.

A micobactéria *M. smegmatis* estirpe mc² 155 foi cultivada em meio 7H9 Middlebrook (Tabela 2) suplementado com 10% de OAD (ácido oleico, albumina e dextrose) e 10% de tiloxapol, ¹³³ com um pH final de 6,6±0,2. As culturas foram incubadas

com agitação por 24 h a 37 °C até atingir a fase de crescimento logarítmico com uma densidade óptica de 0,600. O comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}) foi selecionado para minimizar a interferência gerada pelas bandas de absorção do meio de cultura e solução dos compostos.⁵²

O tratamento da cultura micobacteriana de *M. smegmatis* com adição dos polioxovanadatos, **V₁₄** e **V₁₅** foi feito em uma placa de 96 poços. Os POVs foram adicionados utilizando diluições serial de 3 vezes, resultando em concentrações na faixa de 2,0 a 0,00010 mmol L⁻¹. Após 24 h de incubação com agitação a 37 °C, a DO_{600} foi medida e a concentração mínima inibitória de 50% do crescimento bacteriano (IC_{50}) foi calculada com auxílio do software de análise de dados GraFit.

2.5.2.2. *Preparo do sobrenadante da cultura micobacteriana para os estudos espectroscópicos*

O preparo do sobrenadante utilizado nos estudos espectroscópicos foi feito a partir da incubação da cultura da *M. smegmatis* com agitação por 24 h a 37 °C. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 2000×g por 15 min e filtrada para remover qualquer célula remanescente. Uma porção do sobrenadante coletado foi aquecida por 45 min a 80 °C para desnaturar e precipitar as proteínas presentes no meio. O sobrenadante aquecido foi centrifugado nas mesmas condições mencionadas acima, decantado e filtrado para remover as proteínas precipitadas.

2.5.2.3. *Estudos da especiação dos POVs em solução aquosa, meio de cultura e sobrenadante*

Os estudos de especiação foram realizados em diferentes meios – água, meio de cultura 7H9 e sobrenadante, aquecido e não aquecido. Soluções estoque do **V₁₄** e **V₁₅** foram preparadas a 4,0 mmol L⁻¹. Os espectros de RMN foram analisados em 0,20 e 1,0 mmol L⁻¹. As amostras foram então monitoradas em função do tempo, com análises realizadas em 0, 1, 5 e 24 h de incubação a 37 °C, simulando desta forma as condições biológicas. O pH das soluções foi medido imediatamente antes do espectro de RMN.

Os espectros de RPE foram analisados em 1,0 mmol L⁻¹ utilizando 16 scans para que um sinal pudesse ser observado. Experimentos adicionais de RPE foram realizados

para os compostos **V₁₄** e **V₁₅** em 7H9 a 77 K em concentração de 1,0 mmol L⁻¹ em tempos de 0, 1, 5 e 24 h. Esse estudo foi realizado visando à obtenção de sinais de maior intensidade nos espectros de RPE para avaliação do comportamento das espécies polinucleares em condições similares as do ensaio biológico.

A avaliação das espécies formadas em solução do **V₁₅** também foi realizada na presença de solução concentrada de citrato e fosfato, dois dos componentes do meio de cultura 7H9. Para isso, as soluções aquosas de ácido cítrico e KH₂PO₄, 10 mmol L⁻¹, foram preparadas e aquecidas até completa dissolução dos sólidos. As amostras para RMN de ⁵¹V foram preparadas adicionando 500 µL da solução estoque de ácido cítrico ou KH₂PO₄ a 500 µL da solução estoque de 10 mmol L⁻¹ do **V₁₅**.

2.5.3. Avaliação do efeito dos POVs na camada lipídica de células CHO

Os estudos de avaliação da interação do **V₁** e dos polioxovanadatos **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** com membranas de células CHO foram realizados em parceria com o grupo da professora Deborah Roess da CSU, onde foram feitos os estudos biológicos incluindo:

- (i) Viabilidade celular de culturas de células CHO;
- (ii) Efeito no ordenamento da membrana celular;
- (iii) Extensão da agregação do receptor hormonal luteinizante (LHR);
- (iv) Níveis de adenosina monofosfato cíclica intracelular (cAmp).

Esses ensaios foram realizados pela doutoranda Duaa Althumairy, orientada pela profa. Deborah A. Roess na CSU e terão seus métodos descritos brevemente nas seções abaixo (versão estendida no Apêndice 1).

O estudo da reatividade dos POVs no meio de cultura DMEM e em solução aquosa pH 7,4 também foram realizados, utilizando as técnicas espectroscópicas de RMN de ⁵¹V, na CSU, e de RPE na UFPR.

2.5.3.1. Análise da viabilidade celular dos POVs

As soluções-estoque de 10 mmol L⁻¹ dos produtos **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** foram preparadas no momento do experimento dissolvendo os compostos em água e

adicionando em seguida tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) de pH 7,3, contendo 1,0 e 0,50 mmol L⁻¹ de CaCl₂ e MgCl₂, respectivamente.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados utilizando fluorimetria à base de resazurina, o qual conta o número de células viáveis em um volume fixo de células. Para isso, foram utilizadas diluições seriais do **V₁** e dos POVs **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** em meio DMEM. Os resultados são mostrados como uma média dos experimentos realizados em triplicata usando regressão não linear com três parâmetros.

Os gráficos foram preparados com auxílio do programa GraphPad Prism 8. A concentração dos compostos usadas nos experimentos subsequentes foi escolhida de forma a ser menor ou igual ao equivalente da IC₇₅ de cada composto, como sendo 10, 2,0, 4,0 e 6,0 μmol L⁻¹ para **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**, respectivamente.

2.5.3.2. *Análise do efeito dos compostos na ordem da membrana lipídica*

Para avaliar o efeito dos POVs na ordem da membrana lipídica, células CHO não transfectadas foram cultivadas até 80-90% de confluência da monocamada de células no frasco de cultura com 1,0 mL de tripsina-EDTA (0,25%) por 3 min. As células foram semeadas e após 12 h, foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com meio contendo tratamento com **V₁**, **V₁₀** ou **V₁₅**.

O controle foi imediatamente tratado com 200 μL da sonda di-4-ANEPPDHQ (1,5 μmol L⁻¹) por 15 min, lavado e imerso em PBS para leitura em um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera Andor Du897E EMCCD.¹²⁰ Os demais frascos, com **V₁**, **V₁₀** ou **V₁₅** no meio, foram incubados por 10 h. Nos tempos indicados, os frascos foram removidos da incubadora, lavados uma vez com PBS e ressuspensos no meio livre de soro, com leituras feitas em 0, 1, 2, 6, e 24 h após a adição da sonda.

2.5.3.3. *Análise do efeito dos compostos na agregação do LHR*

A extensão da agregação do LHR foi avaliada usando métodos transferência de energia de ressonância de fluorescência homo (homo-FRET). O crescimento e tratamento das células CHO foi realizado conforme descrito no primeiro parágrafo do item anterior, usando linhagens celulares expressando 10000, 32000, 122000 ou 560000 LHR por célula.¹²⁰ Esses LHR foram marcados com uma proteína fluorescente amarela

(eYFP, do inglês *enhanced Yellow Fluorescent Protein*) para fornecer um sinal de fluorescência quando o doador eYFP e o aceitador eYFP ligados ao LHR estão dentro de 2 a 10 nm um do outro.¹³⁹

As imagens do homo-FRET foram coletadas usando um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 M com uma câmera Andor Du897E EMCCD e programa MetaMorph. Cerca de 5 a 7 células foram examinadas de cada placa e pelo menos 30 células foram examinadas para cada tratamento. Assumimos que o LHR monomérico marcado com eYFP exibiu o valor de anisotropia intrínseca de um único fluoróforo e definimos como 0,38.¹⁴⁰ Os resultados do homo-FRET foram expressos como média das medidas realizadas e a avaliação estatística foi analisada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey e o teste t de Student usando R versão 3.3.1. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.5.3.4. *Análise do efeito dos compostos nos níveis de cAMP intracelular*

Os ensaios de fluorescência de cAMP foram feitos usando um marcador do tipo ICUE (indicador de cAMP), expresso em células CHO fornecido pelo Dr. Jin Zhang.¹⁴¹ Imagens foram adquiridas com uso de PBS para estabelecer os níveis basais de cAMP intracelular. Em seguida, o meio celular foi trocado por soluções contendo 100 nmol^{-1} hCG, 10, 2,0, 4,0 ou 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**, respectivamente, por 15 min.

As imagens foram adquiridas usando um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M com uma câmera Andor Du897E EMCCD com filtros da Chroma Technology, e programa MetaMorph. Os dados foram analisados usando o programa Image J. Para cada placa, 2 a 5 células foram observadas e os dados foram coletados de pelo menos 15 células para cada tratamento.

2.5.3.5. *Estudos da especiação dos POVs no meio de cultura celular*

Os estudos de especiação foram realizados em duas condições, água com pH ajustado para 7,0 e meio de cultura DMEM (Tabela 2). Soluções estoque dos POVs **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** foram preparadas a $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os espectros de RMN de ^{51}V e RPE foram analisados em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para o RPE os espectros apresentados foram obtidos utilizando a soma de 16 scans para que um sinal de baixa intensidade pudesse ser observado. As amostras foram então monitoradas em função do tempo, com análises realizadas em 0, 3, 10 e 24 h, simulando desta forma as condições biológicas. O pH das soluções foi medido imediatamente antes do espectro de RMN ser registrado.

Experimentos adicionais de RPE foram realizados para os compostos **V₁₄** e **V₁₅** em DMEM a 77 K em concentração de 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹ em tempos de 0, 3 e 24 h. Esse estudo foi realizado visando a obtenção de sinais de maior intensidade nos espectros de RPE para avaliação do comportamento das espécies polinucleares em condições similares as do ensaio biológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem muitos estudos na área de química inorgânica medicinal envolvendo polioxometalatos, a grande maioria dos trabalhos com polioxovanadatos (POV) são baseados no ânion decavanadato e em seus derivados orgânicos/inorgânicos. Já a química medicinal dos polioxovanadatos de valência mista (POV-VM) ainda é muito recente e carece do desenvolvimento de novos membros desta classe que possam ser sintetizados por metodologias mais simples do que as anteriormente descritas.

Apesar do grande número de trabalhos que realizam a descrição estrutural dos POV-VM, pouco se sabe sobre a estabilidade e a natureza química destas espécies em solução. Ainda mais raros são os estudos que correlacionam dados estruturais, atividade biológica e estudos de identificação de espécies químicas em solução, mesmo que os POV-VM possuam os dois estados de oxidação mais comuns do vanádio em meio biológico em uma única estrutura.

No desenvolvimento desta tese buscou-se contribuir para a química medicinal dos POV-VM em suas diferentes fronteiras. As diferentes abordagens foram desenvolvidas em uma escala cronológica que não corresponde a ordem de apresentação dos dados. Diante da diversidade de sistemas avaliados e dos diferentes níveis de complexidade químico/biológico alcançados, optou-se por apresentar a Seção de Resultados e Discussão em três partes distintas conforme apresentado abaixo:

Parte 1: *Síntese e caracterização de novos membros da classe dos polioxovanadatos de valência mista e avaliação da atividade quimioprotetora previamente relatada para o $[V_{15}O_{36}Cl]^{6-}$ (V_{15}).*

A Seção 3.1 descreverá a síntese e caracterização no estado sólido de dois novos POVs pseudoesféricos do tipo $\{V_{18}O_{42}X\}^{n-}$ (onde X corresponde ao ânion encapsulado), seguido do estudo de estabilidade dos POVs em solução aquosa.

A Seção 3.2 apresentará os resultados de citotoxicidade dos POVs do tipo $\{V_{18}O_{42}X\}^{n-}$ em culturas de *E. coli* e o estudos de quimioproteção empregando o sistema modelo previamente desenvolvido pelo grupo *E. coli*/ dietilsulfato.

A Seção 3.2.4 abordará a identificação das espécies químicas presentes no meio de cultura Luria-Bertani (LB).

Parte 2: *Ampliação do número de sistemas biológicos avaliados em sua interação com os POVs $[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)]^{5-}$ (V_{14}) e V_{15} , anteriormente descritos pelo grupo, contribuindo para o desenvolvimento do estado da arte no que diz respeito a ação antimicrobiana.*

A Seção 3.3 corresponde a uma expansão dos sistemas anteriormente avaliados (V_1 , V_{10}) na inibição de crescimento de culturas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, e apresenta os resultados da avaliação da atividade dos primeiros polioxovanadatos de valência mista em culturas de *M. smegmatis*.

A Seção 3.3.3 discutirá a identificação das espécies químicas presentes no meio de cultura 7H9 Middlebrook.

Parte 3: *Avaliação dos efeitos da interação de polioxovanadatos com a membrana de células de mamíferos.*

Na Seção 3.4 será apresentado brevemente, pela primeira vez, o efeito que oxocompostos de vanádio do tipo V_1 , V_{10} , V_{14} e V_{15} causam na camada lipídica de células de ovário de hamster chinês (CHO).

A Seção 3.4.4 discutirá a identificação das espécies químicas presentes no meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM).

A identificação das múltiplas espécies de vanádio presentes em solução aquosa é crucial para o entendimento do modo de ação e efeito apresentado por esta classe de compostos. Para esse fim, foram empregadas as técnicas espectroscópicas de RMN de ^{51}V , para estudar as espécies de V^V , e de RPE, para estudar as espécies de V^{IV} e de

valência mista (V^{IV}/V^V) formadas nas condições avaliadas. Os dados espectroscópicos registrados nos diferentes meios de cultura foram discutidos a luz dos resultados biológicos obtidos na UFPR e em colaboração com a Profa. Debbie C. Crans (CSU, USA).

3.1. Síntese e caracterização dos POVs do tipo $\{V_{18}O_{42}X\}^{n-}$

As sínteses dos POVs do tipo $\{V_{18}O_{42}X\}^{n-}$ realizadas nesse trabalho foram programadas para obtenção de polioxoânions de valência mista contendo diferentes ânions encapsulados, por um processo similar ao apresentado na Figura 5. A rota empregada foi adaptada de trabalhos anteriores que relatam a síntese de $K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ (**V14**) e do $[(CH_3)_4N]_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ (**V15**) em bons rendimentos.^{52, 53} A literatura relata que a nuclearidade do agregado é dependente do raio e da carga do ânion encapsulado, no entanto nossos estudos preliminares apontaram também para uma dependência da temperatura e pH empregado nas reações com fosfato, rendendo POVs contendo 14 ou 18 centros de vanádio.

Para a obtenção de novos POVs foi empregado NH_4VO_3 como material de partida de vanádio(V), manitol ou ácido málico como agente redutor e um sal do ânion a ser encapsulado $(CH_3)_4NI$, para variar Cl^- (raio 1,81 Å) por I^- (raio 2,06 Å) e KH_2PO_4 (raio 1,95 Å) para racionalizar o efeito das condições de reação sobre a nuclearidade dos POVs contendo fosfato. A mudança de coloração observada durante a reação do **V18I** foi de amarelo-claro para verde-escuro, enquanto do **V18P** muda de amarelo, para transparente e por fim verde-escuro, indicando a ocorrência da redução, mesmo que parcial, dos centros de vanádio(V) para vanádio(IV). Destas reações foram isolados cristais verdes muito escuros que foram denominados **V18I** e **V18P**, respectivamente.

3.1.1. Difractometria de raios X de monocristal

Cristais de tamanho e formato apropriados para análise de DRX-monocristal foram obtidos para os produtos **V18I** e **V18P**, os quais foram identificados como sendo dois polioxovanadatos pseudoesféricos contendo 18 centros de vanádio, cada um contendo um oxigênio terminal e ligados entre si por grupos oxo em ponte (Figura 17). Os parâmetros de coleta e dados dos cristais estão apresentados na Tabela 3.

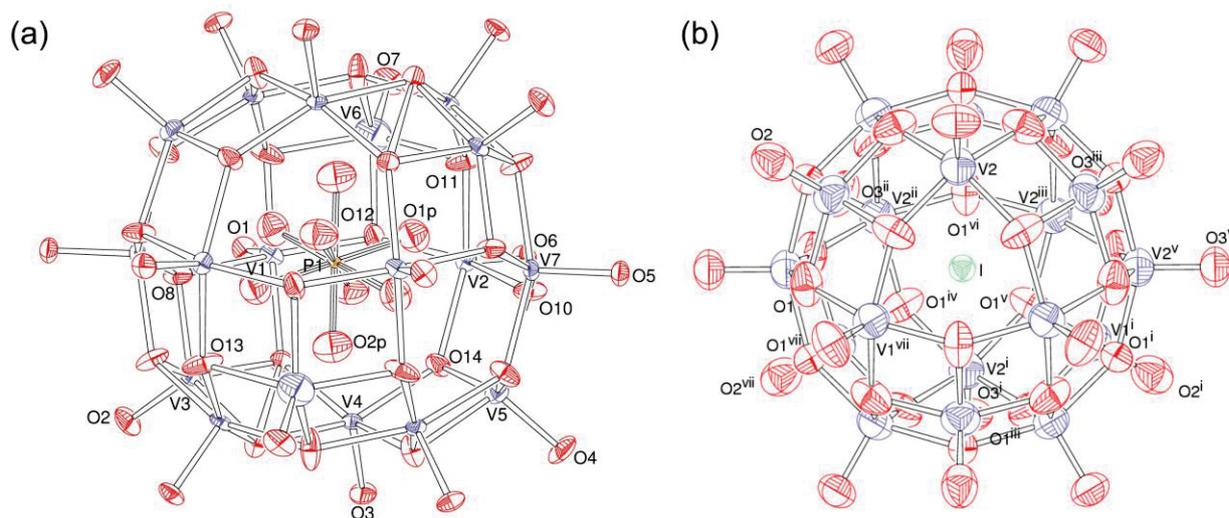


Figura 17 Representação ORTEP e esquema de numeração dos átomos da estrutura dos ânions (a) $V_{18}P$, contendo um fosfato desordenado encapsulado, e (b) $V_{18}I$, com iodeto encapsulado. Os contraíons e átomos de oxigênio das moléculas de água foram omitidos para maior clareza. Os elipsoides térmicos foram desenhados de forma a compreender 30% da densidade de probabilidade eletrônica em cada átomo.

Tabela 3 Dados cristalográficos e de refinamento para os produtos $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ ($V_{18}P$) e $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V_{18}O_{42}I] \cdot 5H_2O$ ($V_{18}I$)

	$V_{18}P$	$V_{18}I^*$
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, I2/m	Cúbico, Fm-3m
Temperatura / K	297(2)	100(2)
a/ Å	14,8293(9)	19,4906(8)
b/ Å	10,9728(6)	19,4906(8)
c/ Å	16,0971(16)	19,4906(8)
$\alpha = \gamma / ^\circ$	90	90
$\beta / ^\circ$	90,947(2)	90
Volume / Å ³	2618,9(3)	7404,2(9)
Z, densidade calculada / mg/m ³	2; 2,747	4; 1,550
F(000)	2100	3260
Coefficiente de absorção / mm ⁻¹	3,686	2,631
Comprimento de onda / Å	0,71073	0,71073
No difratômetro:		
$\theta / ^\circ$	3,4 a 27,5	3,0 a 27,5
Índices limitantes	-19 ≤ h ≤ 19; -14 ≤ k ≤ 14; -20 ≤ l ≤ 20	-25 ≤ h ≤ 25; -25 ≤ k ≤ 25; -25 ≤ l ≤ 25
Completude para $\theta = 25,2^\circ$	99,6%	99,5
Reflexões coletadas / únicas	59705 / 3156 [R _{int} = 0,052]	70276 / 481 [R _{int} = 0,043]
No. de reflexões 'observadas' [I > 2 σ (I)]	2705	436
Estrutura determinada por	Métodos duplos, SHELXT	Fase intrínseca, SHELXT
Refinamento:		
Dados / restrições / parâmetros	3156 / 0 / 225	481 / 0 / 23
Qualidade de ajuste no F ²	1,121	3,921
Índice R final ('observados')	R1 = 0,095, wR2 = 0,273	R1 = 0,218, wR2 = 0,630
Índice R final	R1 = 0,106, wR2 = 0,279	R1 = 0,226, wR2 = 0,654
Coefficiente de extinção	n/a	n/a
Maior diferença pico-buraco / e.Å ⁻³	2,18 e -3,70	9,57 e -2,82
Localização da maior diferença de pico	Próximo à O(4w)	N
Reflexões:		
$w = [\sigma^2(F_o^2) + (0,1388 * P)^2 + 106,1464 * P]^{-1}$ onde $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$ para $V_{18}P$		

*Dados de refinamento apresentados para $V_{18}I$ não atingiram a completude devido à alta desordem apresentada pelo sistema (Ver discussão na seção 4.1.1.2).

3.1.1.1. Caracterização estrutural do $V_{18}P$

A estrutura polimérica do $V_{18}P$, $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$, é composta por agregados polinucleares interligados entre si, decorados com 6 aquocomplexos de potássio (Figura 18) e moléculas de água de cristalização também estão presentes na unidade de repetição. A estrutura do polioxoânion mostra 3 tipos estruturais de vanádio, dois apicais, oito no anel externo e oito átomos no anel interno arranjados como $(1 \times V):(4 \times V):(8 \times V):(4 \times V):(1 \times V)$, apresentados na Figura 18b.

Os detalhes sobre a coleta de dados, refinamento, comprimentos de ligação e ângulos selecionados são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os comprimentos de ligação registrados para o polioxoânion $V_{18}P$ estão na mesma faixa descrita para outros compostos do tipo octadecavanadato(IV/V).^{29; 142; 143}

Os fosfatos encapsulados no centro da estrutura de cada POV estão desordenados. O átomo de fósforo no centro da estrutura é encontrado em conformação quadrupla tetragonal, com restrições de fator de ocupação de 0,25. Consequentemente, os dois oxigênios cristalograficamente independentes do fosfato geram por simetria um total de oito átomos de oxigênio em um cubo. Este compreende duas unidades de PO_4 tetraédricas sobrepostas e relacionadas por um centro de simetria no átomo de fosfato, com comprimentos de ligação P–O(1P) de 1,553(11) Å e P–O(2P) de 1,530(12) Å.

Os átomos de oxigênio do fosfato ainda estão ligados ao V(2) com tamanho de ligação V–O de 2,441(2) Å, enquanto que as menores distâncias de ligação entre o oxigênio não ligante, O(2P), e os centros de vanádio é O(2P)–V(2) e O(2P)–V(1) de 2,470 e 2,483 Å, respectivamente.

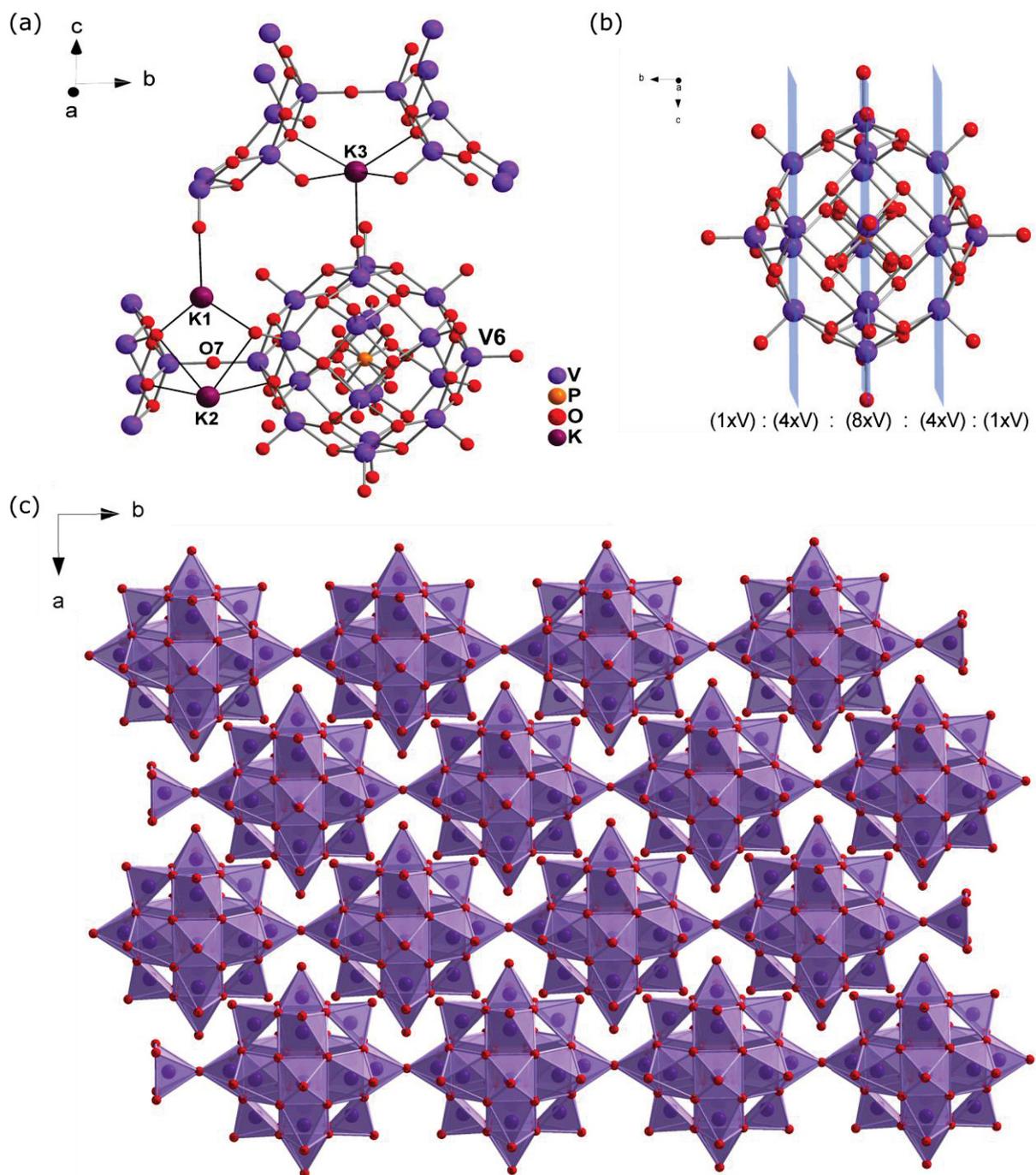


Figura 18 (a) Coordenação dos cátions potássio pelos agregados $V_{18}P$; (b) Representação da estrutura do $V_{18}P$ evidenciando os tipos de vanádio pelos planos que passam através dos oito no anel externo e oito átomos no anel interno arranjados em $(1 \times V):(4 \times V):(8 \times V):(4 \times V):(1 \times V)$. (c) Empacotamento das cadeias do polioxoânion $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ ($V_{18}P$), visto no plano ab , no qual os contraíons e moléculas de água de cristalização foram omitidos para maior clareza. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja, potássio em púrpura e os planos em azul.

A estrutura do $V_{18}P$ apresenta ainda três cátions de potássio cristalograficamente independentes; esses interagem com os átomos de oxigênio dos polioxoânions com comprimento de ligação em uma faixa de 2,624 a 3,062 Å (Tabela 5), semelhante aos relatados na literatura.¹⁴⁴

A esfera de coordenação de cada potássio é preenchida por moléculas de água (Figura 19), para as quais os hidrogênios não puderam ser adequadamente refinados, podendo estar envolvidas em uma rede de ligações de hidrogênio com os grupos oxo do POV e outras moléculas de água da rede.

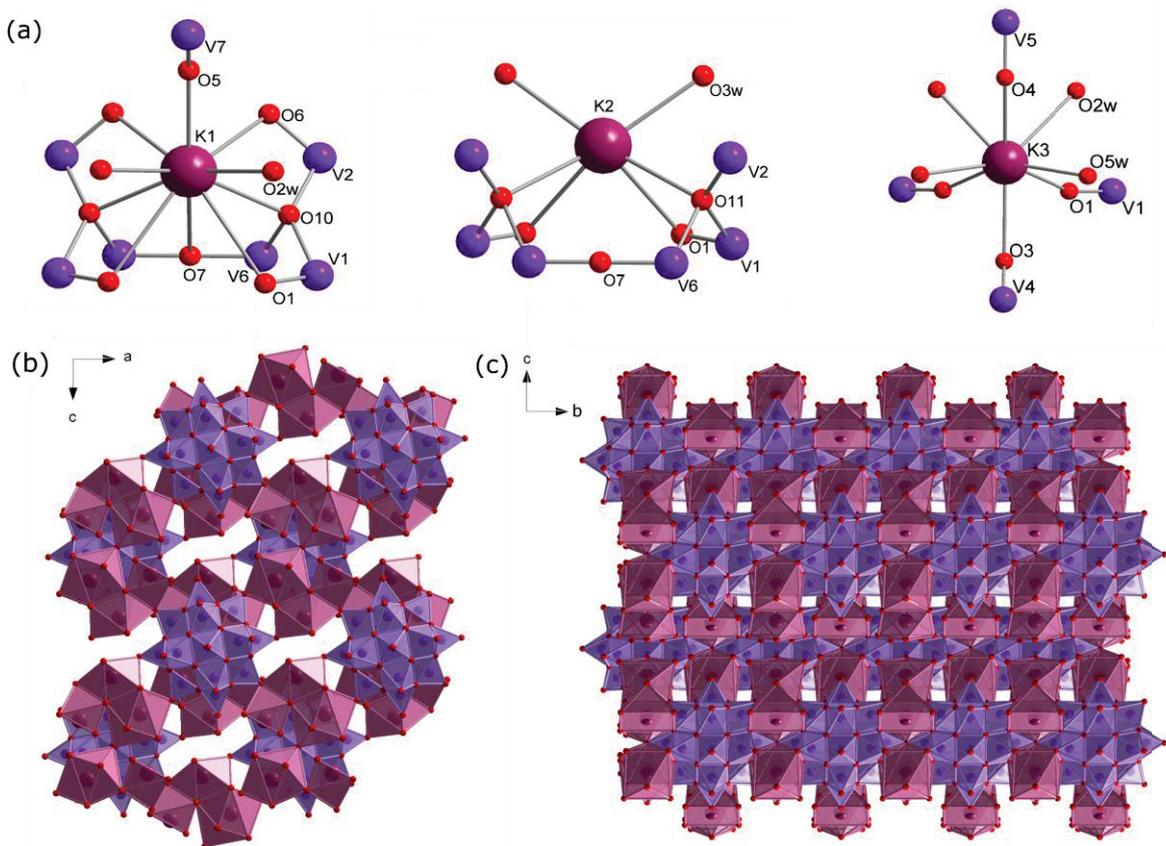


Figura 19 (a) Representação do ambiente de coordenação do cátion potássio. Em (b) e (c) é apresentada a estrutura 3D do $[\{K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 2,6H_2O\}_n]$ ($V_{18}P$) em poliedros, formada pelos grupos oxo do POV, íons de potássio e moléculas de água visto nos planos ac e bc , respectivamente. Os átomos de vanádio são mostrados em lilás, oxigênio em vermelho e potássio em púrpura.

Tabela 5 Comprimentos de ligação (Å) envolvendo os cátions potássio e átomos de oxigênio do agregado $[V_{18}O_{41}(PO_4)]^{6-}$ ($V_{18}P$)

Comprimento de ligação / Å					
K(1)–O(11)	2,770	K(2)–O(6)	3,062	K(3)–O(2)	2,766
K(1)–O(1)	3,023	K(2)–O(10)	2,823	K(3)–O(6)	2,840
K(1)–O(3)	2,750	K(2)–O(5)	2,948	K(3)–O(5)	2,917

Para verificar a geometria dos centros de vanádio no **V₁₈P** foi avaliado o parâmetro estrutural (τ),¹⁴⁵ no qual pode se determinar se a geometria dessas unidades se aproxima de bipirâmide trigonal ou de pirâmide de base quadrada pelo uso da Equação 5. O valor de τ pode variar de 0 a 1, onde o valor zero é referente à geometria pirâmide de base quadrada e o valor 1 corresponde à geometria de bipirâmide trigonal.

$$\tau = \frac{(\beta - \alpha)}{60} \quad \text{[Equação 5]}$$

β = primeiro maior ângulo

α = segundo maior ângulo da esfera de coordenação

O resultado obtido para o **V₁₈P** mostrou que todos os centros de vanádio em sua estrutura possuem uma coordenação aproximadamente piramidal de base quadrada, com τ muito próximo a zero. Os íons metálicos do agregado estão ligados por átomos de oxigênio em ponte do tipo (μ_3 -O) com comprimento de ligação médio de 1,922(8) Å, o qual está na mesma faixa descrita para outros agregados do tipo {V₁₈O₄₂X}.¹⁴⁶ O comprimento de ligação da porção vanadil também se encontra na faixa esperada para POVs (valor médio de 1,611(9) Å).

Uma característica particular da estrutura do **V₁₈P** é a presença de uma ponte oxo (μ_2 -O) conectando os agregados polinucleares por meio de ligações lineares entre V(6)–O(7)–V(6)ⁱ. Essa ligação resulta em um polímero unidimensional formado por unidades de {V₁₈O₄₂(PO₄)} que se estende ao longo do eixo *b* (Figura 18c). O comprimento de ligação do V(6)–O(7) é de 1,624(4) Å, mais curto do que o valor descrito para uma estrutura de características semelhantes, de 1,713(6) Å, a qual dá origem a um polímero tridimensional de fórmula Na₆[V₁₈O₃₉(PO₄)]₂·H₃PO₄·31H₂O (Figura 20).¹⁴⁶

Ânions discretos {V₁₈O₄₂(PO₄)^{x-} relatados na literatura^{41, 62} apresentam geometrias mais distorcidas para os centros de vanádio, com valores de τ variando de 0,0 a 0,50 no mesmo ânion. Em resumo, a gaiola do **V₁₈P** descrito neste trabalho está mais próxima da forma esférica, porque aqui as distâncias entre os centros opostos de vanádio na gaiola são mais semelhantes entre si do que as observadas nos análogos discretos.

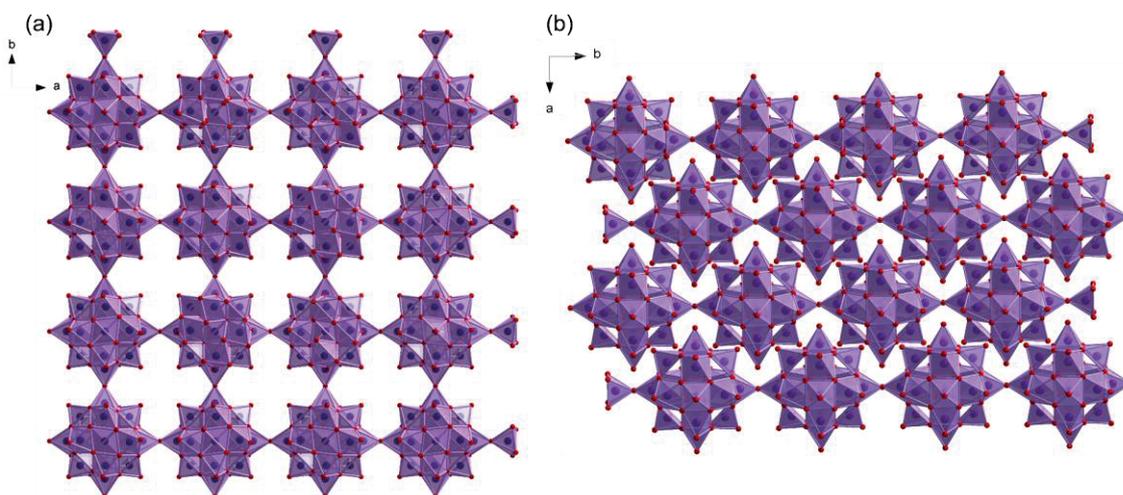


Figura 20 Comparação entre as estruturas estendidas de poliedros do (a) polímero tridimensional $\text{Na}_6[\text{V}_{18}\text{O}_{39}(\text{PO}_4)]_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 31\text{H}_2\text{O}$ relatado por Yang, W. (2003) e do (b) **V₁₈P** $([\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 2,6\text{H}_2\text{O}\}_n])$.¹⁴⁶

A caracterização estrutural do produto **V₁₈P** via DRX-monocristal indica a presença de 14,6 moléculas de água na estrutura do agregado. No entanto, as análises elementares realizadas para a amostra (Tabela 6) indicam a presença de 16 moléculas de água, relativa possivelmente a alterações da proporção de moléculas de água presentes em diferentes cristais da amostra. E desta forma, optou-se por utilizar a formulação $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$, considerando 16 moléculas de água de hidratação nos demais experimentos deste trabalho.

Tabela 6 Resultados de análise elementar e dosagem de metal para o produto **V₁₈P**

Análise elementar/ %	H	K	V	P
Experimental	1,21	10,48	41,78	1,17
$[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 2,6\text{H}_2\text{O}\}_n]$ – calc. DRX	1,36	10,83	42,35	1,43
$[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ – calc.	1,47	10,71	41,86	1,41

3.1.1.2. Caracterização estrutural do **V₁₈I**

Os cristais verde-escuros obtidos para o **V₁₈I**, Figura 17b) apesar de serem adequados para DRX-monocristal apresentaram um refinamento estrutural bastante complexo. Devido à alta simetria do grupo espacial, cúbico

Fm-3m, e do alto grau de desordem presente nos cátions amônio e nas moléculas de água de hidratação, os dados do **V₁₈I** não puderam ser modelados satisfatoriamente. Supondo-se que é provável que esses cátions e moléculas de água, assim como o {V₁₈O₄₂I} estejam em posição especial, ou seja, sobre um elemento de simetria, o que dificulta ainda mais o refinamento. Os cátions tetrametilamônio e moléculas de água ainda favorecem significativamente a formação de ligações de hidrogênio entre todas as entidades químicas presentes na célula unitária, tornando difícil a diferenciação das espécies.

A estrutura do agregado {V₁₈O₄₂I}^{x-} é bem definida e composta por 18 grupos vanadila, com 42 grupos oxo (μ-O, μ₃-O) fazendo as pontes entre os centros de vanádio e um ânion iodeto encapsulado no centro do agregado (Figura 17b), arranjado de forma similar ao **V₁₈P**. A estrutura do **V₁₈I** é análoga a de agregados do tipo {V₁₈O₄₂I}ⁿ⁻ (com n = 5, 11, 13) descritos com um arranjo D_{4d} por Müller e colaboradores.²⁹ Como um diferencial, o **V₁₈I** foi sintetizado a partir de condições brandas por meio de uma reação do tipo ‘one-pot’ entre manitol, NH₄VO₃ e Me₄NI, enquanto os procedimentos de obtenção desses compostos descritos na literatura geralmente envolvem mais de uma etapa de reação.

A estrutura do **V₁₈I**, contudo, não foi completamente refinada de forma que um conjunto de análises foi utilizado para desenvolver uma proposta de formulação. Primeiramente, propôs-se que a estrutura do POV é balanceada por dois ânions amônio e cinco tetrametilamônio, como contraíons, e cinco moléculas de água de cristalização – (NH₄)₂(Me₄N)₅[V₁₈O₄₂I]·5H₂O. No entanto, os resultados de análise elementar (Tabela 7) indicam uma formulação distinta da proposta.

Tabela 7 Resultados de análise elementar e dosagem de metal para o produto **V₁₈I**

Análise elementar/ %	H	C	N	I	V
Experimental	3,47	11,85	4,27	10,24	37,73
(NH ₄) ₂ (Me ₄ N) ₅ [V ₁₈ O ₄₂ I]·5H ₂ O – calc. (DRX)	3,55	10,86	4,43	5,74	41,44
(NH ₄) ₂ (Me ₄ N) ₅ [V ₁₈ O ₄₂ I]·Me ₄ NI·5H ₂ O – calc.	3,76	11,94	4,64	10,52	37,99

A análise elementar apresentou valores elevados para a quantidade de iodo e de carbono presentes na amostra, nos levando a considerar a presença de uma impureza no produto final obtido. Desta forma, considerou-se a presença de uma molécula do sal de partida Me_4NI como impureza nos cálculos de análise elementar (Tabela 7), obtendo assim a formulação $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]\cdot\text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e uma boa correlação entre os valores calculados e experimentais.

O resultado de análise elementar se mostrou reproduzível em duas medidas realizadas em amostras de sínteses independentes. Portanto, supõe-se que a impureza de iodo pode estar ocluída nos cristais. Exemplos de octadecavanadatos contendo moléculas de solvente ocluídas em suas estruturas são relatados na literatura, como o $\text{K}_{10}[\text{H}_3\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{Br}]\cdot 0,5\text{N}_2\text{H}_4\cdot 13\text{H}_2\text{O}$ ²⁹ e o $\text{Na}_6[\text{V}_{18}\text{O}_{39}(\text{PO}_4)]_2\cdot\text{H}_3\text{PO}_4\cdot 31\text{H}_2\text{O}$.¹⁴⁶

3.1.1.3. Comparação estrutural entre os polioxovanadatos $\mathbf{V}_{18}\mathbf{I}$ e $\mathbf{V}_{18}\mathbf{P}$

A estrutura da gaiola $\{\text{V}_{18}\text{O}_{42}\}$ é construída a partir de unidades $\{\text{O}=\text{VO}_4\}$ com um diâmetro de normalmente *ca.* 11 Å, podendo adotar simetrias ligeiramente diferentes, como a idealizada T_d , D_{4d} , D_{4v} ou até mesmo D_{4h} .¹⁴⁷

Analisando os produtos $\mathbf{V}_{18}\mathbf{I}$ e $\mathbf{V}_{18}\mathbf{P}$ e suas estruturas (Figura 17 e 21), observou-se que o $\mathbf{V}_{18}\mathbf{I}$ possui uma estrutura mais simétrica em D_{4d} e um diâmetro de gaiola de 7,54 Å entre centros de vanádio opostos na estrutura pseudoesférica e uma variação de 10,6 a 10,8 Å no diâmetro total; enquanto o $\mathbf{V}_{18}\mathbf{P}$ apresenta uma simetria D_{4h} com um maior faixa de variação no diâmetro total da gaiola de 10,3 a 11,1 Å e distância entre centros de vanádio opostos na estrutura de 7,72 Å.

Essa diferença pode ser atribuída a presença de ânions diferentes encapsulados em cada gaiola, uma vez que, o $\mathbf{V}_{18}\mathbf{P}$ possui uma cavidade de 7,11 a 7,16 Å e encapsula um ânion também maior, nesse caso o fosfato (3,06 Å). Para comparação, a cavidade observada para o \mathbf{V}_{14} , que também encapsula um fosfato e apresentou baixa estabilidade em solução aquosa, é de 7,00 a 7,07 Å com um fosfato de diâmetro 2,51 Å.

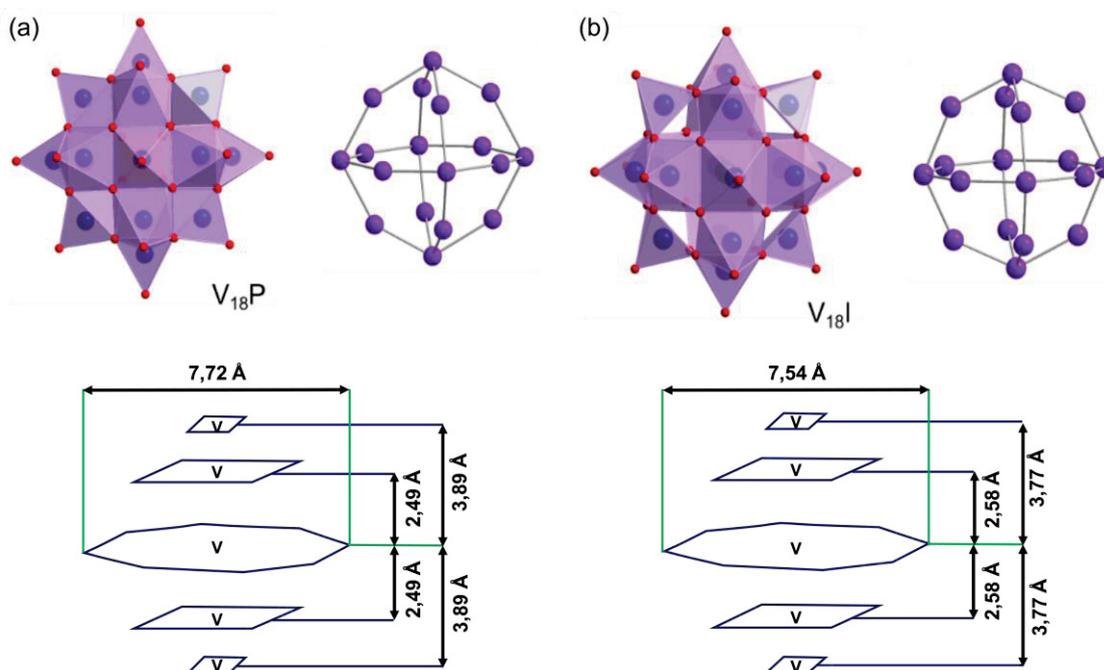


Figura 21 Representação das estruturas dos POVs (a) $V_{18}P$ e (b) $V_{18}I$ em poliedro, como representação topológica do esqueleto de vanádio dos POVs e a planificação do esqueleto de vanádio mostrada abaixo.

Na estrutura do $V_{18}I$, a cavidade possui um tamanho similar (7,31 Å) à do $V_{18}P$, porém com um ânion menor encapsulado. As distâncias entre os átomos de vanádio em lados opostos da estrutura não variam entre si, possivelmente devido a maior uniformidade estrutural gerada pelo ânion discreto iodeto, com raio de 2,06 Å, em contraste com a molécula de fosfato no $V_{18}P$. De forma comparativa, o V_{15} apresentou o menor tamanho de cavidade (6,34 a 6,76 Å) e o menor ânion encapsulado (Cl^- raio 1,81 Å). Da mesma forma, ao analisar os ângulos V–O–V em ambas as estruturas, podemos observar que o $V_{18}P$ apresenta, mais uma vez, maior variação nos valores do que observado para o $V_{18}I$.

3.1.2. Caracterização por técnicas de espectroscopias vibracionais (IV e Raman)

Os produtos **V₁₈I** e **V₁₈P** foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espalhamento Raman. Os espectros IV do **V₁₈I** e do **V₁₈P** apresentaram bandas características de polioxovanadatos atribuídas a $\nu(\text{V-O})$, $\delta(\text{V-O-V})$ e $\nu(\text{V-O-V})$, assim como uma banda intensa referente aos estiramentos $\nu(\text{V=O})$ de vanadila terminal (Figura 22, Tabela 8).

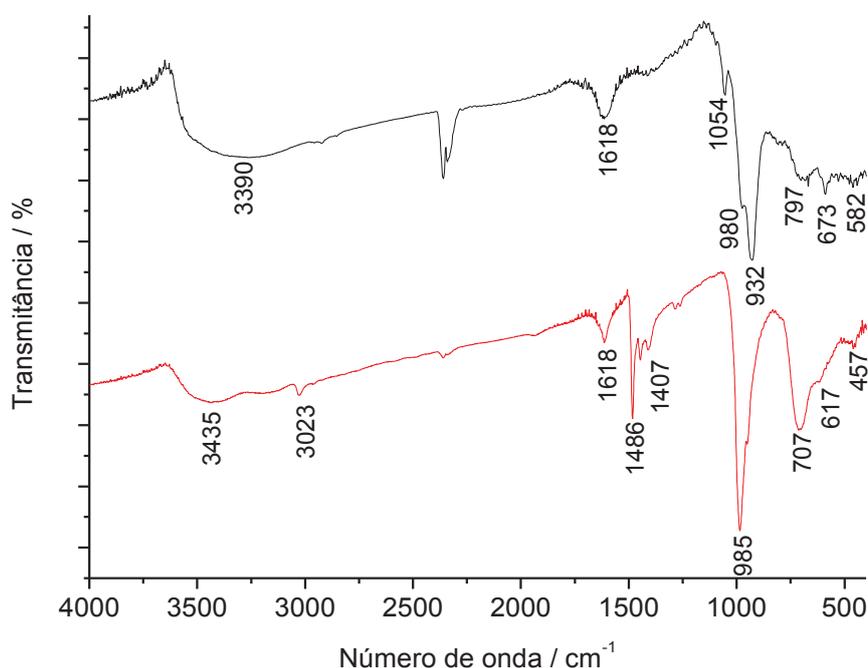


Figura 22 Espectros de absorção na região do infravermelho registrados para os produtos **V₁₈P** (linha preta) e **V₁₈I** (linha vermelha).

Tabela 8 Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV e espalhamento Raman dos produtos **V₁₈P** e **V₁₈I**

Atribuições Tentativas	IV / cm ⁻¹		Raman / cm ⁻¹	
	V₁₈I	V₁₈P	V₁₈I	V₁₈P
$\nu(\text{V=O})$	985	932	1020	885
$\nu(\text{V-O-V})$	707	797	688	762
$\delta(\text{V-O-V})$	617	673	417 – 514	458 – 530
δ_{as} e δ_{s} (CH ₃)	1486 – 1407	–	–	–
$\nu(\text{O-H})$	3435 – 1618	3390 – 1618	–	1698
$\nu(\text{P-O})$	–	980	–	937

FONTE: Voit, E.I. (2008),¹⁴⁸ Menezes, W. G. (2007),¹⁶ Dong, B. (2006)¹⁴⁹ e Hasenknopf, B. (2005)¹⁴

Para o **V₁₈I** foram observadas ainda bandas relativas às vibrações δ_{as} e δ_s (CH_3) em 1486 e 1407 cm^{-1} podendo ser atribuídas à presença do cátion tetrametilamônio, assim como bandas em 3435 e 1618 cm^{-1} relativas ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ de moléculas de águas presentes no retículo cristalino.

O **V₁₈P**, por sua vez, apresenta além das bandas do POV, bandas referentes à presença de moléculas de água de hidratação centradas em 3390 e 1618 cm^{-1} e uma banda intensa em 980 cm^{-1} para o estiramento $\nu(\text{P-O})$ do ânion fosfato encapsulado no centro do agregado metálico.

A espectroscopia Raman (Figura 23, Tabela 8) para o **V₁₈I** revelou uma banda em 417 cm^{-1} produzida pela sobreposição das vibrações ν_4 do cátion tetrametilamônio e do $\delta(\text{V-O-V})$ e bandas alargadas nas regiões centradas em 688 e 1020 cm^{-1} referentes às vibrações $\nu(\text{V-O-V})$ e $\nu(\text{V=O})$, respectivamente.¹⁴

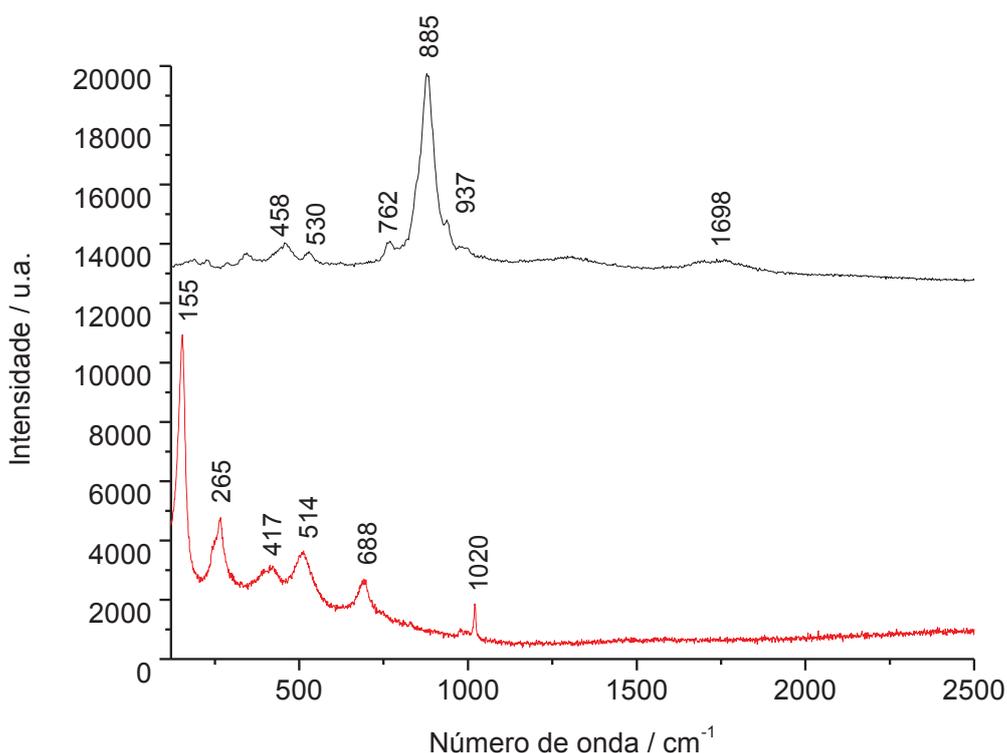


Figura 23 Espectros de espalhamento Raman utilizando laser de Ar^+ , 514 nm registrados para os produtos **V₁₈I** (linha preta) e **V₁₈P** (linha vermelha).

O produto **V₁₈P** também apresentou bandas da estrutura polinuclear, assim como, uma banda relativa à incorporação do fosfato na estrutura em 937 cm^{-1} , $\nu(\text{P-O})$, e uma banda em 1698 cm^{-1} atribuída a $\nu(\text{O-H})$ das moléculas de água de hidratação presentes no retículo cristalino. Os resultados obtidos até o momento confirmaram a obtenção de dois POVs, os quais apresentam espectros vibracionais distintos com sua polinuclearidade indicada pelas bandas alargadas na região abaixo de 1000 cm^{-1} no espectro de IV.

Uma relação entre as estruturas do tipo $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]^{x-}$ é descrita por meio do deslocamento da banda na região do infravermelho relativa ao estiramento $\nu(\text{V=O})$. Para a qual, Müller descreve que um menor valor para a banda de $\nu(\text{V=O})$ é geralmente observado para estruturas mais reduzidas, como $\text{K}_9[\text{H}_4\text{V}^{\text{IV}}_{18}\text{O}_{42}(\text{I})] \cdot 14\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{N}_2\text{H}_4$ em 950 cm^{-1} .²⁹ Enquanto que, valores maiores indicam um maior número de centros de V^{V} na estrutura, como o observado para $(\text{Et}_4\text{N})[\text{V}^{\text{IV}}_{10}\text{V}^{\text{V}}_8\text{O}_{42}(\text{I})]$ com uma banda em 995 cm^{-1} .²⁹

Nesse contexto, o produto **V₁₈I** apresenta a banda relativa a vanadila em 985 cm^{-1} , um intermediário para os valores observados com outros polioxovanadatos $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]^{x-}$. Porém, uma relação similar não foi possível para o produto **V₁₈P** devido ao menor número de estruturas análogas relatadas.

3.1.3. Caracterização por análises termogravimétricas

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para auxiliar na elucidação da formulação e número de moléculas de água e contraíons na estrutura dos produtos **V₁₈I** e **V₁₈P** (Figura 24), bem como para avaliar a estabilidade térmica do produto. As formulações utilizadas para os cálculos de TG foram $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}] \cdot \text{Me}_4\text{NI} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para o **V₁₈I** e $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ para o **V₁₈P**.

O termograma do produto **V₁₈P** (Figura 24a) revelou uma perda de massa até 200 °C evidente pela curva de DTG, derivada da curva de decomposição térmica, correspondente a perda de 11 moléculas de água. Essa perda é suportada pela boa concordância entre os valores de massa experimentais e calculados de 8,9% e 8,3%, respectivamente.

A perda das cinco moléculas de água remanescentes pode ser observada entre as temperaturas de 200 e 600 °C, por um conjunto de várias pequenas perdas de massa, correspondente a 3,3% da massa total (valor experimental de 4,4%). A decomposição térmica da estrutura de polioxovanadato ocorre acima desta temperatura.

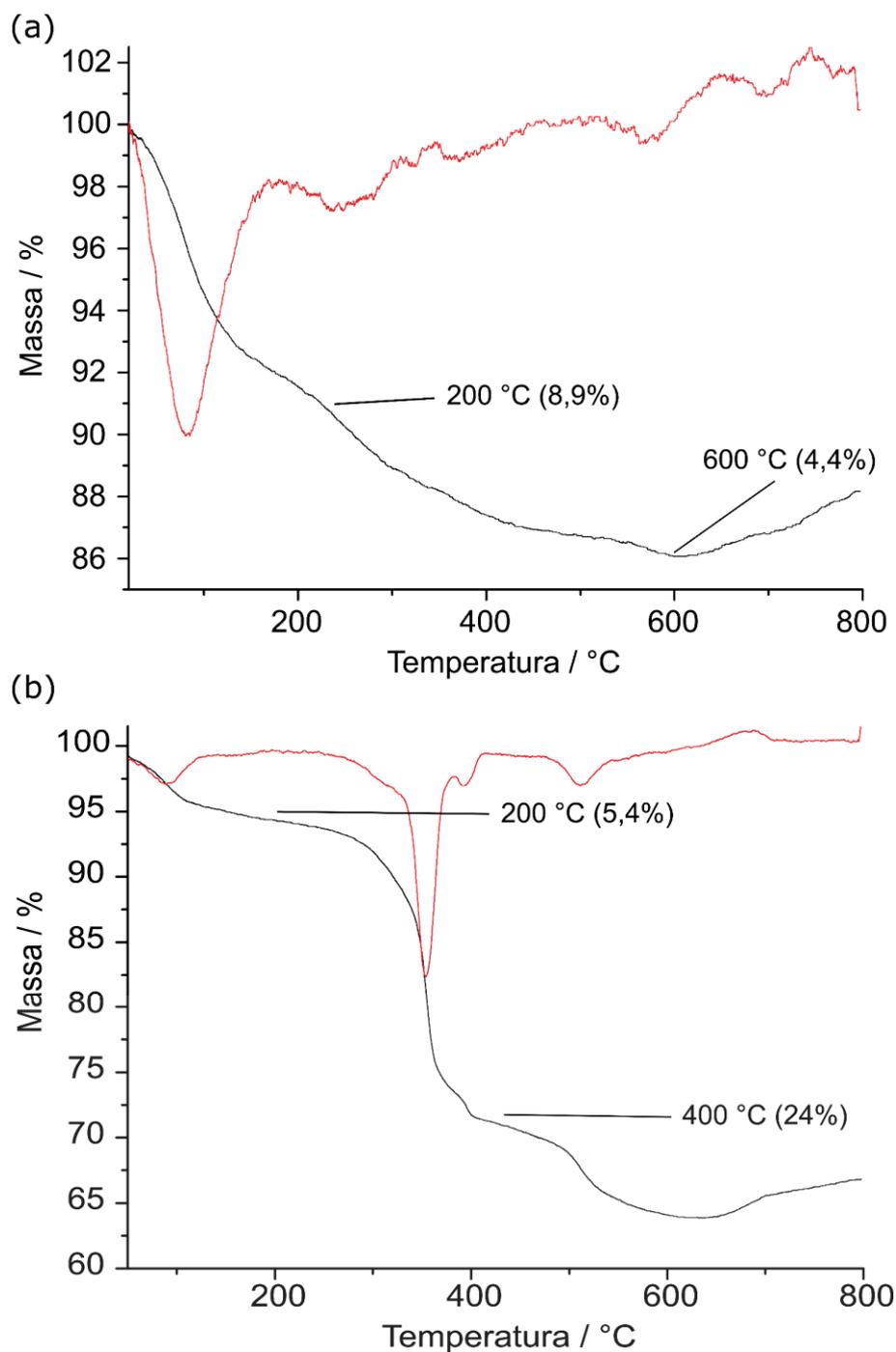


Figura 24 Análise termogravimétrica (TGA, linha preta) e DTG (linha vermelha) dos produtos (a) $V_{18}P$ e (b) $V_{18}I$ com variação de temperatura na faixa de 20 a 800 °C.

Para o **V_{18I}**, o termograma mostra 3 regiões de decomposição térmica (Figura 24b), o primeiro pode ser observado em uma faixa de 20 a 200 °C e corresponde a perda de cinco moléculas de água de cristalização e dois cátions amônio (valor determinado = 5,4%; valor calculado = 5,2%).

A segunda perda de massa, até 400 °C, refere-se a perda de cinco cátions tetrametilamônio e do iodeto de tetrametilamônio adicional (valor determinado = 24%; calculado = 23,6%). Tal atribuição está de acordo com os resultados da análise elementar e é apoiada pela literatura sobre a decomposição térmica de halogenetos de amônio terciários, que ocorre na mesma faixa de temperatura. A decomposição térmica do polioxoânion é mais complicada de racionalizar e ocorre em uma temperatura até 610 °C.

Os dados de TGA somados aos resultados de análise elementar e de difratometria de raios X de monocristal suportam o número de moléculas de água e contraíons propostos confirmando as formulações propostas pela análise elementar.

3.1.4. Caracterização da valência mista do **V_{18P} e do **V_{18I}****

Os espectros de RPE dos sólidos **V_{18P}** e **V_{18I}** pulverizados a 77 K apresentaram uma linha alargada (Figura 25), de espécies polinucleares com interação magnética entre os centros de vanádio(IV) ($I = 7/2$). O perfil observado aponta para a redução parcial dos centros de V^V derivados do material de partida NH_4VO_3 . A obtenção de agregados de valência mista (IV/V) é comum na química de polioxovanadatos¹⁵⁰ e foi observada em nosso grupo de pesquisa para os produtos **V₁₄** e **V₁₅**, preparados por uma rota análoga.^{52; 53}

O EPR do sólido pulverizado do **V_{18P}** (Figura 25, linha vermelha) apresenta uma linha alargada com $\Delta_{pp} = 36,7$ mT e $g = 1,974$, típico de espécies polinucleares contendo centros de vanádio(IV) em sua estrutura. A análise titulométrica do **V_{18P}** apresentou um valor de valência média de 4,44, compatível com a presença de 11 V^{IV} e 7 V^V na estrutura do POV, rendendo um ânion com carga 6-. Um resultado similar foi encontrado utilizando cálculo de somatório da valência de ligação (BVS do inglês, *bond valence sum*) baseado nos resultados

de DRX-monocristal e comprimento de ligação entre V–O, com valor médio para V^V de 4,56 e 4,32 para V^{IV} (Tabela 9).

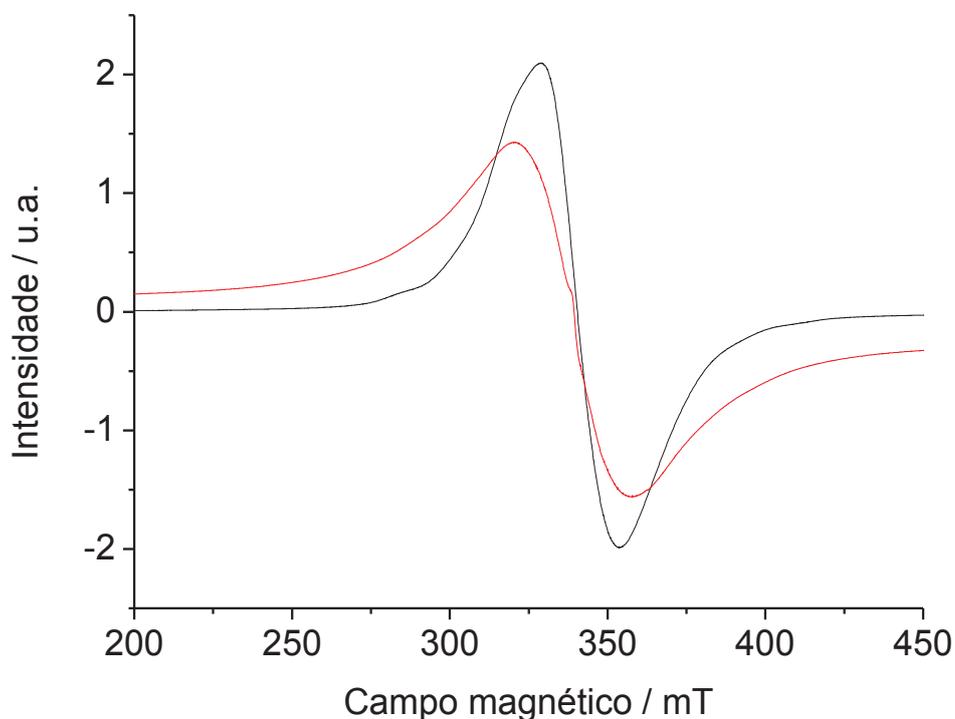


Figura 25 Espectro de RPE registrado a 77 K para o sólido pulverizado de $V_{18}P$ (linha vermelha) e $V_{18}I$ (linha preta).

Tabela 9 Valores para o somatório da valência de ligação e atribuições dos átomos de vanádio no $V_{18}P$ ^{a 151}

Átomo	Valência baseada em V^V	Valência baseada em V^{IV}
V(1)	<u>4,67</u>	4,39
V(2)	<u>4,83</u>	4,54
V(3)	<u>4,66</u>	4,38
V(4)	4,37	<u>4,10</u>
V(5)	4,45	<u>4,18</u>
V(6)	4,37	<u>4,10</u>
V(7)	4,62	4,52

^aO valor sublinhado é o mais próximo da carga/valência para a qual foi calculado. O estado de oxidação foi considerado como o número inteiro mais próximo do valor sublinhado.

A medida de susceptibilidade magnética realizada para o sólido pulverizado do $V_{18}P$ a 300 K ($\chi_{MT} = 1,53 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$) é compatível com a presença de troca antiferromagnética entre os spins desemparelhados no

polioxoânion, de acordo com o descrito para agregados do tipo V_{18} . Esse resultado sugere que os elétrons se encontram parcialmente deslocalizados na estrutura do agregado e com isso, a classificação da valência mista dos POVs também foi avaliada e é apresentada na próxima seção.

Dados de susceptibilidade magnética de estruturas análogas do tipo $\{V_{18}O_{42}PO_4\}^{x-}$ reportadas na literatura são apresentados na Tabela 10.^{146; 152; 153} Observa-se que os valores de susceptibilidade magnética podem variar de acordo com a característica estrutural do agregado, sendo este polimérico ou discreto. Assim como, com a variação da proporção de centros de vanádio(IV) e (V) na estrutura e a presença de acoplamento magnético entre os centros metálicos.

Tabela 10 Dados de medida magnética descrita para polioxovanadatos do tipo $\{V_{18}O_{42}(PO_4)\}^{x-}$ na literatura

Formulação	V^{IV}/V^V	Susceptibilidade magnética	Ref
$(NH_4)_5[C_4N_3H_{16}]_2[NH_3(CH_2)_2NH_3]_2$ $[PV_{18}O_{46}] \cdot H_2O$	V^{IV}_{18}	$\chi_M T = 1,87 \text{ emu K mol}^{-1}$ $\mu_{\text{eff}} = 4,26 \mu_B$	153
$K_{8,5}H_{2,5}[V_{18}O_{42}(PO_4)] \cdot 19H_2O$	$V^{IV}_{14}V^V_4$	$\chi_M T = 1,55 \text{ emu K mol}^{-1}$ $\mu_{\text{eff}} = 3,52 \mu_B$	152
$[C_4N_3H_{16}]_4[(PV_{18}O_{46})(PO_4)] \cdot H_2O$	$V^{IV}_{12}V^V_6$	$\chi_M T = 1,72 \text{ emu K mol}^{-1}$ $\mu_{\text{eff}} = 3,92 \mu_B$	153
$Na_6[(PO_4)V_{18}O_{39}]_2 \cdot H_3PO_4 \cdot 31H_2O$	$V^{IV}_{12}V^V_6$	$\chi_M T = 1,08 \text{ emu K mol}^{-1}$ $\mu_{\text{eff}} = 2,93 \mu_B$	146
$[K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4)]_n \cdot 4H_2O$	$V^{IV}_{11}V^V_7$	$\chi_M T = 1,53 \text{ emu K mol}^{-1}$ $\mu_{\text{eff}} = 3,50 \mu_B$	Descrito aqui

Para o produto **V₁₈P** observamos um valor de susceptibilidade aproximado àqueles obtidos para os agregados com proporção de vanádio(IV/V) de $V^{IV}_{12}V^V_6$. Esse valor também foi mais alto do que o relatado para o polímero 3D análogo $Na_6[(PO_4)V_{18}O_{39}]_2 \cdot H_3PO_4 \cdot 31H_2O$,¹⁴⁶ o que indica uma distribuição de carga distinta na estrutura do polímero unidimensional obtido neste trabalho.

O espectro de EPR do produto **V₁₈I**, por sua vez, mostrou uma linha alargada com uma distância de pico a pico (Δ_{pp}) de 24,7 mT e $g = 1,965$ (Figura 25, linha preta) que suporta a obtenção do polioxovanadato de valência mista. A análise titulométrica do **V₁₈I** indicou a presença de 12 V^{IV} e 6 V^V e um valor de valência média de 4,28. O que condiz com a proposta de formulação do produto, ou seja, com a obtenção do polioxoânion $[V^{IV}_{12}V^V_6O_{42}]^{7-}$.

A medida da susceptibilidade magnética para o **V₁₈I** em estado sólido (292,5 K de $\chi_{MT} = 1,87 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$) novamente sugere um acoplamento antiferromagnético dos elétrons desemparelhados na estrutura do agregado. Para o **V₁₈I**, foi observado ainda que o valor de χ_{MT} , assim como o número de centros de V^{IV} na estrutura, é intermediário aos valores relatados para outros agregados com ânions análogos como (Et₄N)₅[V^{IV}₁₀V^V₈O₄₂(I)] ($\chi_{MT} = 0,9 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$) e K₁₀[HV^{IV}₁₆V^V₂O₄₂(I)]·16H₂O ($2,2 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$).²⁹

3.1.4.1. *Classificação da intervalência entre os centros de vanádio(IV/V) no V₁₈P e V₁₈I*

A espectroscopia na região UV/Vis/NIR também foi realizada para caracterizar a valência mista dos produtos **V₁₈P** e **V₁₈I** de acordo com a classificação de Robin-Day. Os espectros apresentaram um perfil de bandas característico de espécies contendo centros metálicos de valência mista V^V:V^{IV} (Figura 26). A análise das soluções foi realizada por três dias, com um intervalo de 24 h entre as medidas, não havendo alterações significativas no perfil dos espectros.

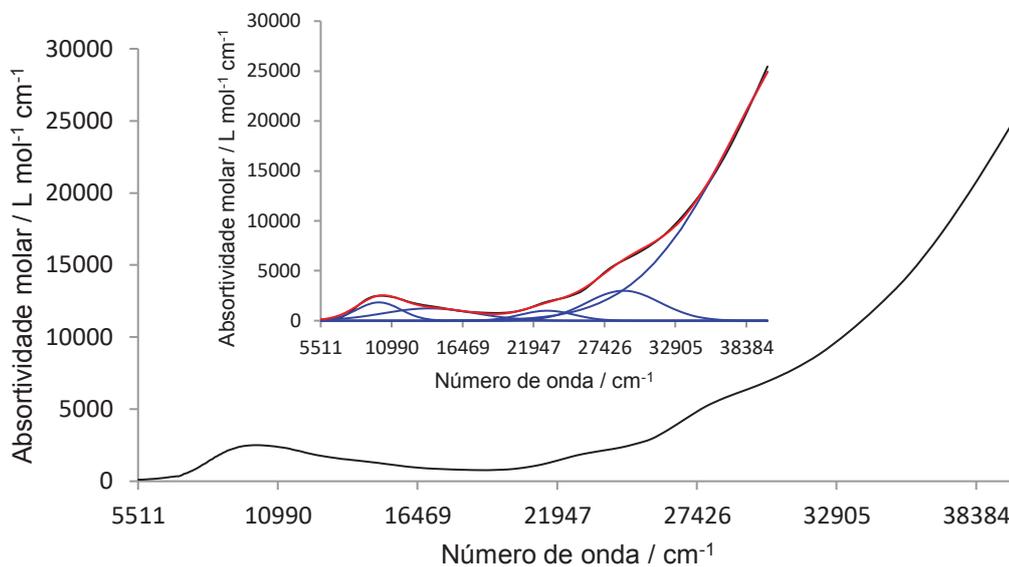
Os espectros apresentaram uma banda de maior intensidade que se estende de 19500 cm⁻¹ até a região do ultravioleta, que pode ser atribuída à transferência de carga ligante-metal $p\pi(\text{O}, \text{oxo}) \rightarrow d(\text{V})$ (Figura 26).⁷⁵ A segunda banda, de menor intensidade, foi observada com máximo em 10500 cm⁻¹ ($\epsilon = 325 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para **V₁₈P** e 9900 cm⁻¹ ($\epsilon = 440 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para **V₁₈I** podendo ser atribuída a transições d-d entre os centros metálicos. A região da segunda banda é característica de bandas referentes a transferência de carga de intervalência (TCIV) dos centros de V^{IV} para V^V presentes em compostos de valência mista.⁸⁰

Bandas de TCIV ocorrem comumente com máximo de absorção na região que se estende de 11000 a 27000 cm⁻¹. Robin e Day^{154; 155} propuseram 3 categorias diferenciadas pelo perfil e intensidade da interação eletrônica entre os centros metálicos, sendo elas:

- (i) Classe I – carga localizada nos centros metálicos;

- (ii) Classe II – carga parcialmente deslocalizada entre os centros metálicos;
- (iii) Classe III – carga deslocalizada entre os centros metálicos.

(a)



(b)

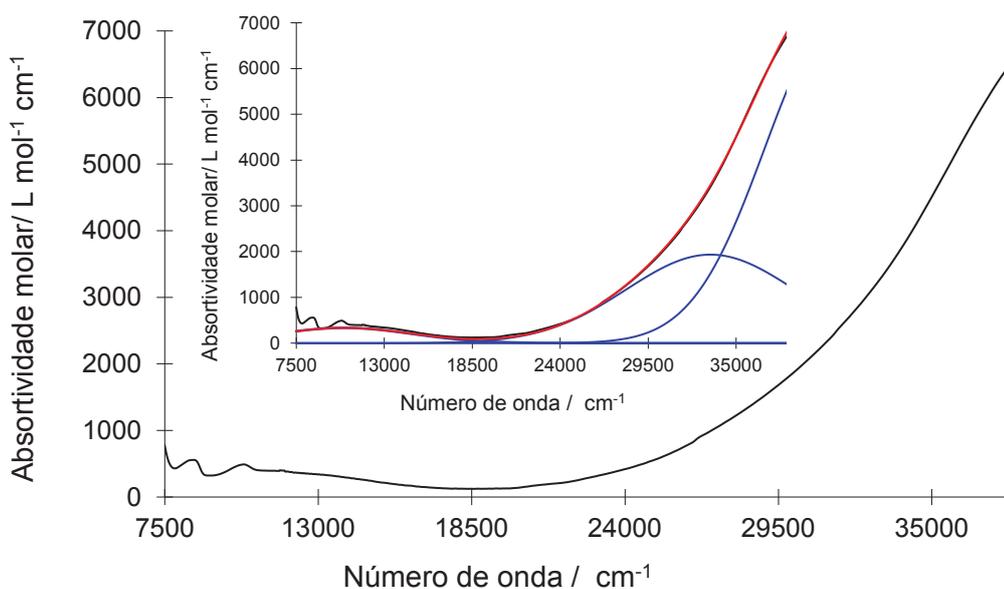


Figura 26 Espectro de UV/Vis/NIR da solução aquosa dos produtos (a) $V_{18}I$ e (b) $V_{18}P$ em concentração de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. No anexo, a linha preta representa o espectro experimental, a azul as bandas obtidas por meio da decomposição do espectro e a vermelha o espectro calculado resultante.

A distribuição de carga desses produtos foi classificada como sendo do tipo II através da comparação dos valores experimentais e teóricos de largura de banda a meia altura ($\Delta\bar{\nu}_{1/2}$) (Tabela 11). No qual, o valor obtido para $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ teórico

se encontra no limite entre a transição de carga localizada e a deslocalizada (Equação 6). Portanto, se o valor de $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ (exp) for superior ou igual ao $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ (teórico), o sistema será de classe II e se o valor obtido for menor que o $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ (teórico), este pertencerá da classe III. ¹⁵⁶

$$\Delta\bar{\nu}_{1/2} \text{ (teor)} = (2310 \times \bar{\nu}_{\text{max}})^{1/2}$$

Onde $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ = largura da banda a meia altura; $\bar{\nu}_{\text{max}}$ = energia da absorção máxima.

[Equação 6]

Tabela 11 Valores experimentais e teóricos de largura de banda a meia altura ($\Delta\bar{\nu}_{1/2}$) para as bandas de intervalência simuladas para os produtos **V₁₈P** e **V₁₈I**

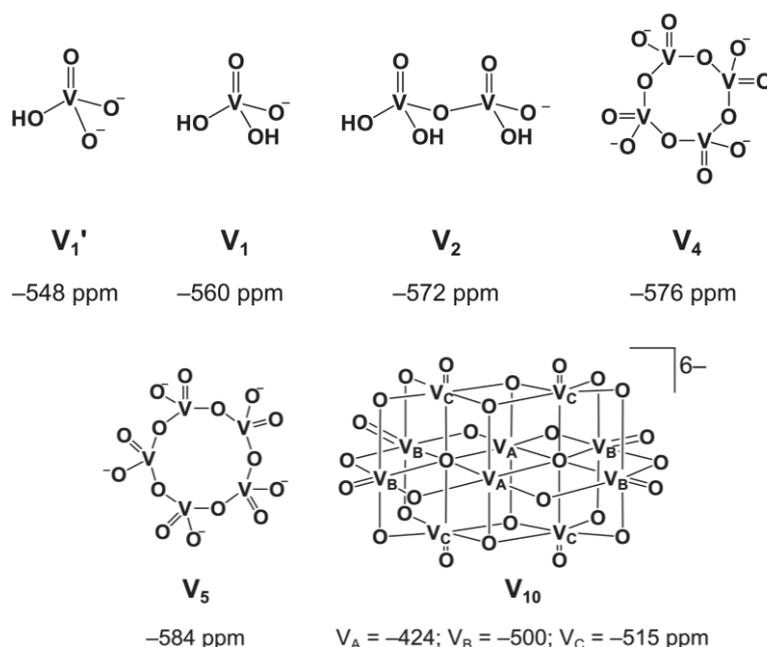
	V₁₈P / cm ⁻¹	V₁₈I / cm ⁻¹
$\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ (experimental)	9085	4150
$\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ (teórico)	4878	2380

A existência de agregados com 18 centros de vanádio pertencentes a diferentes classes de Robin-Day é relatada e descrita como dependente da proporção entre centros de V^{IV}/V^V e da geometria do agregado. ²⁹ Assim como, relatos de outros POVs de valência mista contendo diferentes nuclearidades do tipo II de Robin-Day também são encontrados na literatura, como os agregados [V₁₅O₃₆(Cl)]⁶⁻, ⁵³ [H₆V₁₄O₃₈(PO₄)]⁵⁻ ⁵² e [V₁₆O₃₈(CN)]⁹⁻. ¹⁵⁷

3.1.4.2. Determinação das espécies químicas em solução aquosa do **V₁₈P** e **V₁₈I**

Sistemas de vanádio em solução aquosa possuem grande complexidade pela coexistência de várias espécies em equilíbrio (Figura 7). Os equilíbrios podem ser deslocados em diferentes condições, as quais incluem a concentração de vanádio, temperatura e pH do meio. ⁹ POVs de valência mista, por sua vez, geram um equilíbrio mais complexo em solução contendo espécies diamagnéticas (V^V) e paramagnéticas (V^{IV}), requerendo o uso combinado das técnicas espectroscópicas de RMN de ⁵¹V e RPE.

As espécies de vanádio(V) comumente reportadas em soluções de vanadatos são apresentadas no Esquema 3 com seus respectivos deslocamentos químicos. Nossos estudos anteriores com polioxovanadatos de valência mista, como o V_{14} e o V_{15} , mostraram que quando o produto é dissolvido pode haver uma quebra parcial do agregado.⁵² Formando-se desta forma um equilíbrio entre as espécies polinucleares de valência mista (POV-MV), oligômeros de vanádio(V) e o complexo aquoso de vanádio(IV), $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ (Seção 1.1.1).



Esquema 3 Representação das espécies de vanádio(V) comumente identificadas em solução “ $V_{1'}$ ” = HVO_4^{2-} , “ V_1 ” = $H_2VO_4^-$, “ V_2 ” = $H_2V_2O_7^{2-}$, “ V_4 ” = $V_4O_{12}^{4-}$, “ V_5 ” = $V_5O_{15}^{5-}$ e “ V_{10} ” = $[V_{10}O_{28}]^{6-}$. No esquema também estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de ^{51}V .

Os polioxovanadatos de valência mista (V^{IV}/V^V) estudados neste trabalho foram, portanto, avaliados em solução aquosa em concentrações de 0,10 a 10 mmol L^{-1} pelas técnicas de RMN de ^{51}V e RPE. A análise do $V_{18}I$ e $V_{18}P$ por RMN de ^{51}V apresentou resultados significativamente diferentes (Figura 27). O espectro do $V_{18}I$ em água/ D_2O (9:1) apresentou apenas um sinal de baixa intensidade em $\delta = -560$ ppm atribuído a espécie “ V_1 ” ($H_2VO_4^-$)²⁶ e nenhum sinal nas condições de maior concentração avaliadas (5,0 e 10 mmol L^{-1}).

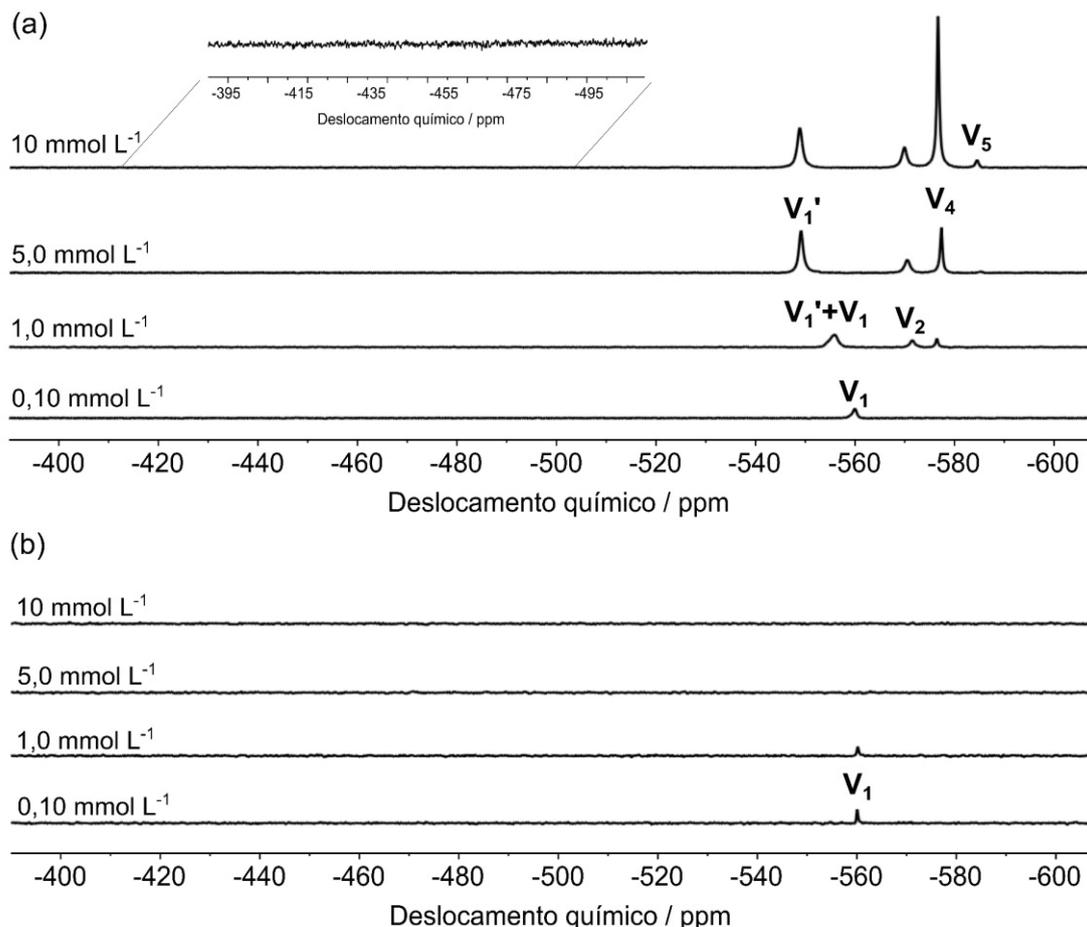


Figura 27 Espectros de RMN de ^{51}V obtidos a temperatura ambiente para os produtos (a) V_{18}P , $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$, e (b) V_{18}I , $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]\cdot \text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, em solução de água- d_2 e concentrações de 0,10 a 10 mmol L^{-1} . As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “ V_1 ” = H_2VO_4^- , “ V_1' ” = HVO_4^{2-} , “ V_2 ” = $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$, “ V_2' ” = $\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$, “ V_4 ” = $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e “ V_5 ” = $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$.

Para o V_{18}P foi observada a quebra da estrutura polinuclear e com ela, a formação de uma mistura dinâmica de espécies de menor nuclearidade de vanádio(V) variando com a concentração do produto. O espectro registrado na menor concentração do produto V_{18}P , 0,10 mmol L^{-1} , evidencia a formação de apenas um sinal em $\delta = -560$ ppm atribuído ao oxometalato “ V_1 ”. O perfil espectral muda gradualmente conforme há o aumento da concentração do POV para 1,0 mmol L^{-1} , favorecendo um deslocamento do equilíbrio das espécies de vanádio(V) com sinais em $\delta = -556$, -572 e -576 ppm que correspondem a rápida interconversão entre as espécies “ V_1' ” (HVO_4^{2-}) e “ V_1 ”, e as espécies “ V_2 ” ($\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$) e “ V_4 ” ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$).²⁶

Uma nova alteração nas espécies em equilíbrio é observada nas maiores concentrações do $V_{18}P$ de 5,0 e 10 $mmol L^{-1}$, onde houve o deslocamento do sinal com δ em -556 para -548 ppm (“ V_1' ”) e ao aparecimento de um sinal de baixa intensidade em $\delta = -584$ ppm, atribuído ao “ V_5 ” = $V_5O_{15}^{5-}$. Nessas condições também foram atribuídos os sinais em -569 e -576 ppm das espécies “ V_2 ” e “ V_4 ” (Figura 27). O perfil observado nos espectros indica que o $V_{18}P$ possui uma estrutura menos estável em solução aquosa comparado ao $V_{18}I$, com um perfil comparável ao observado em nossos trabalhos anteriores para o V_{14} ⁵² e o V_{15} , ⁵³ os quais também produziram espécies de baixa nuclearidade de vanádio(V) em solução.

A presença de espécies de vanádio(IV) em equilíbrio nas soluções aquosas do $V_{18}P$ e $V_{18}I$ foram avaliadas por meio de análises similares de RPE a 77 K, nas mesmas condições de concentração (0,10 a 10 $mmol L^{-1}$, Figura 28).

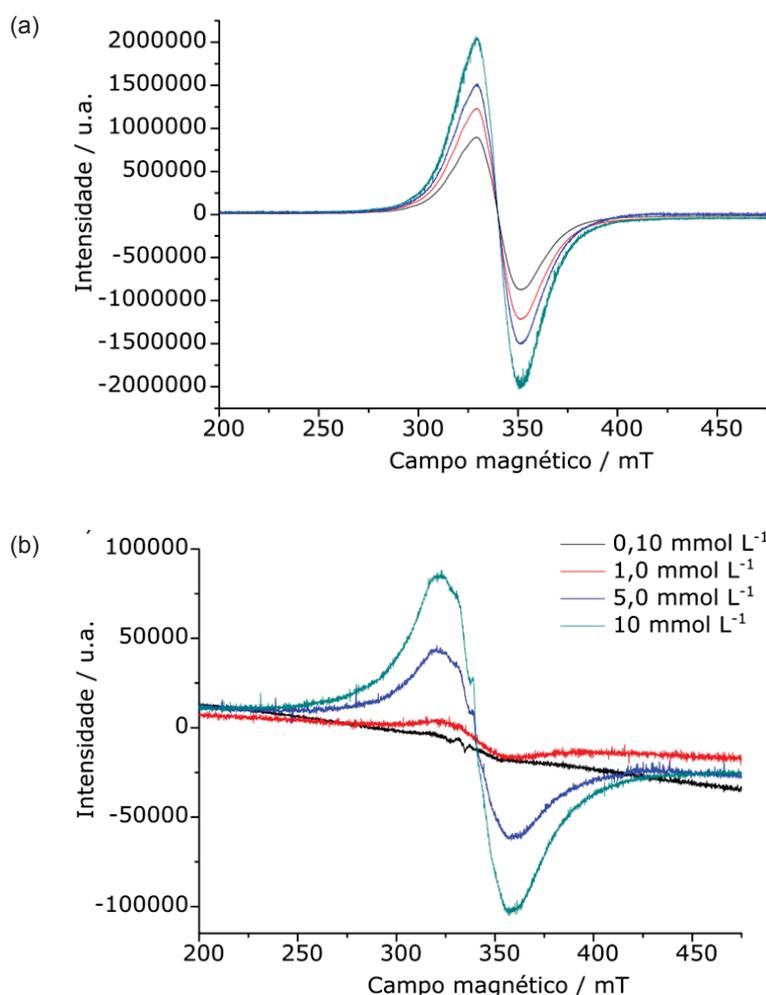
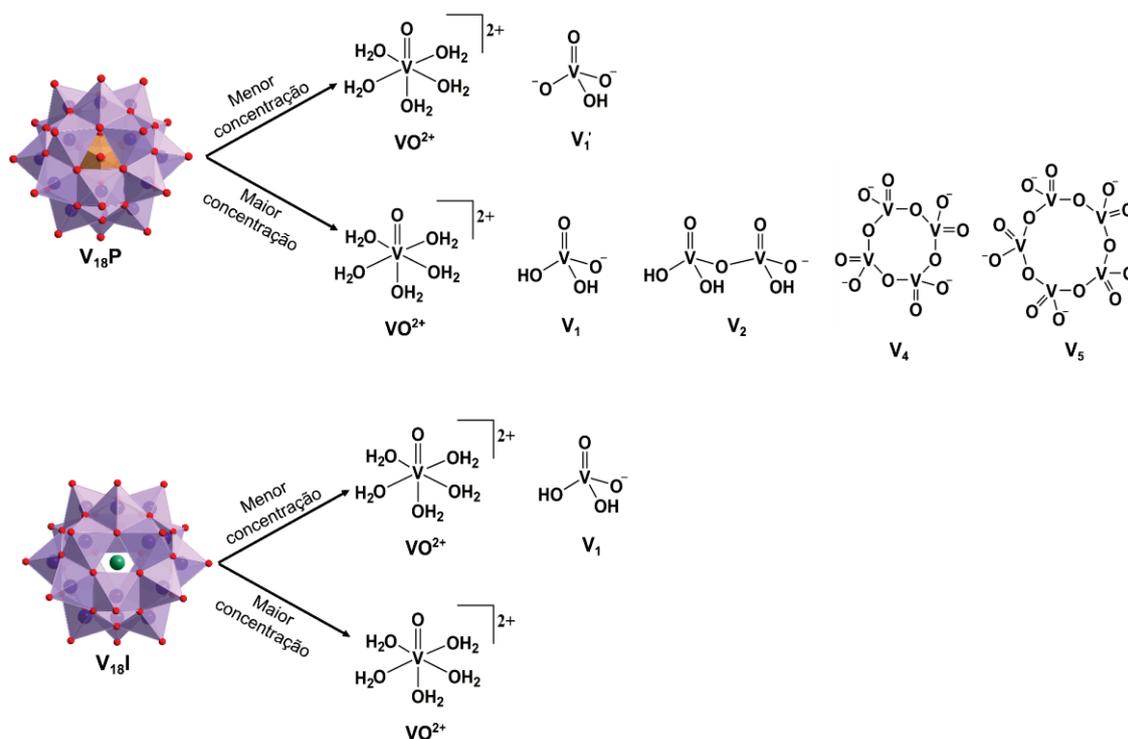


Figura 28 Espectros de RPE obtidos a 77 K para os produtos (a) $V_{18}I$ e (b) $V_{18}P$ em solução aquosa com concentrações na faixa de 0,10 a 10 $mmol L^{-1}$.

Ambos os produtos apresentam linhas alargadas, que indicam a presença de espécies polinucleares com interação magnética entre os centros de vanádio(IV), ¹⁵⁸ o que sugere a presença das espécies polinucleares de valência mista, **V₁₈I** e **V₁₈P**, em solução. Para o **V₁₈I** (Figura 28a), foi observada a presença da linha alargada para todas as concentrações avaliadas, com $g = 1,97$ e $\Delta_{p-p} = 33,1$ mT.

A linha alargada do produto **V₁₈P** ($g = 1,97$ e $\Delta_{p-p} = 36,1$ mT, Figura 28b), por sua vez, está sobreposta ao espectro hiperfino atribuído a presença de espécies mononucleares de vanádio(IV). O que indica uma quebra parcial da estrutura do polioxovanadato em solução aquosa, concordando com os resultados de RMN de ⁵¹V, mostrando que o **V₁₈P** é mais susceptível a decomposição em solução aquosa do que o **V₁₈I**.

Em suma, os resultados em solução aquosa para o **V₁₈I** e **V₁₈P** (Esquema 4) indicam uma maior estabilidade do produto **V₁₈I** do que os demais POVs avaliados (**V₁₈P**, **V₁₅** e **V₁₄**). A compreensão da química e estabilidade em solução aquosa desses compostos pode fornecer meios de prever o comportamento dessa classe em determinadas condições e desta forma, auxiliar no entendimento da toxicidade e da atividade biológica desses compostos.



Esquema 4 Espécies químicas identificadas em solução aquosa do **V₁₈P** e **V₁₈I** na menor e maior concentração (0,10 e 10 mmol L⁻¹) empregando as técnicas de RMN de ⁵¹V e de RPE.

3.1.4.3. Estabilidade do V_{18I} em solução aquosa com variação do pH

Estudos complementares da estabilidade do composto V_{18I} foram realizados, uma vez que, este foi estável em todas as condições testadas previamente. Avaliou-se então a estabilidade deste produto em uma solução aquosa de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com pH variando de 1 a 10 (Figura 29). O ajuste do pH foi feito utilizando soluções de KOH e/ou HCl.

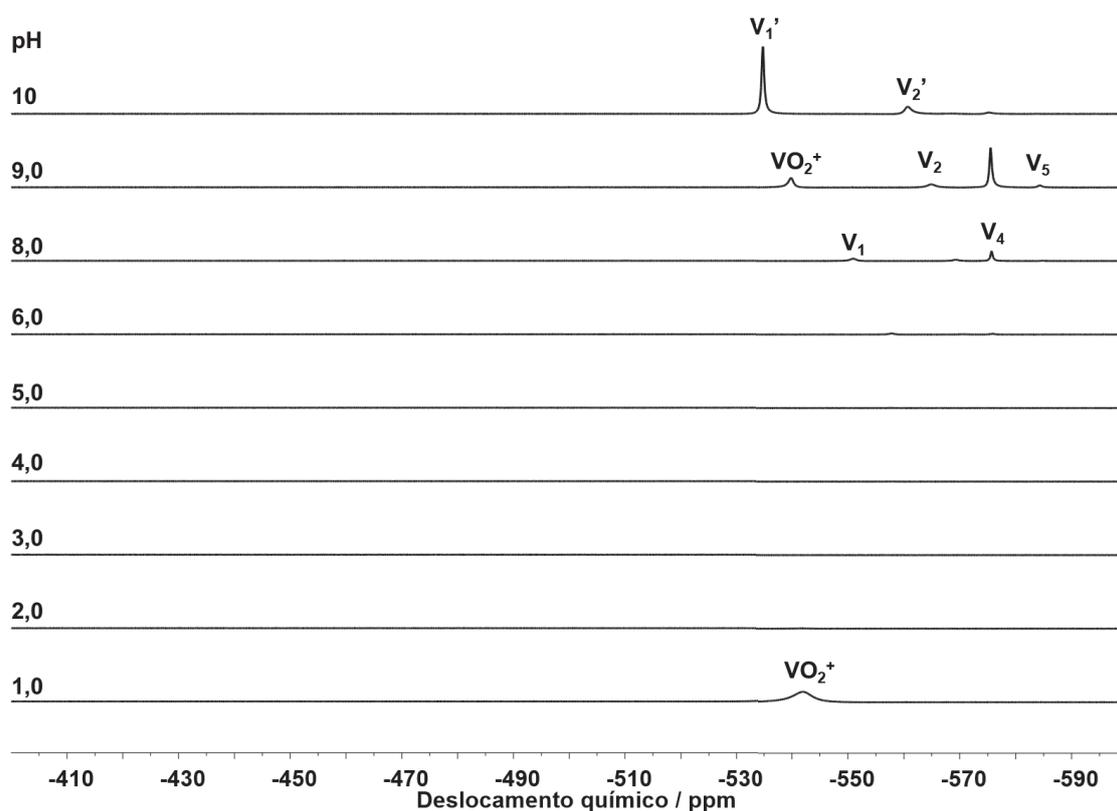


Figura 29 Espectros de RMN de ^{51}V obtidos a temperatura ambiente para o produto V_{18I} em solução de água- d_2 , concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e variação no pH de 0 a 10. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “ V_1 ” = H_2VO_4^- , “ V_1' ” = HVO_4^{2-} , VO_2^+ , “ V_2 ” = $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$, “ V_2' ” = $\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$, “ V_4 ” = $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e “ V_5 ” = $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$.

Nossos resultados mostram que mesmo com a variação no pH do meio, o POV de valência mista V_{18I} é estável entre o pH 2,0 e 5,0, indicando maior estabilidade do composto em soluções ácidas e próximas da neutralidade, uma vez que, em $\text{pH} = 6,0$ foram observados apenas sinais de baixa intensidade relativos a espécies V_1 e V_2 .

Em condições de pH mais básicas, observou-se que este composto sofre uma maior quebra da sua estrutura, gerando sinais de maior intensidade relativos a diferentes espécies de menor nuclearidade de vanádio(V). Nessas condições, as espécies observadas em maior intensidade foram o V_4 ($V_4O_{12}^{4-}$) em pH 9,0 e o V_1' (HVO_4^{2-}) em pH 10.

O pH do meio de cultura LB (Luria-Bertani) utilizado no cultivo das culturas bacterianas de *E. coli* é de 6,8, o que sugere que nesta faixa de pH o **V₁₈I** estará presente de forma majoritária como o agregado polinuclear. Especialmente quando consideramos que as concentrações do composto utilizadas variam de 0,10 a 10 mmol L⁻¹ e em menores concentrações a quantidade de espécies de menor nuclearidade formada, se formada, será baixa, de forma a não influenciar grandemente no estudo das propriedades do composto de origem.

Até onde sabemos, nossos resultados com o **V₁₈I** e o **V₁₈P**, somados às nossas descobertas anteriores^{52; 53} com o **V₁₅** e **V₁₄** demonstram, pela primeira vez, que polioxovanadatos contendo haletos encapsulados são mais estáveis em solução aquosa que aqueles contendo ânion fosfato.

A estabilidade em meio aquoso parece ser consequência não apenas do tamanho do ânion encapsulado, mas também da densidade de carga, Cl⁻/I⁻ vs PO₄³⁻, a ser acomodada pela gaiola aniônica do agregado. A manutenção da estrutura polinuclear como reportado para o **V₁₈I** e **V₁₅**, é observada com menor frequência na literatura dessa classe de compostos, sendo descrita para os compostos como o $[V_6O_8(OCH_3)_{11}]^{159}$ e o $(nBu_4N)_4[HV_{12}O_{32}(Cl)]$,¹⁶⁰ por exemplo, os quais são solúveis apenas em solventes orgânicos.

3.2. Estudo da atividade quimioprotetora do **V₁₈I e **V₁₈P** frente ao efeito deletério do agente alquilante dietilsulfato usando *E. coli* como modelo**

O estudo da toxicidade e atividade quimioprotetora frente ao agente alquilante dietilsulfato ((CH₃CH₂O)₂SO₂) dos POVs por meio da inibição do crescimento de culturas bacterianas foi realizada utilizando *E. coli* da estirpe

DH5 α na presença dos produtos **V_{18I}**, **V_{18P}** e do $[\{\text{Na}_6(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (**V₁₀**).¹³⁵

A avaliação do **V₁₀** se fez importante devido a resultados espectroscópicos e biológicos dos estudos realizados anteriormente pelo grupo com outros dois POVs de valência mista (**V₁₅** e **V₁₄** apresentados na Figura 3), os quais indicaram a formação de decavanadato em condições de baixa atividade quimioprotetora.

52

Os ensaios biológicos foram realizados em três etapas:

- (i) Avaliação da toxicidade do dietilsulfato em diferentes concentrações, para estabelecer as condições de uso do agente alquilante nos ensaios de quimioproteção;
- (ii) Avaliação da toxicidade dos POVs em diferentes concentrações;
- (iii) Avaliação da atividade quimioprotetora dos POVs utilizando a condição estabelecida em (i).

3.2.1. Avaliação da toxicidade dos POVs

O crescimento da suspensão bacteriana nos ensaios de toxicidade do **V_{18I}**, **V_{18P}** e **V₁₀** foi avaliado variando a concentração dos produtos, de 0,10 a 10 mmol L⁻¹, pela leitura da DO₅₉₅ na presença dos compostos (Figura 16). Utilizando, como mencionado anteriormente, a solução aquosa dos produtos como controle na leitura da DO.

O tratamento das culturas com **V_{18I}** não mostrou diferença significativa no crescimento celular quando comparado com o controle em concentrações de 0,10 até 5,0 mmol L⁻¹, indicando nenhuma toxicidade dentro dessa faixa (Figura 30). Na maior concentração avaliada, 10 mmol L⁻¹, esse POV foi letal para as células, em forma similar a reportada anteriormente para o **V₁₄**.¹⁴⁰ A comparação dos resultados para o **V_{18I}** e **V₁₀** em 5,0 mmol L⁻¹ revelou uma menor toxicidade do **V_{18I}** nas culturas de *E. coli* DH5 α .

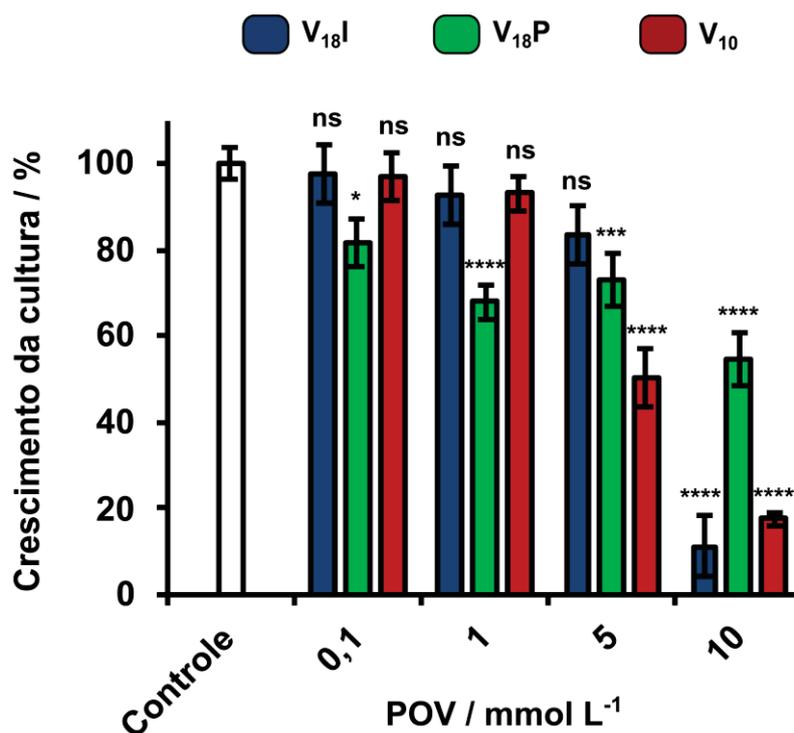


Figura 30 Curva de toxicidade em suspensões de *E. coli* tratadas com **V₁₈I** (azul), **V₁₈P** (verde) e **V₁₀** (vermelho) em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. Os valores de DO₅₉₅ foram 0,878±0,044 no controle considerados como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0,0001, ns = não significativo quando comparado ao controle.

Na Figura 30 também é possível observar que o **V₁₈P** foi moderadamente citotóxico para as células em todas as concentrações avaliadas nesse trabalho. Esses resultados podem ser atribuídos a natureza das espécies químicas formadas pelo **V₁₈P** em solução aquosa, como mostrado na Seção 4.1.4.2, contrastando com a estabilidade relativamente alta do **V₁₈I** nas mesmas condições.

Especificamente para o **V₁₈P**, devido ao crescimento relativamente elevado das culturas bacterianas observado na maior concentração (10 mmol L⁻¹), o experimental foi repetido uma quarta vez, com os resultados confirmando os dados. A toxicidade moderada do **V₁₈P** em 10 mmol L⁻¹ é notável quando comparada aos resultados obtidos para o **V₁₈I** e **V₁₀**.

No entanto, temos observado resultados similares para outros polioxovanadatos, para os quais há uma faixa de concentração onde uma menor

toxicidade é observada e acima do seu limite, um aumento abrupto na toxicidade é descrito. Por exemplo, o **V₁₄** mostrou esse aumento repentino de toxicidade acima de 5,0 mmol L⁻¹, enquanto o **V₁₅** não foi tóxico, nem mesmo na maior concentração avaliada (10 mmol L⁻¹).⁵²

O **V₁₀**, por sua vez, foi recentemente descrito como um potencial agente antibacteriano com valores de IC₅₀ variando de 0,58 a 1,8 mol L⁻¹, para diferentes estirpes bacterianas em condições de crescimento semelhantes.¹⁶¹ Nosso grupo de pesquisa demonstrou que esse efeito está relacionado a um desequilíbrio no potencial de membrana da *E. coli* que torna as células permeáveis a agentes tóxicos como o iodeto de propídio.¹⁰⁴

Adicionalmente, o **V₁₀** e o composto de valência mista **V₁₅** foram responsáveis pela diminuição do empacotamento de membranas lipídicas em células CHO, iniciando o sinal de transdução pelo receptor de hormônio luteinizante (LHR), discutido em mais detalhes na Seção 3.4.¹⁶² Esses estudos apontam para uma variedade de efeitos dos POVs na membrana celular de diferentes modelos biológicos e sugerem que cada POV, intacto ou após a quebra, atua de forma diferente em relação às células quando colocado em meio fisiológico.

3.2.2. Efeito do agente alquilante dietilsulfato sobre as culturas de *E. coli*

O crescimento da suspensão de bactérias de *E. coli* na presença de diferentes concentrações do agente alquilante foi realizado e reportado durante a dissertação de mestrado,⁵² variando a concentração de dietilsulfato de 3,0 a 7,0 mmol L⁻¹ (Figura 31).

As tentativas de trabalho com a concentração de 7,0 mmol L⁻¹ do dietilsulfato, por sua vez, levaram a inibição de aproximadamente 85% do crescimento da bactéria. Concentrações menores que 3,0 mmol L⁻¹, levaram a taxas de inibição bastante variáveis em todas as repetições, mesmo com a realização cautelosa dos experimentos. A concentração relativa à GI₅₀ foi calculada a partir da curva apresentada na Figura 31 como sendo 5,8 mmol L⁻¹ e atribuída como 6,0 mmol L⁻¹ selecionada para os estudos de quimioproteção promovidos com o uso dos polioxovanadatos apresentados na próxima seção.

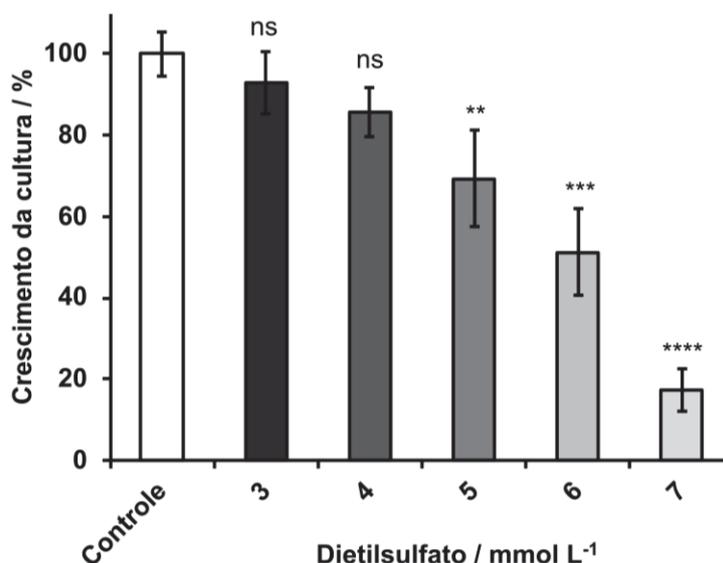


Figura 31 Avaliação do crescimento celular das suspensões bacterianas tratadas com concentrações crescentes do agente alquilante dietilsulfato com $GI_{50} = 5,8 \text{ mmol L}^{-1}$. O gráfico expressa os valores de densidade óptica em porcentagem do crescimento celular por concentração avaliada. Valores de viabilidade celular de $0,859 \pm 0,053$ foram ajustados para 100%. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P \leq 0,0001$, **** $P < 0,0001$, ns = não significativo quando comparado ao controle.

3.2.3. Avaliação da atividade quimioprotetora dos POVs frente a ação do dietilsulfato

O estudo do efeito quimioprotetor de cada POV, **V_{18I}**, **V_{18P}** e do **V₁₀**, foi realizado frente ao uso do agente alquilante modelo dietilsulfato sobre a viabilidade de culturas bacterianas de *E. coli* (Figura 32). A quantidade de dietilsulfato nos ensaios foi mantida fixa na concentração de GI_{50} calculada de $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a qual foi usada em conjunto com os POVs e como controle.⁵²

A atividade de quimioproteção dos compostos foi avaliada, portanto, pela incubação das suspensões bacterianas com concentrações crescentes dos POVs ($0,10$ a 10 mmol L^{-1}) e uma concentração fixa do dietilsulfato por 3 h em meio LB. A atividade quimioprotetora observada para os produtos não foi concentração-dependente, ou seja, o resultado obtido não foi linear em relação ao aumento da concentração dos compostos (Figura 32).

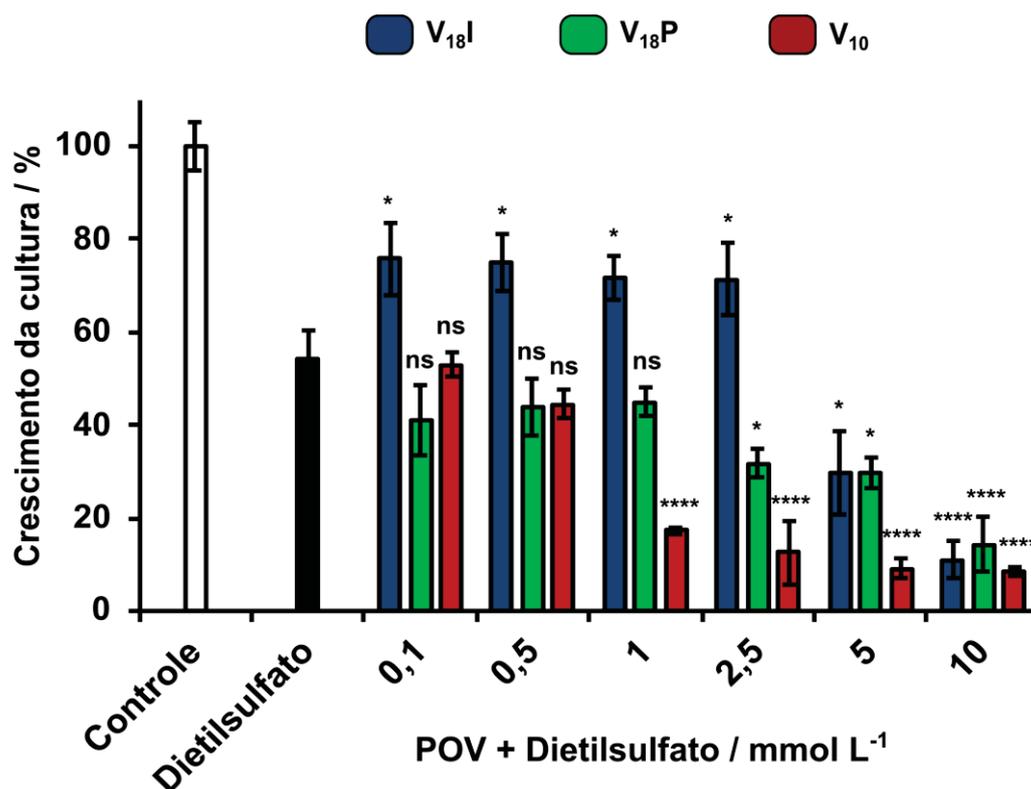


Figura 32 Curva de atividade quimioprotetora utilizando 6,0 mmol L⁻¹ do agente alquilante, dietilsulfato em suspensões de *E. coli* tratadas com V₁₈I (azul), V₁₈P (verde) e V₁₀ (vermelho) em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. Os valores de DO₅₉₅ foram 0,878±0,044, 1,068±0,024 e 0,742±0,043 no controle considerados como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0,0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des.

Dentre esses polioxovanadatos, o V₁₈I mostrou um aumento no crescimento bacteriano de aproximadamente 35%, em comparação a cultura controle exposta apenas ao dietilsulfato (segunda coluna, Figura 32). Essa proteção não foi dependente da concentração, compreendendo uma faixa de concentração de 0,10 a 2,5 mmol L⁻¹.

Nas maiores concentrações de V₁₈I (5,0 e 10 mmol L⁻¹) a quimioproteção não foi observada, possivelmente devido à produção de espécies tóxicas contendo vanádio formadas a partir da reação do POV com o dietilsulfato sob as condições avaliadas.

Um gráfico detalhado mostrando os resultados de quimioproteção obtidos para o V₁₈I são significativamente diferentes de ambos os controles, com e sem dietilsulfato, é apresentado na Figura 33. O resultado sugere que a adição do

dietilsulfato foi notavelmente neutralizada pela presença de **V₁₈I**, embora não completamente, porque a cultura não atinge o crescimento completo na presença do agente alquilante. É claro, porém, que as concentrações elevadas de **V₁₈I** (acima de 1,0 mmol L⁻¹) não são tão eficientes quanto as mais baixas na quimioproteção contra a ação do dietilsulfato, e que acima de 5,0 mmol L⁻¹ de **V₁₈I** a atividade protetora não é apenas perdida, mas o efeito deletério do dietilsulfato é potencializado pela presença deste POV.

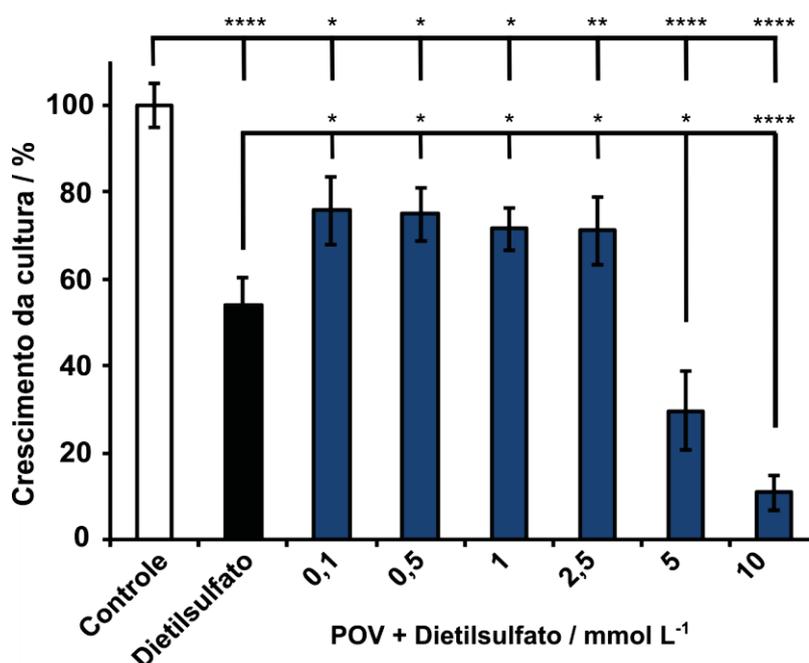


Figura 33 Curva de atividade quimioprotetora utilizando 6,0 mmol L⁻¹ do agente alquilante, dietilsulfato em suspensões de *E. coli* tratadas com **V₁₈I** em concentrações de 0,10 a 10 mmol L⁻¹; os dados foram obtidos após 3 h de incubação a 37 °C em triplicata. A DO₅₉₅ 0,878±0,044 do controle foi considerado como 100% de crescimento, respectivamente. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0,0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des.

No trabalho de mestrado, um resultado semelhante foi observado para o **V₁₅** que apresentou uma proteção de 30–40% no crescimento bacteriano tratado com dietilsulfato. Nossos resultados somados indicam que espécies polinucleares que resistem melhor a quebra em solução aquosa são também aqueles mais ativos frente a prevenção da ação do agente alquilante nas culturas bacterianas. ^{52; 53} No entanto, o mecanismo dessa ação protetora observada

para os agregados $\{V_nO_m\}^{y-}$, aparentemente, intactos ainda está sob investigação.

Além disso, estudos do potencial eletrostático mostraram que as propriedades de superfície dos polioxoânions contendo 18 centros metálicos podem mudar com a proporção V^{IV}/V^V ; potenciais eletrostáticos mais negativos na superfície foram registrados para agregados com maiores cargas negativas.

33

No contexto do nosso trabalho, considerando que o $[V^{IV}_{12}V^V_6O_{42}]^{7-}$ (**V18I**) tem uma densidade de carga maior que o $[V^{IV}_{11}V^V_7O_{41}(PO_4)]^{6-}$ (**V18P**), um incremento da nucleofilicidade poderia ser observado. Assim como, um aumento no seu potencial como agente quimioprotetor em comparação ao **V18P**. Corroborando o mecanismo proposto por Wilker e coautores⁹¹ e os resultados do presente trabalho.

Além disso, o **V18P**, por sua vez, não apresentou proteção significativa em nenhuma das concentrações avaliadas, sugerindo a formação de espécies de vanádio pouco reativas frente ao dietilsulfato. Em concentrações acima de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, um aumento citotoxicidade na presença do agente alquilante foi observado quando comparado ao controle contendo apenas dietilsulfato.

De forma similar, o **V10** foi incapaz de proteger as bactérias da ação do dietilsulfato em todas as concentrações avaliadas, apresentando um aumento mais pronunciado na toxicidade observada acima de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na presença de dietilsulfato sobre o crescimento bacteriano.

Os diferentes níveis de crescimento bacteriano apresentados na Figura 32 revelam um aumento na citotoxicidade do **V18P** e **V10** quando em conjunto com o dietilsulfato, comparado ao resultado obtidos para as células tratadas apenas com o agente alquilante. No entanto, ensaios adicionais devem ser realizados para esclarecer se o aumento no efeito tóxico do **V10** quando combinado com dietilsulfato é do tipo aditivo ou sinérgico e se este poderia ser explorado posteriormente para fins antibacterianos.

Resultado semelhante foi observado para o **V14**,⁵² o qual também aumentou o efeito do dietilsulfato nas condições avaliadas. Para o **V14**, este resultado foi atribuído a formação do ânion decavanadato e do complexo mononuclear de vanádio(IV), $[V^{IV}O(H_2O)_5]^{2+}$ ($V^{IV}O^{2+}$) após sua quebra na presença de dietilsulfato. Tanto o ânion **V10**, quanto o $V^{IV}O^{2+}$ foram relatados por

nosso grupo de pesquisa como pouco reativos em contato com dietilsulfato em solução aquosa e acetonitrila.⁵² Porém a avaliação do **V₁₀** em um sistema biológico na presença desse agente alquilante não havia sido avaliada.

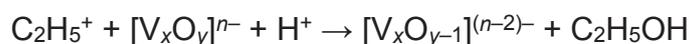
3.2.4. Avaliação da reatividade dos POVs com o dietilsulfato em meio LB

Estudos de especiação dos produtos **V_{18I}** e **V_{18P}** foram realizados em meio de cultura LB (pH = 6,0) na presença e ausência do agente alquilante e comparados com os espectros registrados em soluções aquosas apresentados na Seção 4.1.4.2.

Este estudo foi realizado para investigar o que ocorre com os agregados polimetálicos no meio de cultura após a interação com o agente alquilante, assim como, obter informações adicionais sobre como a natureza química dos vanadatos pode ditar a ação quimioprotetora. As proporções de vanádio e dietilsulfato foram avaliadas em uma faixa de 1V:0(dietilsulfato) a 1V:5,0(dietilsulfato), escolhidas por serem compatíveis às concentrações utilizadas nos ensaios biológicos.

O mecanismo de "interceptação de carcinógeno", explorado neste trabalho, foi proposto a partir de estudos com o DNA do plasmídeo pUC19 como modelo por Hamilton e Wilker⁹¹⁹³ e sugere que a atividade quimioprotetora dos polioxometalatos envolve a transferência preferencial de grupos alquil do agente alquilante para o agregado contendo metal, em vez do DNA.^{53; 91} No qual o objetivo é a prevenção da morte celular por meio da interação direta entre o agente alquilante e o oxocomposto (Esquema 1, Seção 1.2.1).

A reação reportada entre o dietilsulfato e o oxovanadato eventualmente leva a produção de um novo oxovanadato, deficiente de um ou mais átomos de oxigênio, e uma molécula de álcool (ROH, com R dependendo do agente alquilante de estudo) menos tóxica as células (Equação 7).



[Equação 7]

Os espectros de RMN de ^{51}V do **V₁₈I** em meio LB com a adição de concentrações crescentes de dietilsulfato, interessantemente, não apresentou sinais relativos a espécies de baixa nuclearidade de vanádio(V) (Figura 34).

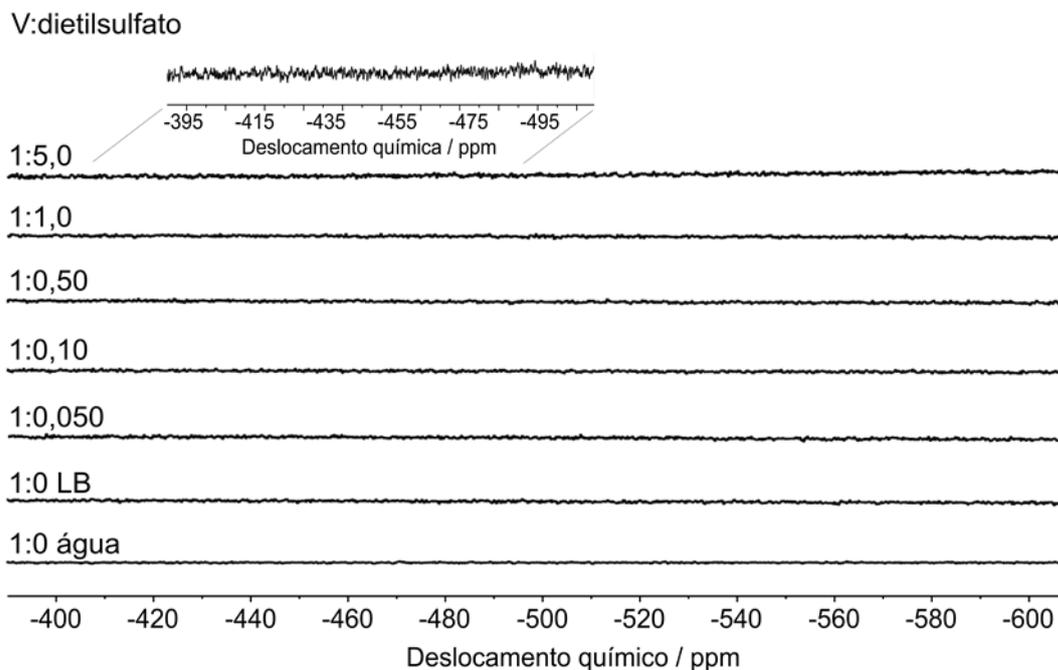


Figura 34 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para **V₁₈I** em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 mmol L⁻¹ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0. Para comparação, o espectro em água sem adição de dietilsulfato é mostrado.

O resultado é consistente com o comportamento observado em solução aquosa apresentado anteriormente. A ausência de sinais de vanádio(V) nos espectros sugere que na reação entre o POV e o dietilsulfato, não ocorre a quebra do agregado que gerariam as espécies de vanádio(V) apresentadas no Esquema 3, ou que essa quebra não gera quantidades suficientes dessas espécies para serem detectadas pelo RMN.

Para o **V₁₈P**, o RMN de ^{51}V apresentou resultados similares aqueles reportados para o **V₁₄** e o **V₁₅**.^{52; 53-140} Os espectros até a condição de 1V:0,10(dietilsulfato) apresentam a formação e o consumo consecutivo das espécies de baixa nuclearidade: “V₁+PV”,¹⁰⁵ gerado pelo rápido equilíbrio entre o “V₁” (H₂VO₃⁴⁻) e o complexo de vanádio com fosfato (PV = HVPO₇³⁻),⁴⁵ “V₂” e “V₄” (V₄O₁₂⁴⁻) (Figura 35). No entanto, não há evidência de qualquer quebra

adicional da estrutura polinuclear quando uma alta concentração de dietilsulfato foi adicionada.

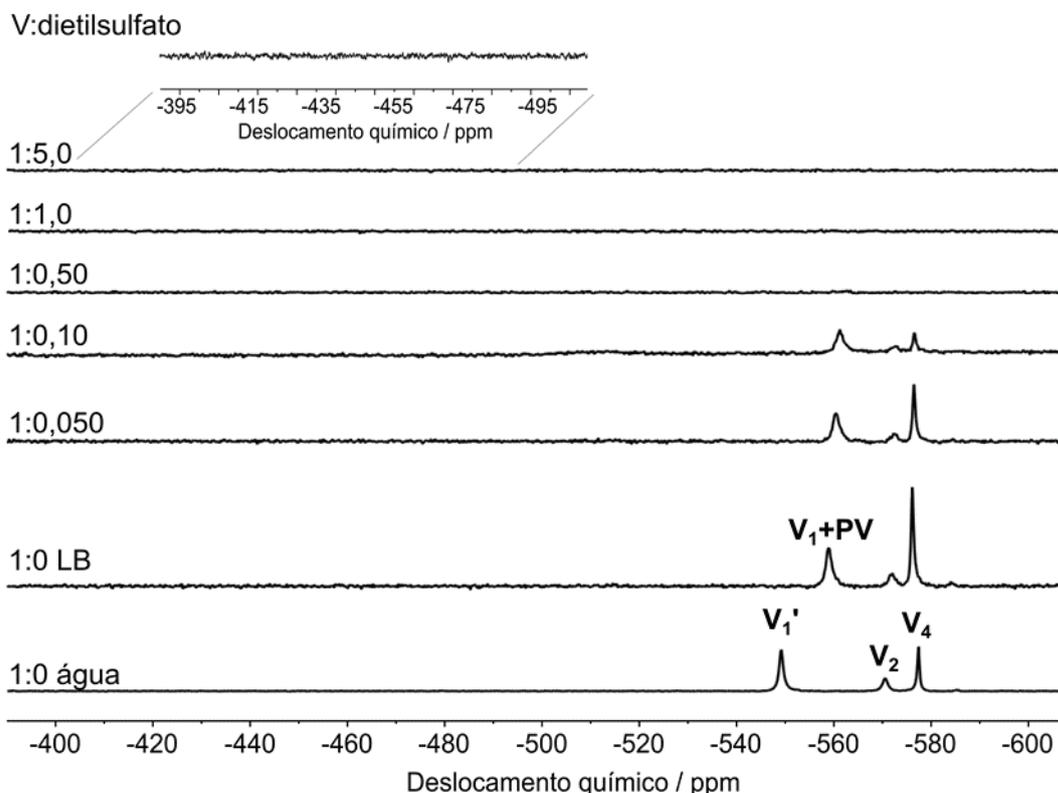
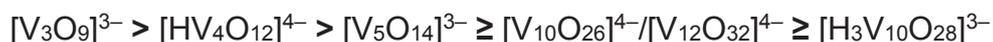


Figura 35 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para V_{18}P em meio LB (pH = 6,0) a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0. Para comparação, o espectro em água sem adição de dietilsulfato é mostrado. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “ V_1 ” = H_2VO_4^- , “PV” = HVPO_7^{3-} , “ V_2 ” = $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$ e “ V_4 ” = $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$.

Estes resultados estão de acordo com os estudos de reatividade reportados em soluções de oligovanadatos em acetonitrila, nos quais os oxoânions $[\text{V}_3\text{O}_9]^{3-}$, $[\text{HV}_4\text{O}_{12}]^{4-}$ e $[\text{V}_5\text{O}_{14}]^{3-}$ foram mais reativos com o dietilsulfato, se rearranjando em outros produtos, do que ânions como o decavanadato, como mostrado na ordem de reatividade abaixo.⁹¹ Nestes trabalhos, reporta-se que cada produto rearranjado deficiente em um átomo de oxigênio, formado por uma reação do oxometálico com o grupo alquila do dietilsulfato, pode se rearranjar ainda em uma ou mais espécies polinucleares.^{91; 92}



Nossos resultados indicam que, se ocorre uma reação direta entre os polioxovanadatos **V₁₈I** e **V₁₈P** com o agente alquilante, ela não produz espécies de menor nuclearidade de vanádio(V), na escala de tempo da análise de RMN, como produto final. Isso porque essas espécies diamagnéticas seriam detectadas pelo RMN de ⁵¹V, diferentemente de espécies paramagnéticas como os agregados polinucleares de valência mista.

Em contraste, foi demonstrado que o **V₁₄** e **V₁₅**⁵³ em condições similares sofrem quebra de suas estruturas e rearranjo para formar o ânion decavanadato(V) em condições de baixa atividade quimioprotetora. Interessantemente, a formação do **V₁₀** não foi observada para as soluções de **V₁₈P** e **V₁₈I**.

A avaliação da reação do decavanadato com dietilsulfato nas mesmas condições experimentais utilizadas para o **V₁₈I** e **V₁₈P** também foi realizada. As condições empregadas aqui foram diferentes das reportadas anteriormente,⁹¹ utilizando meio de cultura LB ao invés de acetonitrila, embora seja possível fazer uma correlação entre os dados.

O espectro apresenta sinais atribuídos ao $[H_2V_{10}O_{28}]^{4-}$ e **V₄** até a proporção de 1V:0,10(dietilsulfato). Nossos resultados mostram alterações do grau de protonação do **V₁₀**, que passa de $[H_2V_{10}O_{28}]^{4-}$ para $[H_4V_{10}O_{28}]^{2-}$ a partir da proporção de 1V:0,50(dietilsulfato) refletindo a variação de pH do meio (Figura 36).

Na maior concentração de dietilsulfato, 1V:5,0(dietilsulfato), o $[H_4V_{10}O_{28}]^{2-}$ sofre uma hidrólise parcial formando uma pequena quantidade de **V₁'** (HVO_4^{3-}), normalmente observado em soluções ácidas de vanadato. Os dados obtidos até o momento em meio aquoso concordam com estudos anteriores que descrevem o decavanadato como um oxometalato de baixa reatividade em contato com dietilsulfato em acetonitrila.⁹¹

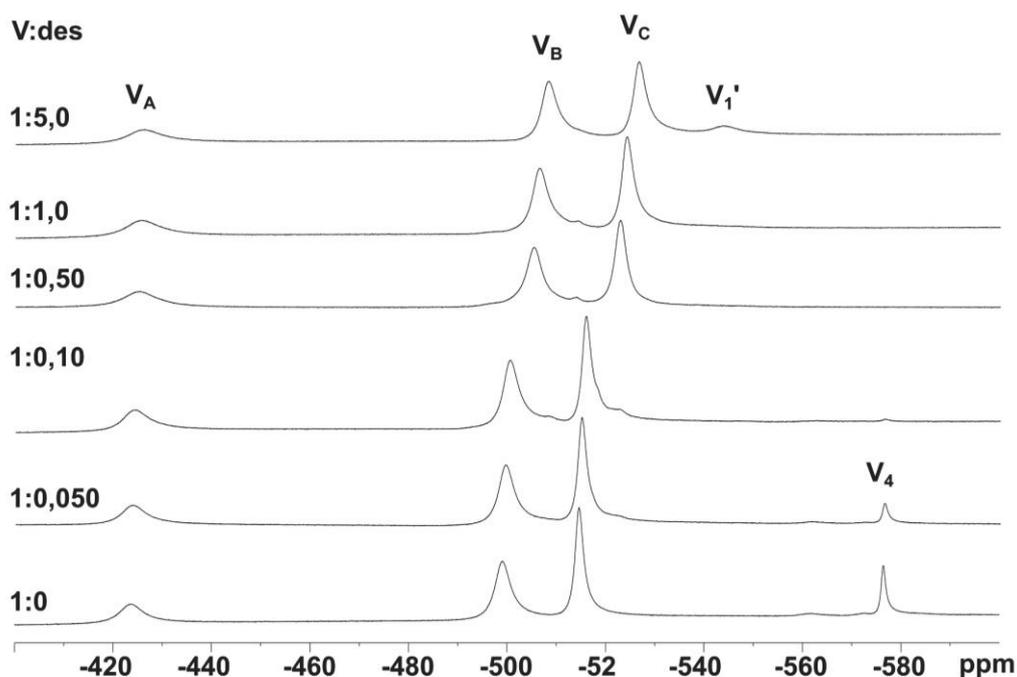


Figura 36 Espectros de RMN de ^{51}V realizado para o V_{10} em meio LB (pH = 6,0) a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato, des) em proporção V:dietilsulfato de 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0, com pH variando de 6,0 a 3,0. As espécies de vanádio(V) de baixa nuclearidade identificadas foram “ V_{10} ” = $\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}$ ou $\text{H}_4\text{V}_{10}\text{O}_{28}$, “ V_1' ” = HVO_4^{3-} e “ V_4 ” = $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$.

Os espectros de RPE dos produtos V_{18}P e V_{18}I em meio LB (Figura 37), registrados nas mesmas condições descritas para o RMN de ^{51}V , foram bastante diferentes daqueles realizados em meio aquoso. Como observado na Figura 37, estes apresentam um padrão hiperfino, atribuído aos espectros paralelo e perpendicular de espécies mononucleares de oxovanádio(IV) sobrepostas ao sinal alargado gerado por espécies polinucleares contendo vanádio(IV), ou seja, de valência mista.

Para ambos os POVs, os valores de g e Δ_{pp} do componente polinuclear são similares aos obtidos em meio aquoso, sugerindo que a natureza química da espécie polinuclear foi mantida em meio LB (Tabela 12). Os parâmetros de RPE obtidos por meio da simulação do componente mononuclear nas soluções de V_{18}P e V_{18}I , Tabela 12, demonstram que a espécie formada é fundamentalmente a mesma e difere dos dados reportados para o $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{OH}_2)_5]^{2+}$, ou seja, para a espécie de oxovanádio(IV) comumente formada em soluções aquosas contendo vanádio(IV).

Essa diferença nos parâmetros obtidos para os POVs em meio LB indica que a espécie observada, $V^{IV}O(L)$, pode ser formada pela interação dos centros de vanádio(IV) com algum dos componentes do meio LB. No entanto, espécies mononucleares de vanádio(IV) já foram avaliadas em sua baixa reatividade com o agente alquilante pelo nosso grupo de pesquisa.^{91; 93}

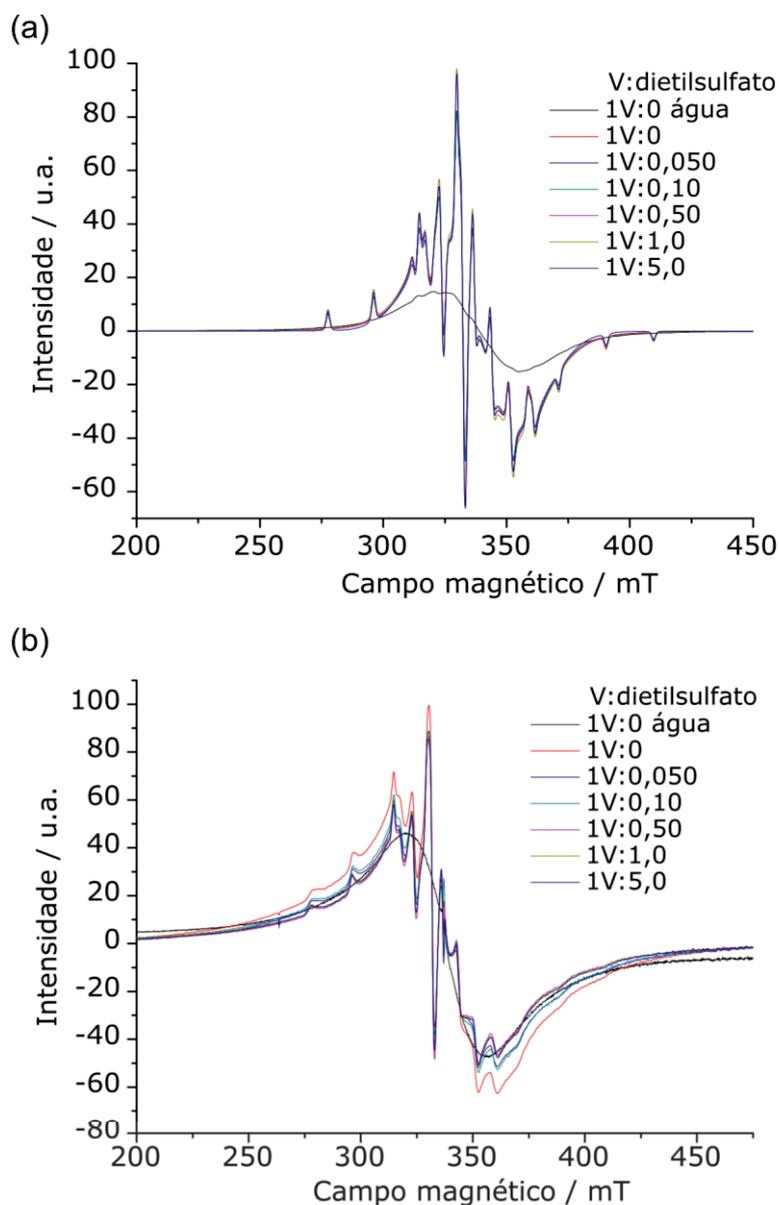


Figura 37 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K na presença de um marcador de MgO/Cr^{III} para (a) $[V_{18}O_{42}]^{7-}$ (V_{18I}) e (b) $[V_{18}O_{41}(PO_4)]^{6-}$ (V_{18P}) em meio LB (pH = 6,0) a 5,0 $mmol L^{-1}$ e concentrações crescentes do agente alquilante (dietilsulfato) em uma proporção V:dietilsulfato de 1:0, 1:0,050, 1:0,10, 1:0,50, 1:1,0 e 1:5,0.

Tabela 12 Parâmetros de RPE de banda X para as espécies polinuclear e mononuclear detectadas a 77K em meio LB (pH = 6,0) dos produtos **V₁₈P** e **V₁₈I**

Composição da solução	Componente polinuclear		Componente mononuclear					
			Tensor-g			Constante de acoplamento hiperfino (A) [10^{-4} cm^{-1}]		
	G	Δ_{p-p} (mT)	g_x	g_y	g_z	A_y	A_x	A_z
$V^{IV}O^{2+}$	-	-	1,9739	1,9752	1,9379	57,69	63,91	171,93
V₁₈I + água	1,9674	33,13	-	-	-	-	-	-
V₁₈P + água	1,9663	36,07	-	-	-	-	-	-
V₁₄ + LB + dietilsulfato	1,9723	34,00	1,9739	1,9752	1,9379	57,69	63,91	171,93
V₁₅ + LB + dietilsulfato	1,975	40,30	1,9746	1,9755	1,9410	55,76	62,96	169,60
V₁₈I + LB + dietilsulfato	1,9674	33,13	1,9753	1,9766	1,9409	54,01	63,84	170,90
V₁₈P + LB + dietilsulfato	1,9664	36,07	1,9759	1,9768	1,9442	54,01	62,39	167,16

$V_{14} = K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$, $V_{15} = [(CH_3)_4N]_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$, concentração dos POVs = 5,0 mmol L⁻¹, dietilsulfato = 6,0 mmol L⁻¹; $V^{IV}O^{2+} = [V^{IV}O(OH_2)_5]^{2+}$.

As simulações levaram à obtenção de dois espectros que podem ser atribuídos a espécies distintas em solução: (i) a espécies polinucleares e (ii) a espécie mononuclear. Por meio destes espectros foi possível quantificar a contribuição relativa destas espécies para a magnetização total do sistema, **V₁₈I** ou **V₁₈P** em solução aquosa e meio LB, por meio da integração dos sinais obtidos, que é dada pela soma da contribuição de cada espécie individualmente (Figura 38 e 39).

Para o **V₁₈I**, foi observado um aumento na contribuição das espécies mononuclear e polinuclear quando em meio LB comparado com a condição de solução aquosa (Figura 37a). No entanto, com o aumento da concentração de dietilsulfato foram observadas diferenças bastante sutis na contribuição das espécies, sugerindo melhor estabilidade em solução desse agregado. Os resultados podem ser correlacionados ao cálculo teórico realizado para um ânion análogo, $[V_{18}O_{42}]^{5-}$, o qual sugere que uma associação dos agregados em solução, assistida pelo contraíon, ⁵⁴ pode contribuir para a manutenção da estrutura polinuclear.

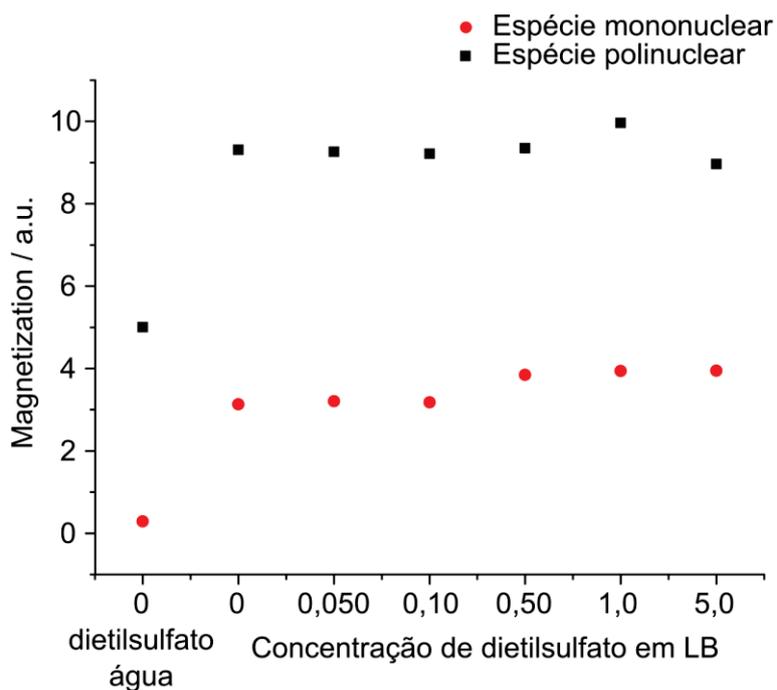


Figura 38 Gráfico de contribuição das espécies mononuclear (em vermelho) e a polinuclear (em preto) para a magnetização total das soluções do produto **V₁₈I** na presença de concentrações crescentes do dietilsulfato. Amostras: 1 – solução aquosa 5,0 mmol L⁻¹; 2 a 6 são as soluções em meio LB (pH = 6,0), 5,0 mmol L⁻¹, com adições crescentes de dietilsulfato nas proporções V:dietilsulfato 1:0,05, 1:0,1, 1:0,5, 1:1 e 1:5, respectivamente.

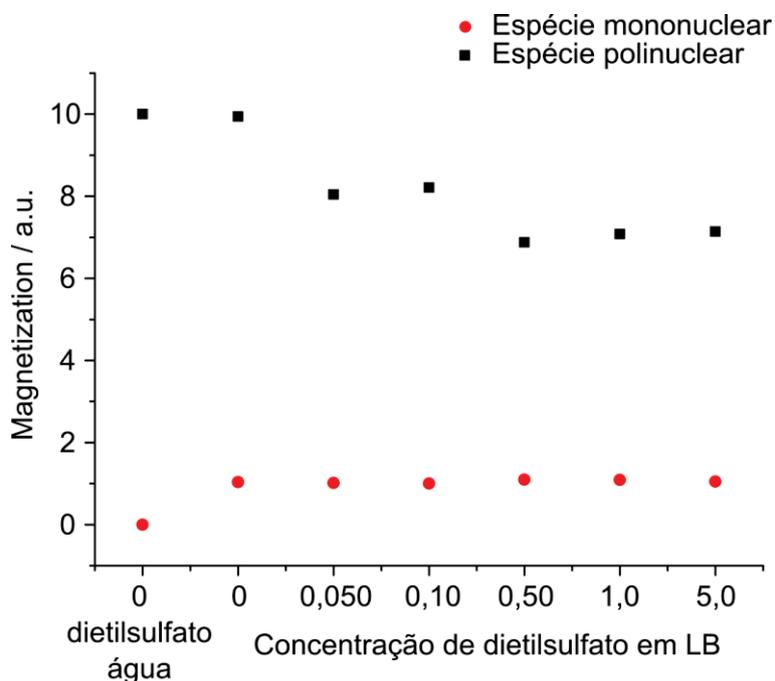
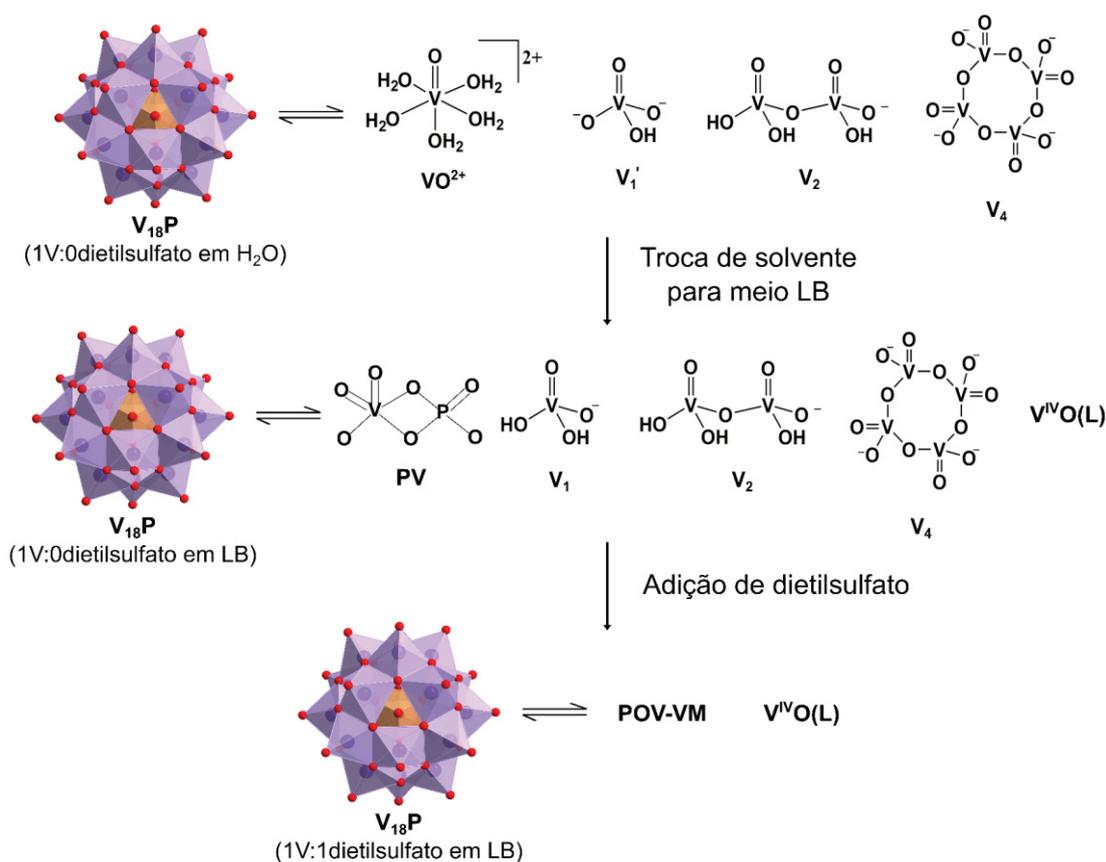


Figura 39 Gráfico de contribuição das espécies mononuclear (em vermelho) e a polinuclear (em preto) para a magnetização total das soluções do produto **V₁₈P** na presença de concentrações crescentes do dietilsulfato. Amostras: 1 – solução aquosa 5,0 mmol L⁻¹; 2 a 6 são as soluções em meio LB (pH = 6,0), 5,0 mmol L⁻¹, com adições crescentes de dietilsulfato nas proporções V:dietilsulfato 1:0,05, 1:0,1, 1:0,5, 1:1 e 1:5, respectivamente.

O $V_{18}P$, revelou-se novamente um sistema mais dinâmico, variando a proporção da contribuição mononuclear e polinuclear em meio LB. A adição de concentrações crescentes de dietilsulfato tornou possível observar uma variação na contribuição da espécie polinuclear para a magnetização total do sistema, especialmente após a adição de maiores concentrações de dietilsulfato (a partir da amostra 4, 1V:0,50(dietilsulfato)).

Uma redução na contribuição das espécies polinucleares para o sistema do $V_{18}P$ e um aumento da contribuição da espécie mononuclear pode ser observada. Essa variação indica a ocorrência de um rearranjo da espécie original, $V_{18}P$, em outras espécies polinucleares. O que pode ainda explicar a ausência de sinais no RMN de ^{51}V acima da condição de 1V:0,10(dietilsulfato) na Figura 35. Uma representação das espécies geradas nas soluções aquosas, meio LB e na presença de dietilsulfato para o $V_{18}P$ é dada no Esquema 5.



Esquema 5 Equilíbrios gerados para o sistema do $V_{18}P$ em solução aquosa, meio LB (pH = 6,0) e com adição de dietilsulfato nas condições utilizadas para a análise espectroscópica das soluções por RMN de ^{51}V e de RPE. Onde POV-VM = polioxovanadato de valência mista não identificado; VO(L) = produto formado das espécies de V^{IV} liberadas após a quebra do agregado e potencial interação com os componentes do meio.

A Tabela 13, mostrada abaixo, contém um resumo das espécies químicas identificadas por meio das análises de RMN de ^{51}V e RPE apresentadas nessa seção, envolvendo espécies de vanádio(V) e vanádio(IV), em comparação aos reportados anteriormente para os POVs **V₁₄** e **V₁₅**. Quando avaliados em conjunto, sugerem que o efeito ou não de quimioproteção não está relacionado apenas à manutenção do agregado polinuclear original no meio de cultura, mas também a um delicado equilíbrio envolvendo espécies aparentemente não tóxicas para as células.

Tabela 13 Composição proposta para a solução aquosa e em meio LB para o **V_{18I}**, **V_{18P}**, **V₁₄**⁵² e **V₁₅**⁵³ na concentração de 5,0 mmol L⁻¹ (*)

Produto	pH ^(a)	Espécies de	Espécies de	Espécies de	Espécies de V ^{IV(c)}
		V ^{V(b)}	V ^{IV(c)}	V ^{V(b)}	
Meio aquoso			Meio LB		
V_{18I}	6,0	Nenhuma	POV-VM ^(d)	Nenhuma	POV-VM, VO(L) ^(e)
V_{18P}	5,0	V _{1'} , V _{2'} , V ₄	POV-VM, VO ²⁺	V ₁ +PV, V ₂ , V ₄	POV-VM, VO(L)
V₁₅	6,3	V ₁ , V ₂ , V ₄ , V ₅	POV-VM, VO ²⁺	V ₁	POV-VM, VO(L)
V₁₄	4,2	V _{14'} , V ₁₀	POV-VM	V ₁₀	POV-VM, VO(L)
V₁₀	4,0	V ₁₀	Nenhuma	V ₁₀ , V ₁	Nenhuma

(*) Essa tabela apresenta um sumário dos resultados de RMN e RPE apresentados nesta seção. (a) pH obtido após solubilização em água, exceto para o **V₁₀** para o qual o pH foi ajustado. (b) Determinado por RMN de ^{51}V . (c) Determinado por RPE em banda X. (d) POV-VM = polioxovanadato de valência mista não identificado. (e) VO(L) = produto formado das espécies de V^{IV} liberadas após a quebra do agregado e potencial interação com os componentes do meio.

3.2.5. Considerações sobre o sistema

3.2.5.1. Síntese de polioxovanadatos de valência mista

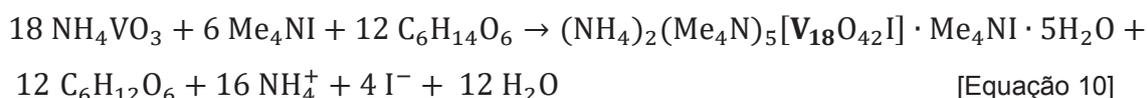
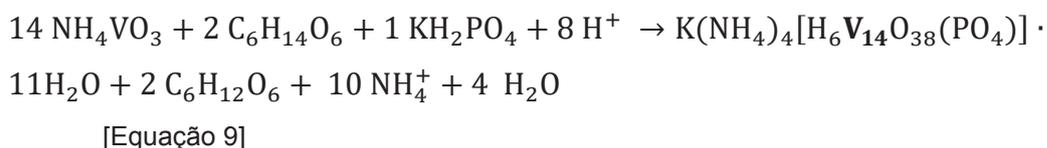
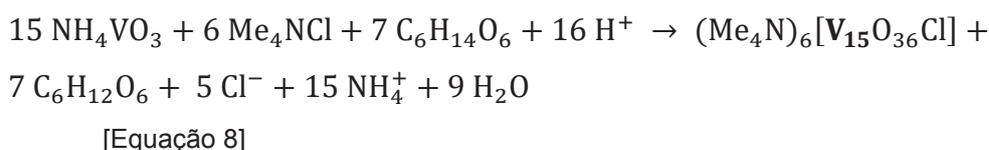
A síntese de polioxovanadatos apresenta vários desafios, como controlar o grau de redução dos centros de vanádio(V) e a sua nuclearidade, uma vez que esses agregados são geralmente produzidos por automontagem. Alguns estudos apontam para a possibilidade de se realizar uma oxidação/ redução gradativa dos octadecavanadatos por métodos eletroquímicos;^{33; 54} entretanto, a reprodução desses em escala sintética permanece um desafio. Deve-se ainda

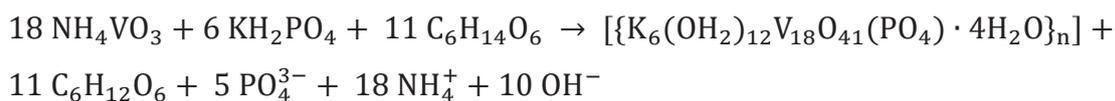
considerar que mudanças sutis em algumas condições experimentais podem produzir POVs completamente diferentes ou mesmo óxidos, como $V_3O_8^{2-}$.³²

Na última década, nosso grupo de pesquisa fez um grande esforço para desenvolver uma rota sintética de condições brandas, baixo custo e altamente reprodutível para obtenção de polioxidovanadatos de valência mista como produtos cristalinos puros com rendimento variando de moderado a alto.^{52; 53} Nos trabalhos anteriores, foram obtidos POVs com 15 e 14 centros de vanádio contendo Cl^- (**V15**) e PO_4^{3-} (**V14**) encapsulados (Equações 8 e 9).

A proposta inicial desta tese baseia-se em avaliar o efeito do tamanho do ânion encapsulado substituindo cloreto por iodeto, assim como, o número de centros de vanádio em polioxovanadatos contendo o mesmo ânion encapsulado. Para isso, o $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V_{18}O_{42}I] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$ (**V18I**, Equação 10) foi preparado através da mesma rota que produziu o **V15**, substituindo a fonte do ânion encapsulado, Me_4NCl , pelo análogo Me_4NI . Como esperado, a nuclearidade do POV foi determinada pelo tamanho do haleto encapsulado, ou seja, o Cl^- (raio = 181 pm) produziu o **V15** e o I^- (raio = 220 pm), produziu o **V18**.

O produto isolado com o ânion fosfato foi mais suscetível às condições da reação utilizadas. Na qual, o uso de KH_2PO_4 sob condições ligeiramente ácidas ($pH \cong 6$) produziu o $K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ (**V14**),^{52; 53} enquanto o ajuste do pH da mistura de reação inicial para 9,4 levou a obtenção do $[K_6(OH_2)_{12}V_{18}O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O]_n$ (**V18P**) puro (Equação 11).





[Equação 11]

Duas rotas sintéticas empregando o sal KH_2PO_4 foram utilizadas para obtenção do **V₁₈P**, diferindo no agente redutor utilizado (manitol ou ácido málico). Todas as reações geraram cristais apropriados para análise de DRX-monocristal, no entanto após as caracterizações, verificou-se que o mesmo POV foi obtido. Portanto, os produtos receberam o mesmo código **V₁₈P**.

A oxidação das moléculas orgânicas pelos compostos de vanádio(V) é conhecida na literatura ^{163; 164} e descrita por ocorrer através de mecanismo radical com a velocidade da reação e grau de redução dependente da acidez do meio e da facilidade com que as moléculas orgânicas são oxidadas. ¹⁶⁵ Por exemplo, Littler e Waters ¹⁶³ realizaram estudos da oxidação de álcoois por vanadatos, no qual propõe a formação de espécies de vanádio(IV) e de radicais orgânicos a partir dos precursores, o álcool e o vanadato(V). E neste caso, foi observado que com a substituição do agente redutor manitol pelo ácido málico o rendimento do **V₁₈P** quase dobrou.

Os agregados contendo 18 centros de vanádio têm sido amplamente relatados com uma grande variedade de íons encapsulados, como Cl^- , PO_4^{3-} , I^- , CN^- e H_2O , ^{29; 143; 152; 166; 167} dentre outros, assim como nos contraíons. Outros POVs análogos aos descritos aqui foram sintetizados por uma metodologia de síntese mais complexa, na qual os reagentes precisam ser preparados antes da incorporação do ânion. ^{29; 143; 152; 166; 167}

3.2.5.2. *Papel de polioxovanadatos de valência mista do tipo {V₁₈} como agentes quimioprotetores*

Os estudos da atividade quimioprotetora dos POVs contra o efeito tóxico do agente alquilante dietilsulfato em culturas de *E. coli* revelou que **V₁₈I** foi mais efetivo na proteção do sistema do que o **V₁₈P** e o **NaV₁₀**, com uma quimioproteção de 35%, enquanto o **V₁₈P** levou a um aumento da toxicidade do agente alquilante (Esquema 6).

Ao avaliar os resultados dentro do contexto de todos os POVs já investigados pelo grupo, apresentados no Esquema 6, podemos observar que os polioxoânions contendo haleto encapsulado no centro da estrutura, Cl^- ou I^- , apresentaram uma melhor atividade quimioprotetora quando comparados aos contendo fosfato no centro e ao ânion decavanadato. Os ensaios biológicos combinados com os estudos espectroscópicos sugerem que a presença do haleto auxilia na manutenção da estrutura do agregado em solução o que pode ser atribuído à força da interação do ânion com o agregado ou até mesmo o raio do ânion (cloreto 1,81 Å, iodeto 2,06 Å e fosfato 1,95 Å).

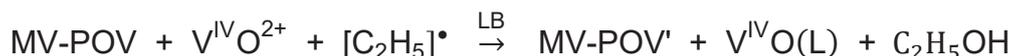
Por sua vez, os POVs contendo o fosfato em sua estrutura sofrem uma quebra em solução mais pronunciada nas condições avaliadas. Para o **V₁₄**, sua estrutura pode ser considerada pequena para acomodar o fosfato gerando a instabilidade observada em solução. Na presença do agente alquilante, o **V₁₄** leva ainda a um aumento da toxicidade observada no sistema, atribuída a combinação dos efeitos de ambos os agentes com a formação de **V₁₀** no meio.⁵² Para o **V_{18P}**, a menor estabilidade do agregado pode também estar relacionada ao tamanho do fosfato encapsulado (3,06 Å) e da cavidade (7,11 a 7,16 Å), uma vez que, o tamanho da sua cavidade é similar ao apresentado pelo **V₁₄** (7,00 a 7,07 Å).

A reatividade dos grupos oxo e a estabilidade dos POVs em solução ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que dependem da carga, do tamanho, da geometria e do estado de oxidação do metal, da posição dos grupos oxo (terminal ou em ponte) e de fatores externos, como temperatura e pH. Assim como, podem se mostrar dependentes da interação destes agregados com os alvos biológicos.^{33; 34}

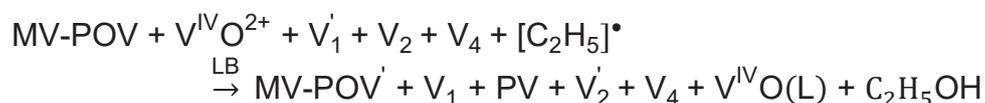
Da mesma forma, estudos teóricos do potencial eletrostático de POVs mostraram que as propriedades superficiais do polioxoânion mudam com a razão $\text{V}^{\text{IV}}/\text{V}^{\text{V}}$, onde potenciais eletrostáticos mais negativos foram observados para agregados com cargas moleculares mais negativas, como observado na Figura 7 (Introdução).³³ Quando observado no contexto do presente trabalho, indica que $[\text{V}^{\text{IV}}_{12}\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{42}]^{7-}$ (**V_{18I}**) tem uma densidade de carga mais alta que $[\text{V}^{\text{IV}}_9\text{V}^{\text{V}}_9\text{O}_{42}(\text{PO}_4)]^{6-}$ (**V_{18P}**), aumentando a sua nucleofilicidade e tornando-o mais disponível para agir como agente quimioprotetor do que o **V_{18P}**, conforme sugerem estudos prévios de Wilker e colaboradores.

As equações a seguir aplicam essa proposta para os sistemas polinucleares de valência mista descritos nesse trabalho. As espécies contendo vanádio em cada equação são baseadas nos resultados dos nossos estudos por RMN de ^{51}V e RPE em solução aquosa e em LB e, portanto, envolve espécies diamagnéticas e paramagnéticas.

V₁₈I



V₁₈P



$\text{V}^{\text{IV}}\text{O(L)}$ = produto formado pelas espécies de V^{IV} liberadas pela quebra do POV e os potenciais ligantes do meio LB; $\text{V}_1 = \text{H}_2\text{VO}_4^-$; " V'_1 " = VO_2^+ ; $\text{PV} = \text{HVPO}_7^{3-}$; $\text{V}_2 = \text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$; " V'_2 " = $\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$; $\text{V}_4 = \text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$; $[\text{C}_2\text{H}_5]^{\bullet}$: grupo alquila fornecido pelo dietilsulfato.

Nossos resultados de quimioproteção podem ainda ser interpretados sob a luz da hipótese de um mecanismo de proteção do DNA envolvendo uma transferência preferencial do grupo alquila do agente alquilante para a espécie contendo vanádio, ao invés de para o DNA, levantada por Wilker e coautores.^{91;}
⁹³ Presume-se que a atividade quimioprotetora de cada POV esta correlacionada com sua estabilidade no meio biológico e em especial a formação de espécies de vanádio mais tóxicas ou não reativas no meio após a reação com dietilsulfato.

Os poliânions **V₁₈I** e o **V₁₅**⁵³ descrito anteriormente parecem, portanto, ser os poliânions mais promissores com a melhor relação estabilidade-atividade observada. Finalmente, estudos mais aprofundados são incentivados visando o desenho de medicamentos mais eficazes e seletivos, uma vez que, se confirmada em outros modelos biológicos, a atividade preventiva relatada aqui pode ser de interesse para o melhorar o uso terapêutico de compostos contendo vanádio.

3.3. Estudo da capacidade inibitória de POVs no crescimento de culturas de *Mycobacterium smegmatis*

Doenças infecciosas são causadas por diferentes organismos patogênicos e listadas entre as doenças mais mortais do mundo.⁹⁴ Dentre estas, destacam-se as infecções causadas por micobactérias, como a *Mycobacterium tuberculosis* causadora da tuberculose, a qual é caracterizada pela elevada morbidade e mortalidade geralmente relacionada às condições socioeconômicas nos países mais afetados.

No mundo, estima-se a ocorrência de 10 milhões de casos de infecção em 2017, dos quais aproximadamente 85% são relatados em países em desenvolvimento.⁹⁴ No Brasil, a situação não é diferente, pois aproximadamente 79 mil casos novos e recidivantes foram registrados em 2017, gerando um quadro alarmante, que se agrava em aproximadamente 10% dos casos, ou seja, para cerca de 7 mil pessoas que vivem também com HIV.¹⁶⁸

O protocolo de tratamento padrão para a tuberculose foi implementado originalmente na década de 60 e requer que o paciente seja tratado durante seis meses com fármacos de primeira-geração como a rifampicina, a isoniazida, o etambutol, a pirazinamida e a estreptomicina. O tratamento da tuberculose é considerado caro, prolongado e provoca vários efeitos colaterais.¹⁶⁹ Apesar dos avanços significativos na pesquisa e tratamento das doenças infecciosas, o controle e a erradicação dessas ainda enfrentam desafios, como a resistência adquirida pelas bactérias às drogas de tratamento padrão. Resultando na necessidade de aplicação do tratamento combinado com drogas de segunda-geração, aumentando o custo do tratamento em 20 vezes, assim como o tempo de terapia.⁹⁴ Consequentemente, há necessidade do desenvolvimento de novos agentes antituberculose com mecanismos de ação distintos, para que a resistência possa ser superada.

Até o momento, evidências de atividade antituberculose de vários modelos contendo metais de transição, nos quais a lipofilicidade, os estados de oxidação e a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio podem ser aliados na busca por medicamentos alternativos. O potencial de complexos de vanádio só passou a ser avaliado recentemente, inspirado no fato de que o vanádio nos estados de oxidação (IV) e (V) tem se mostrado efetivo em sua ação

anticâncer e em seu efeito como insulínomimético.⁹⁵ Complexos de vanádio(V) de hidroxiquinolinas⁹⁷ e fluoroquinolinas⁹⁸ tem sido avaliados, apresentando potencial inibitório contra a *Mycobacteria tuberculosis* na ordem de micromolar com valores similares ao da estreptomicina, fármaco de segunda geração.

A ação antimicobacteriana do V₁₀ foi previamente estudada pelo grupo de Crans em duas cepas de micobactérias, a *Mycobacterium tuberculosis* (IC₅₀ = 2,9 μmol L⁻¹) e *Mycobacterium smegmatis* (IC₅₀ = 3,7 μmol L⁻¹) e relatada em 2018.¹⁰⁵ O maior potencial de inibição de crescimento da espécie polinuclear em relação ao monovanadato (H₂VO₄⁻, V₁, IC₅₀ de 190-200 μmol L⁻¹) demonstrou que outros oxometalatos poderiam possuir papel inibitório diferenciado do V₁, conhecido por ser um inibidor potente de fosfatases.¹⁰⁵

Na busca pela compreensão dos fatores que levam a um melhor desempenho do V₁₀ em relação ao V₁, dois decametalatos heterometálicos em que um átomo de vanádio foi substituído por molibdênio e por platina em [V₉MoO₂₈]⁵⁻ (V₉Mo) e [H₂PtV₉O₂₈]⁵⁻ (V₉Pt) foram avaliados (Seção 1.3 da Introdução).¹⁰⁶ Para tais estudos, empregou-se a *M. smegmatis* como modelo primário não patogênico da *M. tuberculosis* por ser oferecer benefícios técnicos, como um menor tempo de crescimento e menor risco para o pesquisador quando comparada a *M. tuberculosis*.¹⁷⁰ Em comum as duas cepas de micobactérias possuem a presença de uma membrana muito espessa, em comparação com *E. coli*, por exemplo, e são conhecidas por serem muito hidrofóbicas e impenetráveis por diversos compostos, tornando o desenvolvimento de drogas antituberculose muito desafiador.^{171; 172}

Os estudos com os decametalatos heterometálicos, V₉Mo e V₉Pt, foram desenvolvidos durante o período do doutorado sanduíche publicados em janeiro de 2021¹⁰⁶ e serão incluídos na tese da doutoranda Kateryna Kostenkova. Os ensaios mostraram que o V₁₀ é o inibidor mais potente, com o V₉Pt apresentando uma IC₅₀ comparável de 4,8 μmol L⁻¹ e maior estabilidade nas condições do crescimento micobacteriano, confirmada por estudos espectroscópicos realizados como contribuição da doutoranda para o trabalho. O V₉Mo foi 4 vezes menos efetivo que o V₉Pt, o que pode ser associado à sua baixa estabilidade no meio de cultura. Esses compostos mostraram que as diferenças estruturais em relação do decavanadato causam modificações tanto no efeito inibitório quanto na estabilidade do agregado nas condições de crescimento micobacteriano.

Os dados apresentados acima nos levaram a questionar qual seria o efeito dos polioxovanadatos de valência mista sobre o crescimento das culturas de micobactéria. Novamente para este estudo foi empregada a cepa da *M. smegmatis* cultivada em condições similares as descritas nos trabalhos anteriores. Os POVs **V₁₄** e **V₁₅** (Figura 40) foram inicialmente selecionados por terem suas rotas sintéticas bem estabelecidas e por já conhecermos as espécies químicas presentes em solução, ⁵² diferente dos POVs do tipo {**V₁₈**} que ainda estavam sendo estudados. É importante notar que este é o primeiro relato do uso de POVs de valência mista no estudo da inibição do crescimento de micobactérias e que seu estudo compreende um grande passo no sentido da avaliação de espécies mais complexas.

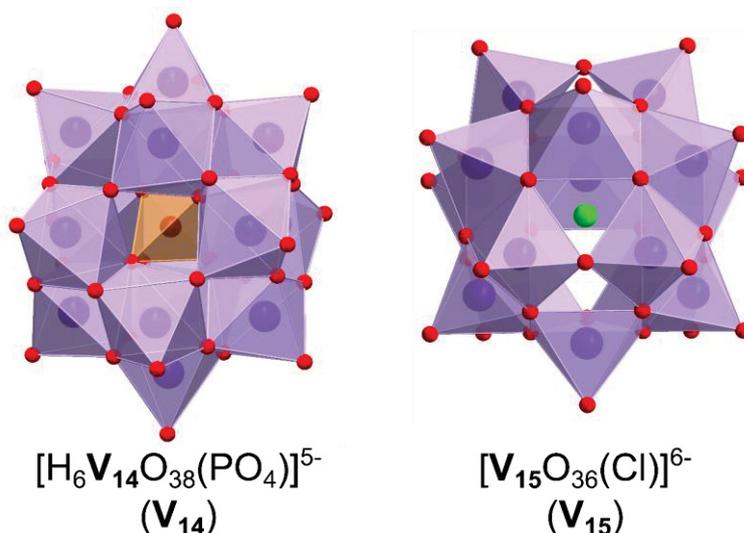


Figura 40 Representação da estrutura em poliedros dos compostos $[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)]^{5-}$ (**V₁₄**) e $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]^{6-}$ (**V₁₅**).

Os resultados apresentados nesta seção foram obtidos na CSU sob a supervisão da Profa. Dra. Debbie C. Crans durante o estágio sanduíche realizado pelo programa CAPES/Print no período de Junho/2019 a Março/2020. Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o professor Dr. Dean C. Crick e conduzidos pelo doutorando Zeyad Arhouma.

3.3.1. Avaliação da inibição do crescimento de *Mycobacterium smegmatis*

O efeito do V_{14} e do V_{15} , no crescimento das culturas de *M. smegmatis* foi determinado em meio de cultura 7H9 por meio da densidade óptica, monitorando a absorbância das culturas em comprimento de onda de 600 nm e concentrações de 2,0 a 0,00010 mmol L⁻¹. A inibição causada pelo tratamento da cultura bacteriana com V_{15} se mostrou mais potente que os efeitos observados para o V_{14} , com valores de IC₅₀ 1,9 e 29 μmol L⁻¹, respectivamente, como mostra a Figura 41.

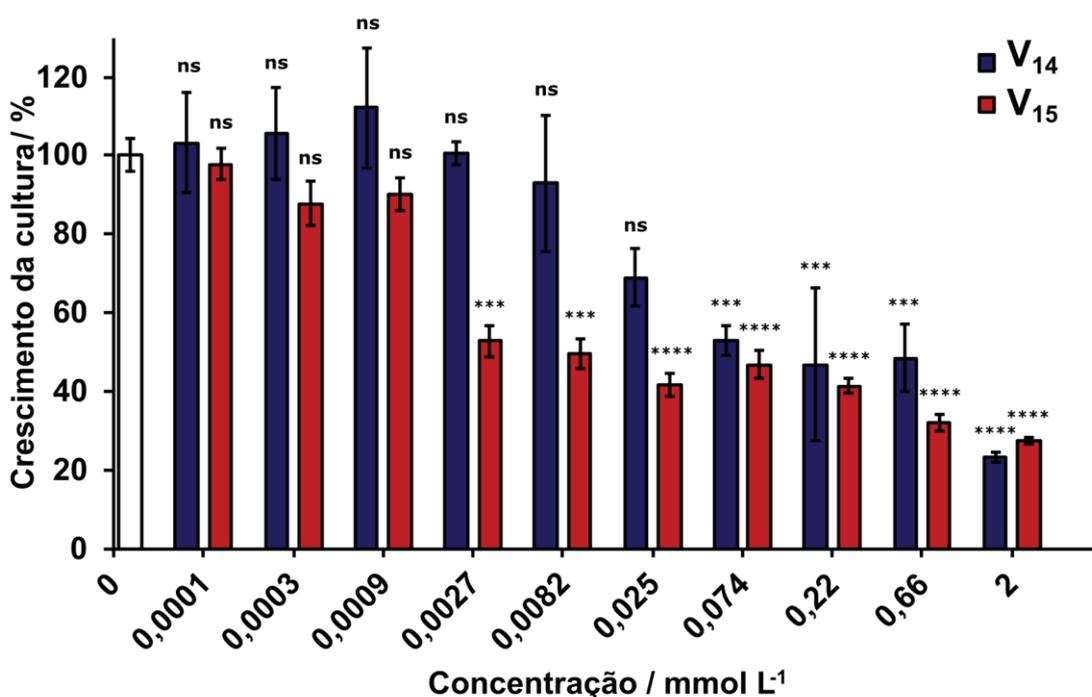


Figura 41 Curva de crescimento da cultura celular para *M. smegmatis* tratada com $K(NH_4)_4[H_6PV_{14}O_{42}] \cdot 11H_2O$ (V_{14} , azul) e $[Me_4N]_6[V_{15}O_{36}Cl]$ (V_{15} , vermelho) com concentrações variando de 0,00010 a 2,0 mmol L⁻¹. O desvio padrão é apresentado para os experimentos realizados em triplicata. Os dados foram obtidos por três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média com desvio padrão. Valores de P, ANOVA corrigida por Tukey, *P<0,01, **P<0,001, ***P≤0,0001, ****P<0,0001, ns = não significativo quando comparado ao controle na presença de des.

A Tabela 14 mostra que o V_1 apresenta efeito limitado na inibição do crescimento das culturas de *M. smegmatis* (190 μmol L⁻¹), enquanto o V_{10} apresentou um IC₅₀ de 3,7 μmol L⁻¹.¹⁰⁵ O V_{15} foi portanto, mais efetivo em sua

atividade inibitória do que o V_{10} por um fator de 2 em termos de concentração, enquanto que o V_{14} se mostrou 8 vezes menos efetivo que o V_{10} .

Tabela 14 Valores de IC_{50} para os compostos V_{14} , V_{15} , V_{10} , e V_1 avaliados em sua atividade inibidora em culturas de *M. smegmatis*

	IC_{50} $\mu\text{mol L}^{-1}$	Desvio padrão	Referência
V_{14}	29	± 13	-
V_{15}	1,9	$\pm 0,90$	-
V_{10}	3,7	$\pm 0,40$	105
V_1	190	± 71	105
$V_9\text{Pt}$	4,8	$\pm 0,80$	106
$V_9\text{Mo}$	15	$\pm 8,0$	106
Isoniazida	5,4	--	105

Esses estudos mostram que os POVs-VM apresentam um efeito mais pronunciado quando comparados ao V_1 , novamente refletindo o efeito pronunciado das espécies polinuclearidade.^{173; 174} No entanto, as variações da atividade dos diferentes polioxovanadatos refletem uma resposta combinada a todas as espécies formadas no meio de cultura (Ver considerações sobre a especiação dos compostos abaixo).

Os erros observados para os experimentos com o V_{14} parecem ser inerentes ao sistema, mesmo após várias repetições, enquanto os erros do V_{15} são muito pequenos. Essa observação pode estar relacionada as espécies químicas de vanádio que estão se formando em solução e a química bastante dinâmica que o V_{14} apresenta,⁵² podendo variar de acordo com a concentração e condições do meio, nos levando a realizar estudos espectroscópicos que auxiliassem na identificação das espécies químicas presentes em solução.

Nas seções seguintes serão apresentados espectros representativos do estudo realizado em água, no meio 7H9 e no sobrenadante das culturas. Um conjunto completo de espectros poderá ser encontrado nos Apêndice 2.

3.3.2. Estudo da especiação do V_{14} e do V_{15} em solução aquosa no tempo

Os polioxovanadatos são conhecidos por exibir uma química em solução aquosa complexa como apresentado nas seções anteriores.³⁵ Os espectros de RMN de ^{51}V para V_{14} e V_{15} em concentrações de 0,20 e 1,0 mmol L⁻¹ foram avaliados visando determinar a sua estabilidade em solução aquosa através do tempo, considerando o limite de detecção da técnica e as concentrações avaliadas no ensaio biológico. Os resultados foram similares, portanto, será apresentado apenas os espectros da concentração mais alta (Figura 42).

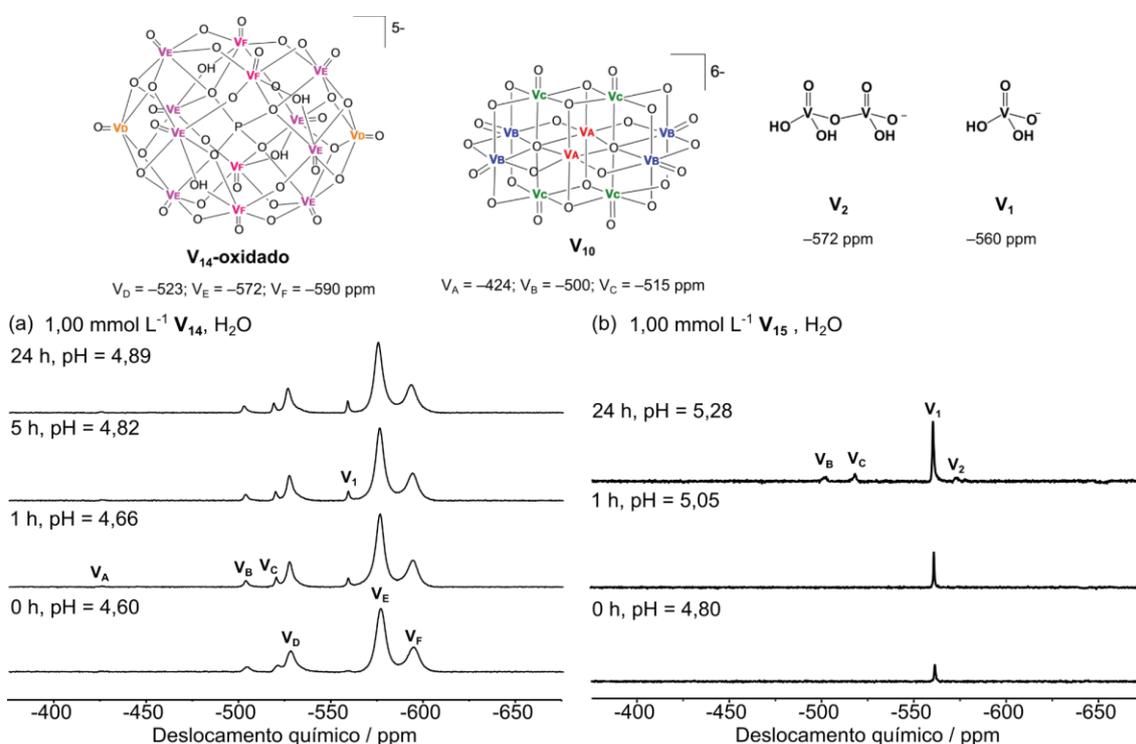


Figura 42 Espectros de RMN de ^{51}V para (a) V_{14} e (b) V_{15} em solução aquosa de 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas são V_1 ($H_2VO_4^-$), V_2 ($H_2V_2O_7^{2-}$), V_{14} -oxidado (V_{14}^{V} , $H_4V_{14}O_{42}P^{5-}$) e V_{10} ($HV_{10}O_{28}^{5-}$).

O espectro do V_{14} em 1,0 mmol L⁻¹ mostra um sinal de baixa intensidade atribuído ao V_1 , em sua forma $H_2VO_4^-$, dois sinais atribuídos ao V_{10} e três sinais com $\delta = -523$, -572 e -590 ppm característicos da espécie totalmente oxidada $H_5V_{14}O_{42}P^{5-}$ (V_{14} -oxidado ou V_{14}^{V}). Essa espécie é gerada devido a oxidação do V_{14} de valência mista em solução e é estruturalmente semelhante ao

polioxovanadato de origem.⁴⁵ O **V₁₄** de valência mista não é detectado por espectroscopia de RMN pois contém dois centros de vanádio(IV) em sua estrutura.

O monitoramento da solução em função do tempo mostra um aumento na intensidade dos sinais relativos ao **V₁** e **V₁₀**, tornando visível o terceiro e menos intenso sinal do **V₁₀** em -423 ppm, e uma alteração no pH de 4,60 a 4,89 indicando processos de oxidação e hidrólise do **V₁₄** em espécies de menor nuclearidade.

Assim como o **V₁₄**, a estrutura do polioxoânion em **V₁₅** contém 8 centros de vanádio(IV) e não é observável por RMN de ⁵¹V. O espectro de RMN para as soluções aquosas do **V₁₅** (Figura 42b) apresentou sinais atribuídos ao **V₁** e **V₂**. É importante apontar que quando o POV de valência mista sofre hidrólise em solução aquosa íons **V^{IV}** e **V^V** são formados. No entanto, os íons de **V^{IV}** são gradualmente oxidados, aumentando a intensidade dos sinais relativos a espécies de menor nuclearidade no espectro de RMN, como o **V₁** e o aparecimento de dois dos sinais relativos ao **V₁₀** após 24 h. Contudo, a baixa concentração de **V^V** em solução é indicada pela baixa intensidade dos sinais presentes no espectro, mesmo após 24 h, sugerindo que o **V₁₅** permanece parcialmente intacto.

Os espectros de RPE em solução aquosa de 1,0 mmol L⁻¹ do **V₁₄** e **V₁₅** a 77 K foram estudados em trabalhos anteriores do grupo no tempo inicial em diferentes concentrações (Figura 43).^{52, 45} O espectro de RPE do **V₁₄** mostra que a espécie polinuclear predomina no tempo inicial ($g = 1,972$ e $\Delta_{pp} = 34$ mT), porém com o tempo (Figura 43), esse sinal reduz de intensidade, dando origem ao sinal relativo a formação de uma espécie mononuclear de vanádio(IV) após 24h de incubação.

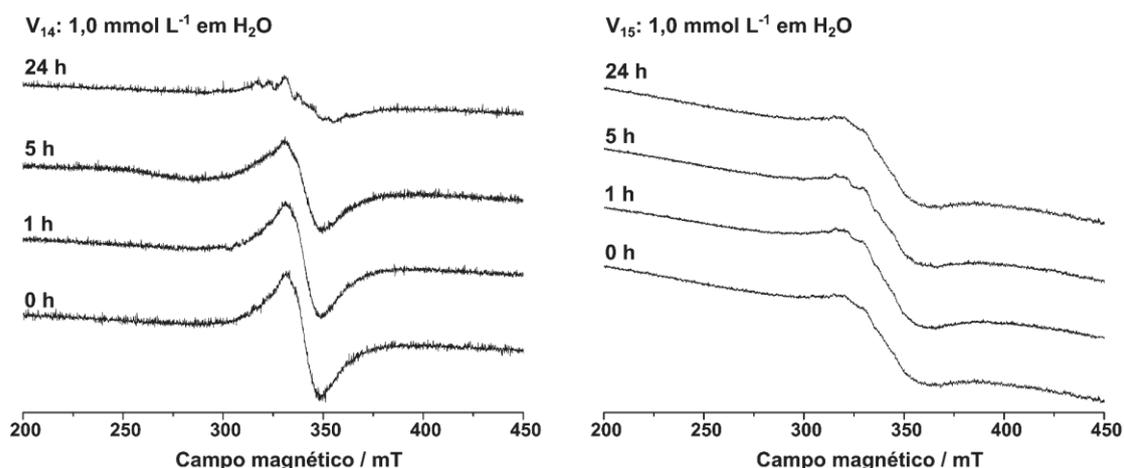


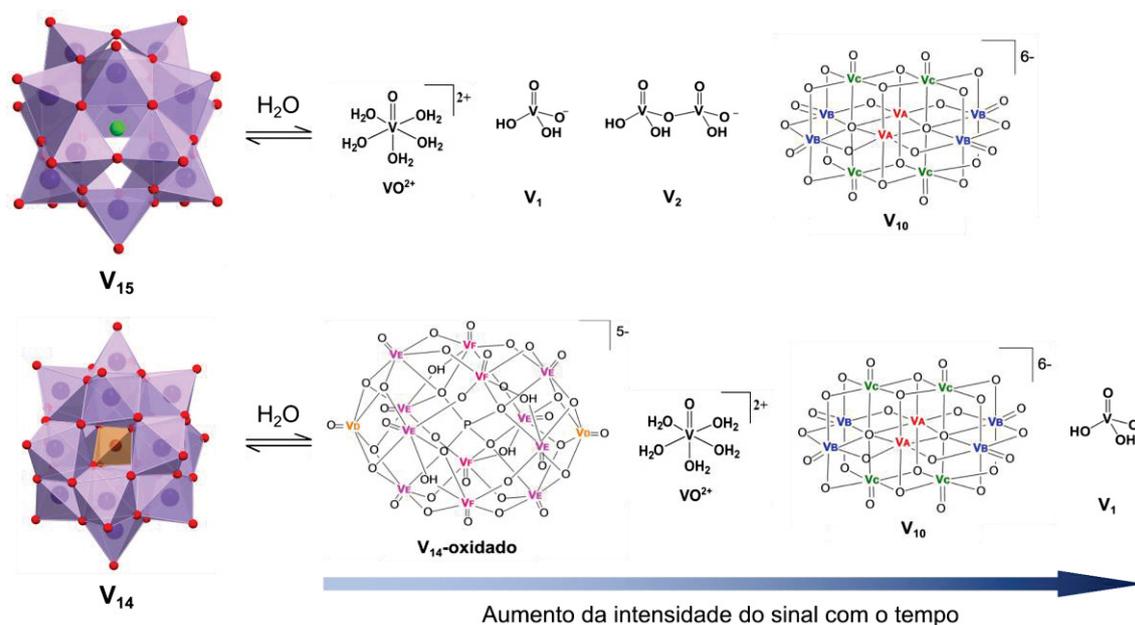
Figura 43 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K para V_{14} e V_{15} em solução aquosa a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com variação no tempo de 0, 1, 5 e 24 h.

Estudos do V_{15} com a variação no tempo, mais uma vez, apontaram para a maior estabilidade relativa deste polioxovanadato em solução. Assim como observado aqui, estudos de RPE do V_{15} em solução aquosa anteriores evidenciaram o predomínio da espécie polinuclear contendo valência mista nos espectros e uma manutenção do sinal observado no decorrer dos experimentos.

45

Nesses espectros, para todas as concentrações avaliadas ($0,004$, $1,0$, $5,0$, 10 , 30 e 40 mmol L^{-1}), o perfil espectral foi composto por uma linha alargada com $g = 1,975$ e $\Delta_{pp} = 40 \text{ mT}$ sobreposto ao espectro hiperfino bastante fraco, que foi atribuído por simulação ao cátion vanadila $[V^{IV}O(OH_2)_5]^{2+}$, para o qual os parâmetros foram apresentados na Tabela 12.

Esses resultados indicam diferentes padrões de decomposição em solução aquosa para os POVs V_{14} e V_{15} . Nos quais, o V_{14} sofre hidrólise e oxidação mais rapidamente que o V_{15} , gerando oligômeros e possivelmente outros POVs em solução (Esquema 7).



Esquema 7 Equilíbrios gerados para os sistemas de V_{14} e V_{15} em solução aquosa determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com seta indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.

Os resultados podem ser suportados pelas mudanças do pH e da coloração das soluções (Figura 44), nas quais a solução verde do V_{14} muda no decorrer de 24 h para amarelo, enquanto a solução do V_{15} mantém a sua coloração durante o mesmo período.

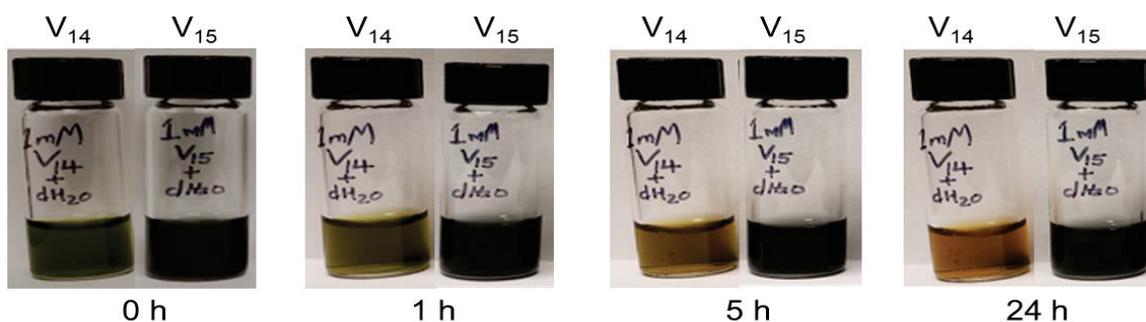


Figura 44 Avaliação da coloração de soluções a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do V_{14} e V_{15} em solução aquosa nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.

É importante notar que, a análise da solução aquosa dos compostos indica que nas condições de cultura celular, a formação do V_{10} não seria observada. Uma vez que, nas soluções estoque dos produtos essa espécie é

observada em baixa concentração apenas na maior concentração de ambos os produtos, V_{14} e V_{15} .

Desta forma, o efeito dos produtos no crescimento da cultura bacteriana mostrado neste trabalho se dá possivelmente como resultado da presença dos polioxovanadatos e não devido a presença do V_{10} . No entanto, análises no meio de cultura e sobrenadante se fazem necessárias, uma vez que, os experimentos biológicos foram realizados em condições distintas, na presença de um meio de cultura complexo.

3.3.3. Especificação dos polioxovanadatos no meio de cultura 7H9

Estudos para determinar as espécies responsáveis pelo efeito inibitório dos POVs no crescimento celular das culturas de *M. smegmatis* também foram realizados, utilizando inicialmente o meio de cultura 7H9. O qual contém componentes que podem formar complexos com vanádio, como o citrato e o fosfato (Tabela 2), sob as condições de crescimento.^{45; 46} Complexos com citrato e fosfato também podem ser formados na presença de vanádio(IV), os quais se formados poderiam ser observados por espectroscopia de RPE.

Além disso, foram realizados experimentos em soluções aquosas concentradas contendo quantidades maiores de citrato e fosfato para diferenciar os sinais formados na presença desses componentes, dos sinais comumente observados para os oligômeros de vanádio(V) (Apêndice 2, Figura 1).

Os espectros de RMN de ^{51}V do V_{14} e V_{15} no meio 7H9 (Figura 45) mostram espécies adicionais de vanádio(V) quando comparados a solução aquosa, indicando interação do POV com alguns dos componentes do meio de cultura. O aparecimento de sinais relativos a oligômeros como V_{1+PV} , V_2 e $V_4O_{12}^{4-}$ (V_4) pode ser observado para ambos os compostos. Onde, V_{1+PV} é atribuído a interação entre as espécies V_1 e o complexo formado de vanádio com fosfato ($PV = HVPO_7^{3-}$),⁴⁵ causando um alargamento e deslocamento do sinal relativo ao V_1 .⁵⁰

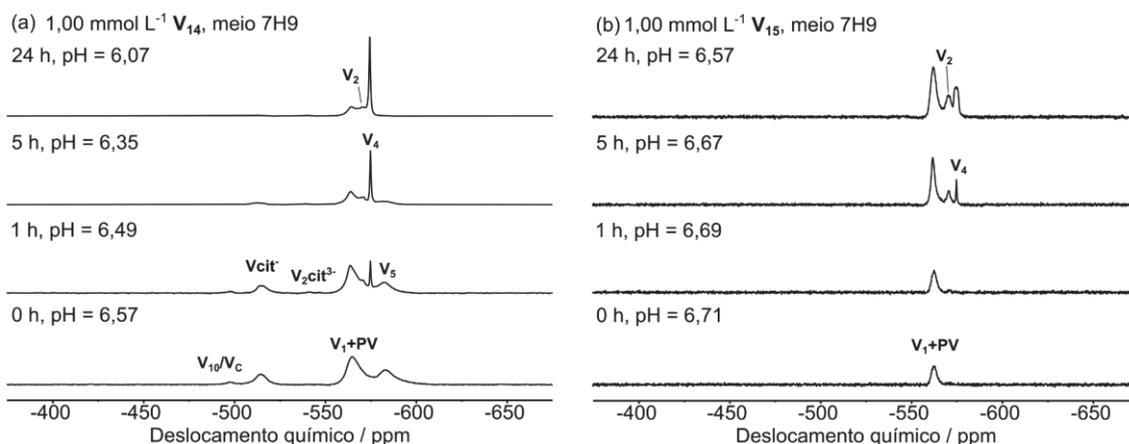


Figura 45 Espectros de RMN de ^{51}V para (a) \mathbf{V}_{14} e (b) \mathbf{V}_{15} em meio 7H9 (pH = 6,6) de 1,0 mmol L^{-1} nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas foram: V_1 (H_2VO_4^-), V_2 ($\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$), V_4 ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), PV (HVPO_7^{3-}), V_{10} ($\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$) e complexo vanádio-citrato (Vcit^- e $\text{V}_2\text{cit}^{3-}$).

Na solução do \mathbf{V}_{14} , o sinal em -583 ppm pode ser atribuído ao $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$ (V_5) e em -497 e -514 ppm ao V_{10} , indicando que uma maior concentração de vanádio(V) é gerada no meio pela decomposição do POV de origem. Após 1 h, o aparecimento de sinais em -541 e -547 ppm foi atribuído a um complexo aniônico gerado pela interação do POV com citrato (cit) chamado $\text{V}_2\text{cit}^{3-}$, previamente detectado em uma solução aquosa terciária $\text{H}^+/\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{citrato}$.^{46;}¹⁰⁵ O novo sinal de baixa intensidade observado em -518 ppm foi atribuído a espécie Vcit^- ,⁵⁷ também formada pela interação do vanádio com o citrato presente no meio de cultura (Apêndice 2, Figura 1).

As soluções do \mathbf{V}_{15} em meio 7H9, por sua vez, mostraram apenas sinais atribuídos ao V_1+PV no tempo inicial (Figura 45b). Após 5 h, as espécies V_2 e V_4 foram observadas com deslocamentos químicos em $\delta = -572$ e -575 ppm. Interessantemente, a formação de decavanadato e complexos de vanádio-citrato (Vcit^- e $\text{V}_2\text{cit}^{3-}$) não foi observada, possivelmente devido a uma maior manutenção da estrutura do agregado em solução quando comparado ao \mathbf{V}_{14} .

Os espectros de RPE em meio de cultura 7H9 de 1,0 mmol L^{-1} do \mathbf{V}_{14} e \mathbf{V}_{15} a 77 K também foram estudados nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h (Figura 46).

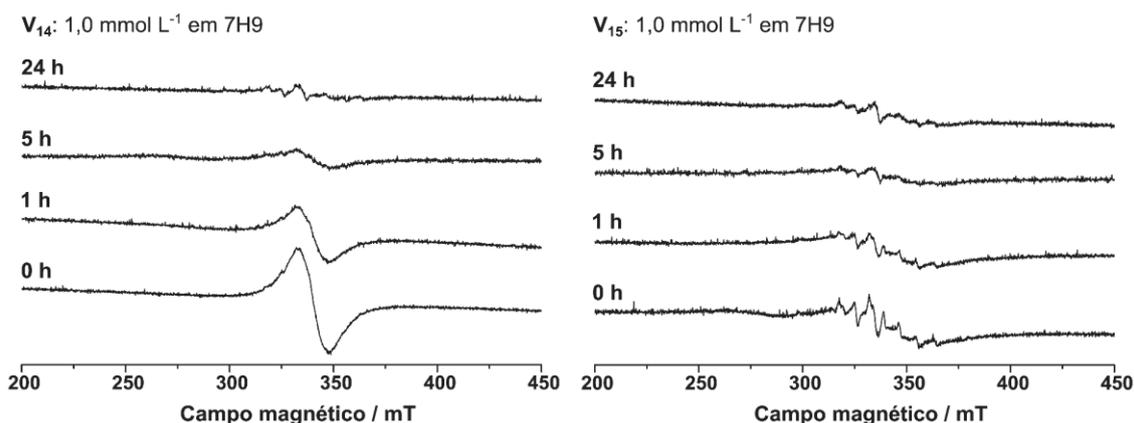
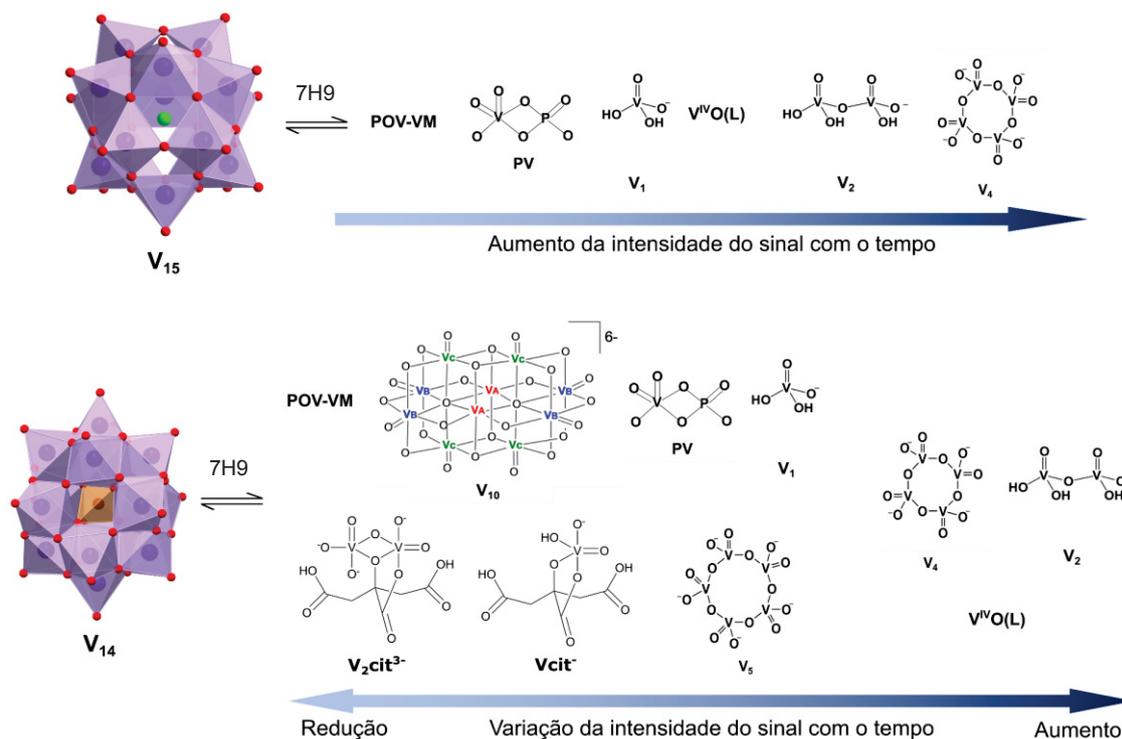


Figura 46 Espectro de RPE em banda X obtido a 77 K para V_{14} e V_{15} em meio de cultura 7H9 (pH = 6,6) a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com variação no tempo de 0, 1, 5 e 24 h.

O espectro de RPE do V_{14} mostra que uma espécie polinuclear predomina no tempo inicial ($g = 1,97$ e $\Delta_{pp} = 15 \text{ mT}$), porém após 1 h esse sinal reduz de intensidade (Figura 46) e parece estar sobreposto ao espectro paralelo e perpendicular de uma espécie mononuclear de vanádio(IV) que se torna mais evidente após 24h. A espécie polinuclear observada para a solução de V_{14} no meio de cultura 7H9 diferencia-se daquela em solução aquosa pela largura de linha ($\Delta_{pp} = 34 \text{ mT}$), o que pode indicar um rearranjo da espécie de origem em uma espécie polinuclear de valência mista distinta.

Estudos do V_{15} apresentaram um espectro atribuído a uma espécie polinuclear ($g = 1,98$ e $\Delta_{pp} = 34 \text{ mT}$) que está sobreposto ao espectro paralelo e perpendicular de uma espécie mononuclear de vanádio(IV) com pouca variação no decorrer do tempo, sugerindo maior estabilidade da espécie polinuclear em solução. Os diferentes padrões de estabilidade/reactividade ressaltam que o V_{14} sofre hidrólise e oxidação em um número maior de espécies no decorrer do tempo que o V_{15} , gerando oligômeros e possivelmente outros POVs em solução, conforme resumido no Esquema 8.



Esquema 8 Equilíbrios gerados para os sistemas de V_{14} e V_{15} em solução aquosa determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com flexa indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento. Onde $POV-VM$ é uma espécie polinuclear de valência mista não identificada.

De forma similar as soluções aquosas, mudanças na coloração da solução também foram observadas para os POVs em meio de cultura 7H9 (Figura 47), onde a diluição do V_{14} levou a uma solução verde-escura amarelada.

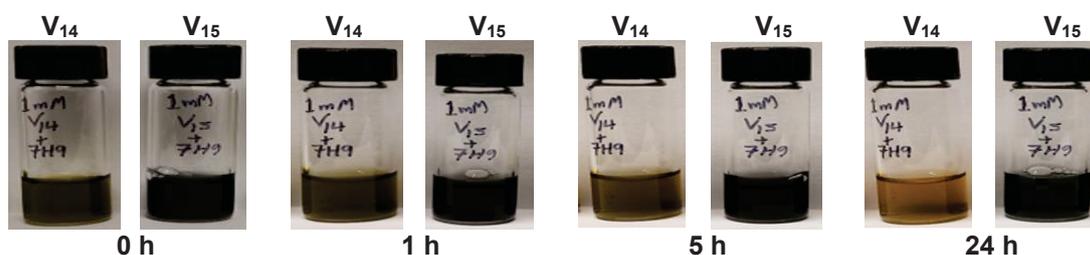


Figura 47 Avaliação da coloração de soluções a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do V_{14} e V_{15} em meio de cultura 7H9 nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.

A cor amarelada da solução de V_{14} indica a oxidação parcial do polioxoânion e sugere a formação de V_{10} no meio, o qual apresenta uma característica coloração amarelo-laranja quando presente em uma solução.

Leva-se em consideração que o meio de cultura 7H9 apresenta coloração bege clara. O pH da solução de V_{14} foi de 6,7 em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, conforme esperado devido à característica de tamponamento do meio de cultura, o que não é observado para o produto em solução aquosa. O V_{15} , não apresentou mudança visível de coloração na solução, o que reflete novamente o fato de que o V_{15} se decompõe mais lentamente para formar íons de V^V e V^{IV} em solução do que o V_{14} .

3.3.4. Especificação dos polioxovanadatos no sobrenadante da cultura de *M. smegmatis*

Os estudos espectroscópicos também foram realizados para o V_{14} e V_{15} , na presença do sobrenadante isolado após o crescimento da cultura de *M. smegmatis*. Neste, foi avaliada a interação dos POVs com possíveis produtos de excreção, baseados em proteínas, das micobactérias.¹⁰⁵ Como o padrão de especificação de oxovanadatos pode variar dependendo da quantidade de proteína no meio,¹⁷⁵ três condições foram utilizadas para avaliar a hidrólise e oxidação dos oxocompostos:

- (i) Sobrenadante aquecido, para desnaturar as proteínas;
- (ii) Sobrenadante não aquecido, contendo o material excretado;
- (iii) Meio de cultura 7H9 suplementado com OAD (ácido oleico, albumina e dextrose), para determinar o papel da albumina.

Os espectros de RMN de ^{51}V para as de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do V_{14} nessas condições mostram especificações diferentes, como mostrado na Figura 48 e no Apêndice 2, Figura 2. Para os espectros no sobrenadante não aquecido foram observados sinais em $\delta = -564, -583, -498$ e -514 ppm atribuídos a V_1+PV , V_5 e V_{10} , respectivamente.

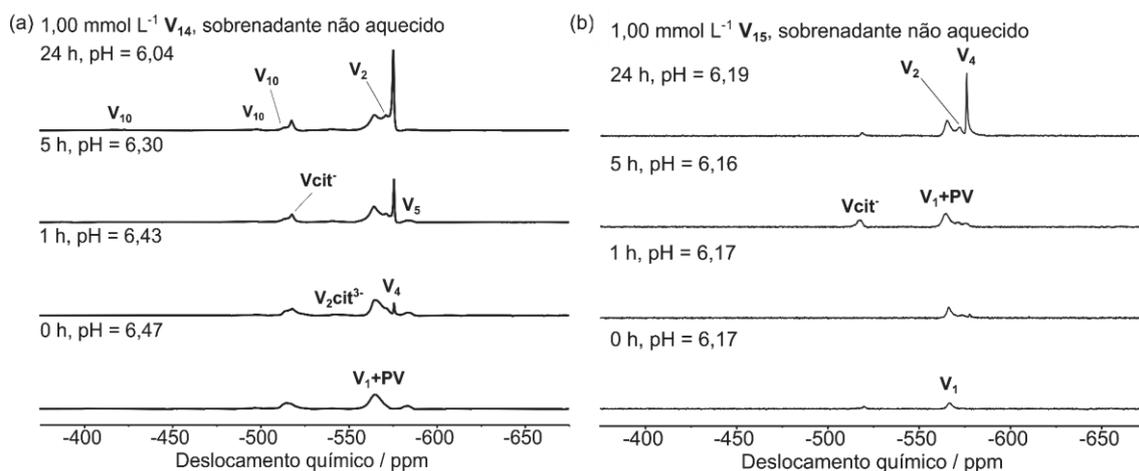


Figura 48 Espectros de RMN de ⁵¹V para (a) V₁₄ e (b) V₁₅ em solução de sobrenadante não aquecido de 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h. As espécies observadas foram: V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₄ (V₄O₁₂⁴⁻), PV (HVPO₇³⁻), V₁₀ (HV₁₀O₂₈⁵⁻) e complexo vanádio-citrato (Vcit⁻ e V₂cit³⁻).

Para o V₁₄ nessas condições a formação das espécies contendo citrato, V₂cit³⁻ e Vcit⁻, e V₄ foi observada após 1 h do preparo da solução, se mantendo em solução durante toda a análise com variações apenas na intensidade dos sinais, sugerindo uma maior quebra da estrutura do agregado após 24 h.

No sobrenadante aquecido, por sua vez, a solução de V₁₄ apresentou um número de espécies menor no tempo inicial, com sinais atribuídos ao V₁₀, V₁, V₄ e V₅. No entanto, após 5 h do início do experimento, as espécies foram as mesmas presentes nos espectros em sobrenadante não aquecido.

Os espectros de RMN de ⁵¹V do V₁₅ nessas condições apresentam maiores similaridades (Figura 48b e Apêndice 2, Figura 3), com apenas um sinal relativo à espécie V₁ em -560 ppm no tempo inicial. Nos espectros de 1 h, a evidência da formação de pequenas quantidades das espécies V₁+PV, V₂ e V₄ é observada. Após 5 h, a diferença na especiação do V₁₅ nos sobrenadantes fica evidente com o aparecimento do sinal relativo ao Vcit⁻ na condição de sobrenadante não aquecido.

Interessantemente, nenhuma das condições avaliadas com o V₁₅ leva a formação do complexo V₂cit³⁻, como visto anteriormente para o V₁₄ e para o V₁₀, estando o último descrito na literatura.¹⁰⁵ No meio suplementado a espécie Vcit⁻ também não foi observada, sugerindo que a formação desse complexo pode ser dependente ou favorecida pela presença de componentes do sobrenadante

gerados pelo crescimento da micobactéria. Com isso, propomos que em maiores concentrações, os POVs sofrem uma decomposição mais lenta na presença do sobrenadante aquecido, ou seja, em um meio contendo menos proteínas.

Mudanças de coloração na solução também foram acompanhadas e observadas nas condições de sobrenadante não aquecido, similares ao observado em meio 7H9 (Figura 49). Aqui, o **V₁₄** apresentou uma coloração de solução verde-escura amarelada no tempo inicial com alteração da coloração para amarelo-laranja após 24 h. Essa coloração amarelada indica mais uma vez a oxidação parcial do polioxoânion e o princípio da formação de **V₁₀**, laranja. O **V₁₅** foi novamente mais estável, não apresentando mudança visível de coloração em suas soluções.

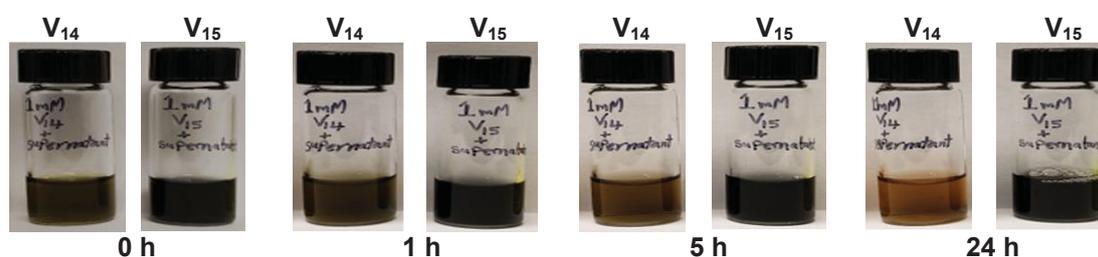


Figura 49 Avaliação da coloração de soluções a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do **V₁₄** e **V₁₅** no sobrenadante não aquecido do meio de cultura nos tempos de 0, 1, 5 e 24 h.

As medidas de pH das amostras mostraram ainda uma diminuição do pH com o tempo para a solução de **V₁₄**, de 6,00 a 5,73. Enquanto o **V₁₅** não mostrou alterações significativas no valor de pH (6,16 – 6,19) no decorrer de 24 h, apesar de mostrar alteração na quantidade das espécies de menor nuclearidade no meio, sugerindo novamente uma menor susceptibilidade do **V₁₅** a reações de hidrólise.

Considerando que os estudos de especiação realizados sugerem mudanças consistentes com a presença e papel das proteínas na formação de complexos com os polioxovanadatos e que a baixa intensidade do sinal relativo ao Vcit^- nas soluções em sobrenadante aquecido sugere o envolvimento de proteínas presentes no meio; experimentos complementares foram realizados em meio de cultura 7H9 suplementado com OAD (ácido oleico, albumina e

dextrose) para determinar se a albumina tem participação na hidrólise e oxidação dos POVs (Apêndice 2, Figura 2b e 3b).

Nossos resultados mostram um comportamento semelhante ao do sobrenadante para ambos os compostos, onde, mais uma vez, uma especiação complexa contendo as mesmas espécies apresentadas acima, porém com sinais menos intensos. Novamente, nossos resultados suportam a hipótese de que a presença de proteínas no meio, sejam elas excretadas pelo organismo ou adicionadas para melhorar o crescimento da bactéria, podem exercer influência na especiação e impactar a atividade dos polioxovanadatos em sua ação inibitória no crescimento da bactéria.

3.3.5. Considerações sobre o sistema

*3.3.5.1. Papel de polioxovanadatos de valência mista como agentes antimicrobianos em culturas de *M. smegmatis**

Até o momento, nossos grupos de pesquisa trabalharam com polioxovanadatos em três modelos de microrganismo (Figura 50), estudando a atividade biológica e estabilidades desses nos sistemas. No geral, foi observado um maior potencial inibitório do crescimento das culturas celulares tratadas com **V₁₅**, seguido do **V₁₀** e **V₉Pt** em *M. smegmatis*, todos apresentando menor IC₅₀ que o tratamento de referência isoniazida (Tabela 14). A estabilidade dos compostos nesses sistemas suporta a proposta de que a presença dos POVs intactos no meio, mesmo que apenas no tempo inicial, influencia positivamente a atividade biológica.

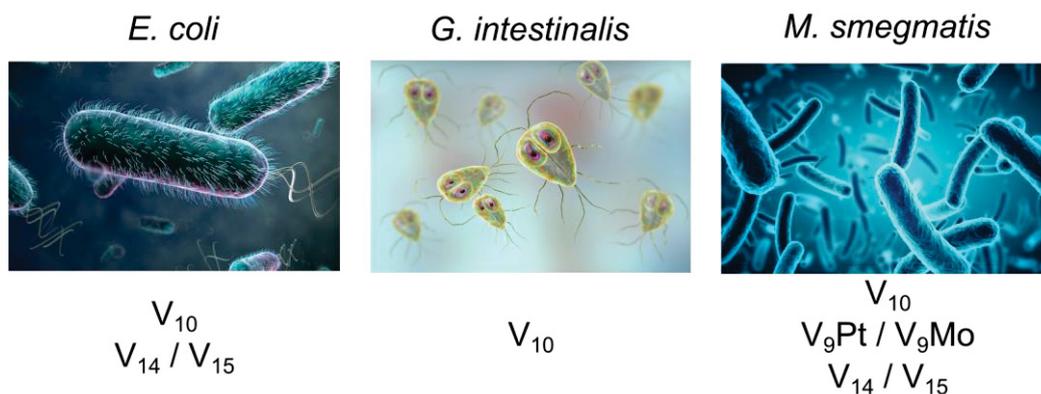


Figura 50 Representação dos modelos biológicos avaliados anteriormente na literatura de culturas de *E. coli*, *G. intestinalis* e *M. smegmatis* com POVs em estado de oxidação V^{+} , como o $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (V_{10}), $[V_9MoO_{28}]^{5-}$ (V_9Mo), $[H_2PtV_9O_{28}]^{5-}$ (V_9Pt) e valência mista (IV/V), como o $[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)]^{5-}$ (V_{14}) e $[V_{15}O_{36}(Cl)]^{6-}$ (V_{15}).

Para um melhor entendimento dos resultados espectroscópicos apresentados neste trabalho, um resumo das espécies de vanádio identificadas para as soluções dos POVs nas diferentes condições estudadas é mostrado na Tabela 15.

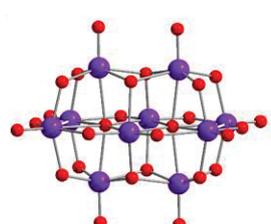
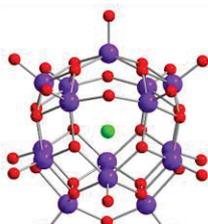
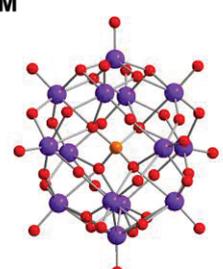
Tabela 15 Resumo das espécies de vanádio(IV) e vanádio(V) geradas após 24 h nas soluções em concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de V_{14} e V_{15} nas condições avaliadas neste trabalho

Condição	V_{14}	V_{15}
Solução aquosa	POV + V_{14} -oxidado + V_1 + V_{10} + $V^{IV}O^{2+}$	POV + V_1 + V_{10} + $V^{IV}O^{2+}$
Meio 7H9	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + V_5 + $V_2\text{Cit}^{3-}$ + $V\text{Cit}^-$ + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$
Sobrenadante não aquecido	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + V_5 + $V_2\text{Cit}^{3-}$ + $V\text{Cit}^-$ + V_{10} + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + $V\text{Cit}^-$ + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$
Sobrenadante aquecido	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + V_5 + $V_2\text{Cit}^{3-}$ + $V\text{Cit}^-$ + V_{10} + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + $V\text{Cit}^-$ + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$
Meio 7H9 + OAD	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + V_5 + $V_2\text{Cit}^{3-}$ + $V\text{Cit}^-$ + V_{10} + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$	POV + V_1 + PV + V_2 + V_4 + $[V^{IV}OL_x]^{n+}$

* V_1 ($H_2VO_4^-$), V_2 ($H_2V_2O_7^{2-}$), V_4 ($V_4O_{12}^{4-}$), V_5 ($V_5O_{15}^{5-}$), $V\text{Cit}^-$, $V_2\text{Cit}^{3-}$, PV ($HVPO_7^{3-}$), V_{14} -oxidado ($H_4V_{14}O_{42}P^{5-}$), V_{10} ($HV_{10}O_{28}^{5-}$), $V^{IV}O^{2+}$ ($[VO(OH)_2]^{2+}$) e $[V^{IV}OL_x]^{n+}$, onde L corresponde a espécies químicas coordenantes no meio.

Em solução aquosa, o V_{14} estava presente em sua forma de valência mista, indicada pelos espectros de RPE e pela coloração verde-escura da solução, assim como, em sua forma completamente oxidada, V_{14} -oxidado, observada nos espectros de RMN. No entanto, quando avaliado no meio de cultura 7H9 observou-se a decomposição do V_{14} , com poucos indicativos do

agregado intacto ao final dos estudos (Esquema 9). O **V₁₄** se mostrou presente em solução aquosa durante um período de 24 h, indicando que a decomposição da estrutura nas condições do ensaio biológico reflete diretamente a reação do composto com o meio de cultura.

	Vanadato simples	POV	POV-VM	
				
	V₁	V₁₀	V₁₅	V₁₄
IC₅₀ <i>M. smeg</i>	190 μmol L ⁻¹	3,7 μmol L ⁻¹	1,9 μmol L ⁻¹	29 μmol L ⁻¹
Especiação em 0h				
H ₂ O	V ₁ , V ₂ , V ₄ , V ₅	V ₁₀	POV, V ₁ , V ^{IV} O ²⁺	POV, V _{14-oxidado} , V ₁₀ , V ^{IV} O ²⁺
7H9	Vcit ⁻ , V ₂ , V ₄ , V ₅	V ₁₀	POV, V ₁ , PV, V ^{IV} O(L)	POV, Vcit ⁻ , V ₁ , PV, V ₅ , V ^{IV} O(L)

Esquema 9 Resumo dos principais resultados publicados e do nosso grupo de pesquisa obtidos por meio do estudo inibição do crescimento de culturas de *M. smegmatis* dos compostos **V₁**, **V₁₀**, **V₁₅** e **V₁₄**.⁵² Aqui também são apresentadas as espécies observadas por RMN de ⁵¹V e RPE, para os POVs, no tempo de 0 h em solução aquosa e meio 7H9 (pH = 6,6) para cada composto. Os átomos de vanádio são mostrados em roxo, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja e o cloro em verde claro.

Em comparação, as soluções do **V₁₅** apresentaram um menor número de espécies em todas as condições avaliadas. É importante ressaltar que os sinais das espécies foram ainda de baixa intensidade, indicando uma maior manutenção da estrutura do **V₁₅** em solução.

A inibição do crescimento das culturas de *M. smegmatis*, portanto, não foi gerada apenas pela presença do **V₁₄**, mas por um efeito combinado do **V₁₄** e todos os seus produtos de decomposição. Embora o **V₁₄** tenha se decomposto ao final do experimento, a inibição observada foi 6 vezes mais potente que a observada para o **V₁**.¹⁰⁵ Sugerindo uma maior atividade das espécies polinucleares.

Embora o **V₁₀** tenha se mostrado relativamente estável em 7H9, assim como o **V₁₅**, a adição dos compostos a cultura de *M. smegmatis* facilita a hidrólise

do ânion. Os resultados indicam que a presença de proteínas no meio de cultura, sejam elas excretadas pelo organismo ou adicionadas para melhorar o crescimento da micobactéria, exercem influência na especiação e podem impactar a atividade de oxocompostos de vanádio em sua ação inibitória. No entanto, a capacidade de inibição do crescimento da cultura micobacteriana sugere um efeito resultante da presença dos POVs no meio e não exclusivamente da formação do decavanadato ou das demais espécies oligoméricas de vanádio no sistema.

Em maiores concentrações, os POVs sofrem uma decomposição mais lenta na presença do sobrenadante aquecido, ou seja, em um meio contendo menos proteínas. Nossos estudos, além disso, indicam que o material excretado do *M. smegmatis*, pode ser uma proteína ou mesmo um sideróforo, como proposto para o tratamento do *M. smegmatis* com V₁₀.

A estabilidade dos agregados no meio de cultura representa parte importante na atividade biológica observada, porém não é um fator decisivo para a presença ou não de atividade. Uma vez que, observou-se que, se os POVs forem suficientemente estáveis no meio ou não, a inibição do crescimento micobacteriano ainda é significativamente maior do que a observada para o V₁. Esses resultados suportam a possibilidade de que diferentes cargas e química em solução, como as propriedades redox dos POVs de valência mista ou de seus produtos de decomposição, contribuam no favorecimento e ajuste da inibição de crescimento observada.

3.4. Estudos de citotoxicidade e avaliação do efeito dos POVs na camada lipídica de células CHO

A aplicação medicinal de polioxovanadatos tem sido avaliada em diferentes frentes, como estudo da relações estrutura-atividade, uso como potenciais drogas antitumorais, agentes antiparasitários e a investigação de sua citotoxicidade, a fim de torná-los disponíveis e seguros para uso clínico. Embora a maioria dos estudos tenham se concentrado na citotoxicidade e nos efeitos dos POVs em relação a outras drogas, a sua interação com a membrana plasmática também pode ser crítica para as ações de pelo menos alguns compostos de

vanádio.

Um fator motivador para estudos que além de avaliar a citotoxicidade dos compostos investigam os efeitos de POVs em células eucarióticas que expressam um receptor hormonal, como o receptor de hormônio luteinizante (LHR), foi a observação de que o V_{10} ativa o receptor de proteína quinase ($Fc\epsilon R$).¹⁷⁶ Este, é um receptor de proteína quinase como o receptor de insulina, que também pode ser ativado por complexos de vanádio.^{177; 178}

Tanto o $Fc\epsilon R$ quanto o receptor de insulina são receptores de proteína quinase e apresentam processos de sinalização por vias diferentes das utilizadas pelo LHR. No entanto, todos os três receptores usam jangadas lipídicas como plataformas de sinalização. Relatos da literatura apresentam o V_{10} em estudos com o receptor de insulina, onde foi demonstrado que o V_{10} teve efeitos semelhantes aos do BMOV, bis(maltolato)oxovanádio(IV), um vanadato conhecido por sua atividade antidiabética.¹⁷⁶¹⁷⁸

A fim de obter mais informações sobre compostos de vanádio em sua interação com membranas, exploramos aqui as respostas de um receptor de proteína acoplada G, o receptor hormonal luteinizante (LHR, ver Figura 15), na presença de V_1 e de diferentes POVs, V_{10} , V_{14} e V_{15} em células CHO (células de ovário de hamster chinês). Diferentemente dos sistemas apresentados anteriormente, esta foi a primeira vez que polioxovanadatos tiveram suas atividades reportadas para este sistema.

Para tanto, os POVs selecionados representam duas classes de polioxometalatos solúveis em água, um homopolioxometalato (V_{10}) e o dois polioxometalatos de valência mista (V_{14} e V_{15} , Figura 51). As propriedades desses POVs são complementares, de modo que nossos estudos visam obter informações sobre suas respostas biológicas e a possível correlação com outros compostos da classe.

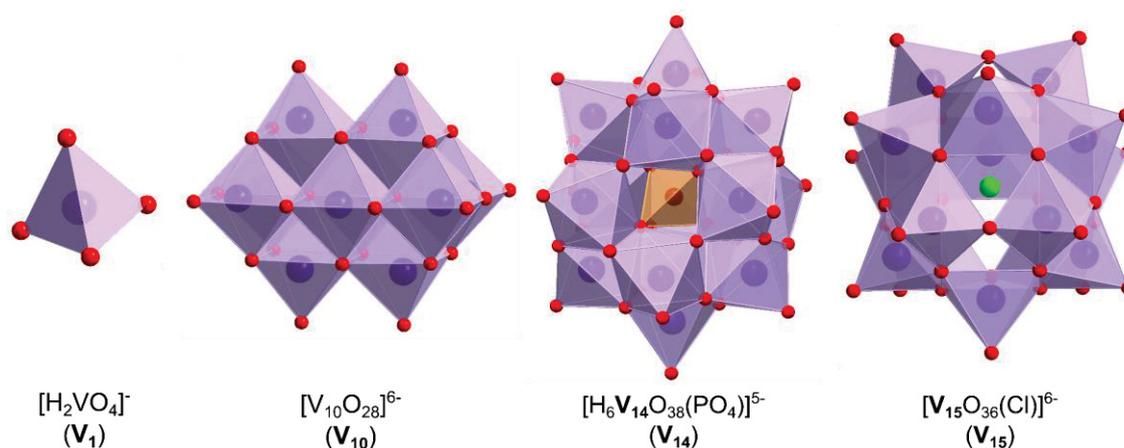


Figura 51 Representação da estrutura em poliedros dos compostos avaliados nessa seção: $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$ (V₁), $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$ (V₁₀), $[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)]^{5-}$ (V₁₄) e $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]^{6-}$ (V₁₅).

Considerando o grande número de POMs disponíveis e a ampla gama de propriedades possíveis^{179,181} para estes, escolhemos àqueles com propriedades complementares ao sistema de V₁₀ e que representam a multivalência dos polioxovanadatos com diferentes proporções de V^{IV}/V^V.

A interação dos oxocompostos de vanádio com a membrana lipídica pode levar a uma redução no empacotamento lipídico, favorecendo, de forma indireta, a agregação de receptores celulares.^{134; 182; 183} para tal estudo é avaliado especificamente o LHR em sua agregação e o efeito de sinalização em cadeia pode ser estimado pelo nível de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) intracelular. Por fim, os estudos da reatividade dos POVs no meio de cultura DMEM também serão abordados.

Os estudos com membranas de células CHO foram realizados em parceria com o grupo da professora Deborah Roess da CSU, pela doutoranda Duaa Althumairy, onde foram feitos os quatro ensaios apresentadas abaixo:

- (i) *Análise da viabilidade celular em culturas tratadas com V₁, V₁₀, V₁₄ e V₁₅.*
- (ii) *Análise do efeito dos compostos na ordem da membrana lipídica das células CHO.*
- (iii) *Análise do efeito dos POVs na agregação do LHR.*
- (iv) *Análise do efeito dos POV nos níveis de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) intracelular.*

A discussão a seguir resume os principais resultados destes ensaios, pois a nossa principal contribuição para este trabalho reside na síntese dos compostos a serem avaliados e nos estudos de identificação das espécies químicas formadas no meio de cultura DMEM. A completa descrição destes experimentos encontra-se no Apêndice 2. Os estudos espectroscópicos serão detalhadamente discutidos e seus resultados correlacionados com os dados dos ensaios biológicos.

3.4.1. Estudo de citotoxicidade do V_1 , V_{10} , V_{14} e V_{15} em células CHO

Estudos iniciais foram realizados para avaliar os efeitos da concentração de V_1 , V_{10} , V_{14} ou V_{15} na viabilidade de culturas de células CHO, determinando-se o IC_{50} , ou seja, as concentrações que causaram redução de 50% da viabilidade celular avaliada (Figura 52 e Tabela 16) ao longo de 15 h.

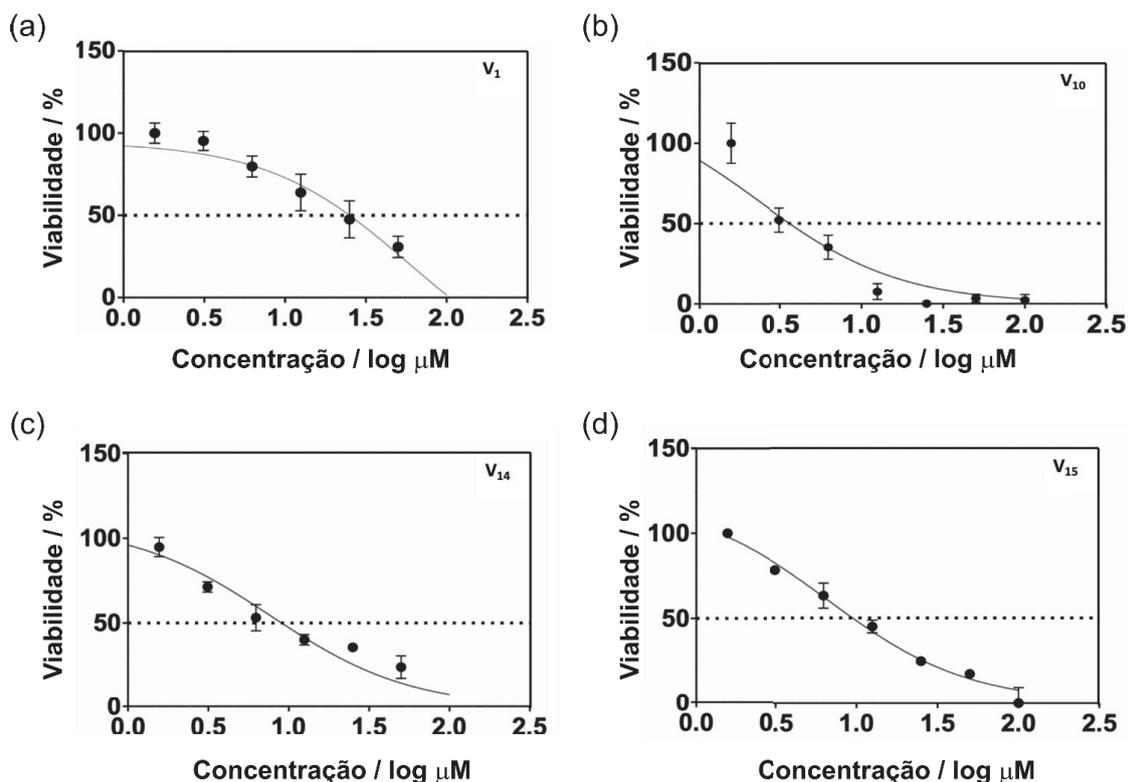


Figura 52 Efeito dos POVs (a) V_1 , (b) V_{10} , (c) V_{14} e (d) V_{15} na viabilidade celular das células CHO. A linha pontilhada em 50% de viabilidade foi usada para estabelecer o IC_{50} desses compostos.

Tabela 16 Valores calculados de IC₅₀ em células CHO tratadas com **V**₁, **V**₁₀, **V**₁₄ e **V**₁₅.

	IC ₅₀ por POV / μmol L ⁻¹	IC ₅₀ por vanádio / μmol L ⁻¹
V ₁	56,5 ± 7,5	56,5
V ₁₀	3,2 ± 0,60	32
V ₁₄	6,1 ± 0,80	84
V ₁₅	8,2 ± 3,2	123

Dentre os polioxovanadatos, o **V**₁₀ foi o mais efetivo na redução da viabilidade celular, seguido do **V**₁₄ e do **V**₁₅. O **V**₁, por sua vez, foi o menos tóxico dentre os compostos. Anteriormente, foram avaliados os compostos BMOV, BEOV e VOSO₄ em sua citotoxicidade para células CHO, com as IC₅₀ reportadas para esses compostos foram de 34, 34 e 65 μmol L⁻¹, respectivamente. Desta forma, o **V**₁₀, **V**₁₄ e **V**₁₅ são respectivamente 10, 5 e 4 vezes mais tóxicos que o BMOV e BEOV, que por sua vez, são 2 vezes mais tóxicos que o VOSO₄.¹³⁴ Os resultados apresentados não refletem a concentração de vanádio especificamente, uma vez que os polioxovanadatos de maior nuclearidade, **V**₁₄ e **V**₁₅, apresentaram toxicidade intermediária entre **V**₁ e **V**₁₀.

Compostos de vanádio possuem citotoxicidade bastante dependente do tipo de célula eucariótica avaliada. Por exemplo, os compostos (1,4-C₆H₇N₂O)₄[H₂**V**₁₀O₂₈]·2C₆H₆N₂O e (1,3-C₆H₇N₂O)₄[H₂**V**₁₀O₂₈]·2H₂O·2C₆H₆N₂O não afetam a viabilidade de células Vero em concentrações de 0,025 a 10 μmol L⁻¹, com IC₅₀ observada apenas em concentrações de 200 μmol L⁻¹.¹⁰⁴ Outro resultado similar mostra que o decavanadato de sódio e o decavanadato-metformina exibem menor citotoxicidade para as células embrionárias de rim humano (HEK293), com IC₅₀ de 40 e 85 μmol L⁻¹, do que em células de câncer de fígado humano (HepG2), onde a IC₅₀ observada foi de 9,0 e 29 μmol L⁻¹,¹⁸⁴ respectivamente.

Entretanto, alguns compostos de vanádio podem apresentar citotoxicidade elevada em ambos os tipos de células, tumorais⁶⁵ ou normal, como o [(H₂tmen)₃**V**₁₀O₂₈]·6H₂O e [(H₂en)₃**V**₁₀O₂₈]·2H₂O (onde, tmen = tetrametiletilenodiamônio, en = etilenodiamônio) que mostraram IC₅₀ de 6,5 e 7,2 μmol L⁻¹ em células hepáticas normais L02.¹⁸⁵ Os relatos citotoxicidade desses compostos indicam que, em 24 h, há uma redução mais rápida na viabilidade de algumas células tumorais do que de células normais na presença

dos POVs. Sugere-se que, com a dissociação dos íons e hidrólise do agregado metálico em espécies menores de vanádio a redução dos centros de vanádio(V) para (IV) pode ser favorecida, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas, levando a apoptose celular.

A citotoxicidade mais pronunciada dos POVs de valência mista observada nas células CHO pode estar correlacionada a presença dos centros de vanádio(IV) em sua estrutura em contraste com os valores observados para o V_1 . No entanto, para os experimentos subsequentes as concentrações dos compostos selecionadas consistem em condições experimentais onde mais de 75% das células CHO permaneceram viáveis durante o experimento, sendo elas $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V_1 , $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V_{10} , $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V_{14} e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V_{15} .

3.4.2. Efeito na ordem lipídica na membrana plasmática de células CHO

Estudos anteriores com compostos de vanádio em linhagens celulares eucarióticas CHO, células da linhagem de mastócitos (RBL-2 H3), adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) e eritrócitos humanos, demonstraram que esses compostos são capazes de interagir fortemente com os lipídios da membrana ^{112; 186} afetando sua ordem e, como resultado, o empacotamento dos lipídios nas membranas celulares (Figura 15). A maioria dos compostos de vanádio investigados anteriormente, como o BMOV, BEOV ou $VOSO_4$, foram capazes de interagir fortemente ou penetrar a interface. ^{111; 112; 186; 187}

No caso do decavanadato e outros polioxovanadatos solúveis em água, estes se encontram na fase aquosa de sistemas modelo de membrana ¹⁰⁸⁻¹¹⁰ e a capacidade de interagir com moléculas lipídicas hidrofóbicas nas membranas celulares é presumivelmente baixa. Desta forma, este estudo visa avaliar qual seria o efeito de oxocompostos de vanádio solúveis em água (V_1 , V_{10} , V_{14} e V_{15}) sob a ordem dos lipídios da membrana do sistema modelo baseado em células CHO. A modificação na ordem dos lipídios de uma membrana é uma propriedade descrita como importante na atividade observada para de compostos de vanádio menos solúveis em água. ^{120; 178}

O efeito do V_1 , V_{10} ou V_{15} na ordem lipídica foi avaliado após 10 h de incubação com as células CHO. Uma diminuição do empacotamento lipídico exercida pelos compostos foi observada quando comparado com as células não tratadas, indicada pelo aumento na razão de emissão de 640 nm na Figura 53. Curiosamente, as células tratadas com V_1 além de terem o menor efeito tóxico na viabilidade celular, também exibiram o menor efeito na redução do empacotamento de lipídios quando comparadas àquelas com os POVs. Isso pode ser relacionado a capacidade do V_1 de interagir melhor com a interface estudada, que com base em estudos modelo ¹⁰⁸ poderia, portanto, ser internalizado pela membrana.

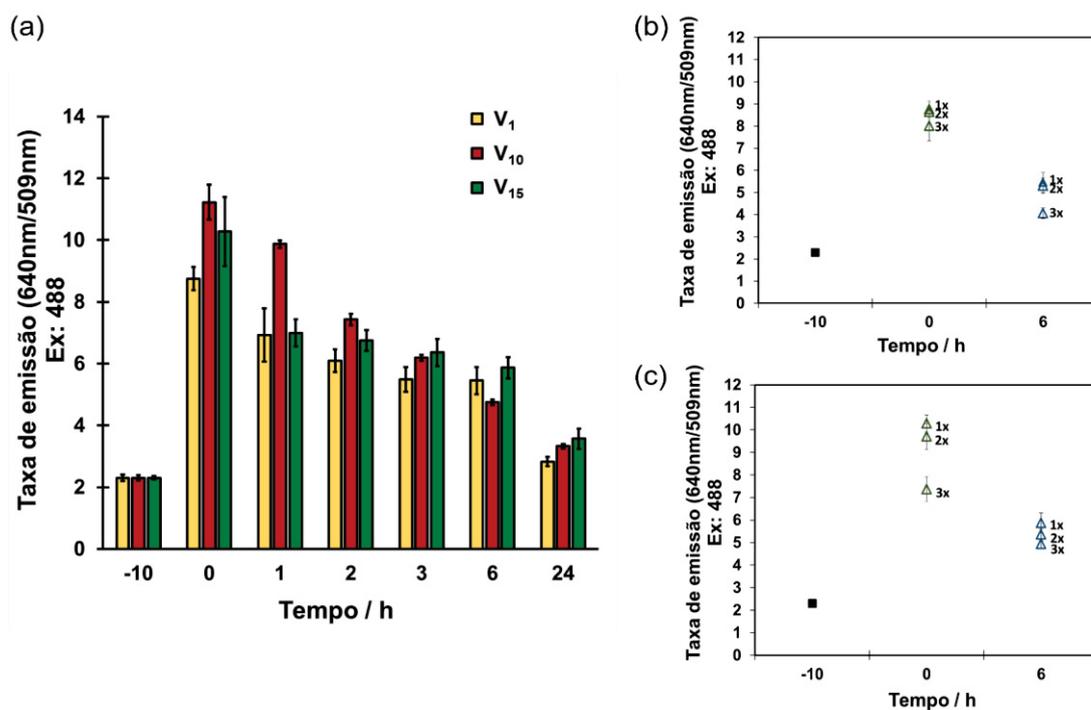


Figura 53 (a) Gráfico da ordem dos lipídios da membrana em células CHO tratadas com V_1 , V_{10} e V_{15} . O aumento da emissão em 640 nm em relação à emissão em 545 nm é indicativo de uma diminuição na ordem dos lipídios. Em (b) V_1 e (c) V_{15} , os efeitos da lavagem repetida no tempo inicial (em verde) e 6 h (em azul) na fluidez lipídica para as células foram avaliados. Uma segunda (2x) e terceira (3x) lavagem pareceram aumentar a ordem dos lipídios. Valores próximos aos das células não tratadas não foram observados.

Para avaliar a extensão da associação do V_1 ou V_{15} com a membrana plasmática, as células foram lavadas duas vezes no tempo inicial e após 6 h, seguidas da avaliação do empacotamento de lipídios (Figuras 53b e c,

respectivamente). Como os POVs avaliados aqui não são hidrofóbicos e não foram observados indícios da inserção do **V₁₀** na interface lipídica de micelas reversas, ^{109; 110; 188} poderia se antecipar que o **V₁₅**, em particular, seria facilmente removido por meio da lavagem da superfície extracelular da célula. No entanto, nem no tempo inicial, nem após 6 h (Figuras 53c), as lavagens adicionais resultaram em um retorno da ordem dos lipídios aos valores basais. O mesmo foi observado para o **V₁**, sugerindo que pelo menos parte do **V₁** ou **V₁₅** permanece fortemente associados à membrana celular, sofre reações em contato com as proteínas de membrana ou é internalizado.

Propõe-se que para POVs maiores e de elevada carga superficial, como **V₁₅**, uma interação com interfaces hidrofóbicas e membranas não ocorreria prontamente, portanto, esses resultados sugerem que os efeitos desses compostos resultam em mudanças químicas no sistema que permitam essa interação com a membrana ou que permitam até mesmo a internalização do POV.

Os estudos apresentados nessa seção não foram realizados com o **V₁₄** porque, conforme será mostrado na Seção 3.4.4, estudo da estabilidade dos POVs no meio de cultura DMEM, esse composto se decompõe muito rapidamente no meio de cultura e por esse motivo, os resultados seriam difíceis de interpretar de forma compreensiva.

3.4.3. Estudo dos níveis de agregação do LHR em células CHO

Os oxocompostos de vanádio foram também avaliados em sua capacidade de levar a agregação do LHR e nos níveis intracelulares de cAMP nas células CHO (Figura 54), com medidas de anisotropia e nível intracelular de cAMP feitas em um intervalo de 24 h. A concentração dos compostos utilizada foi determinada a partir dos resultados de citotoxicidade apresentados na seção anterior, sendo avaliadas nesta etapa as concentrações de 10, 2,0, 4,0 ou 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**, respectivamente.

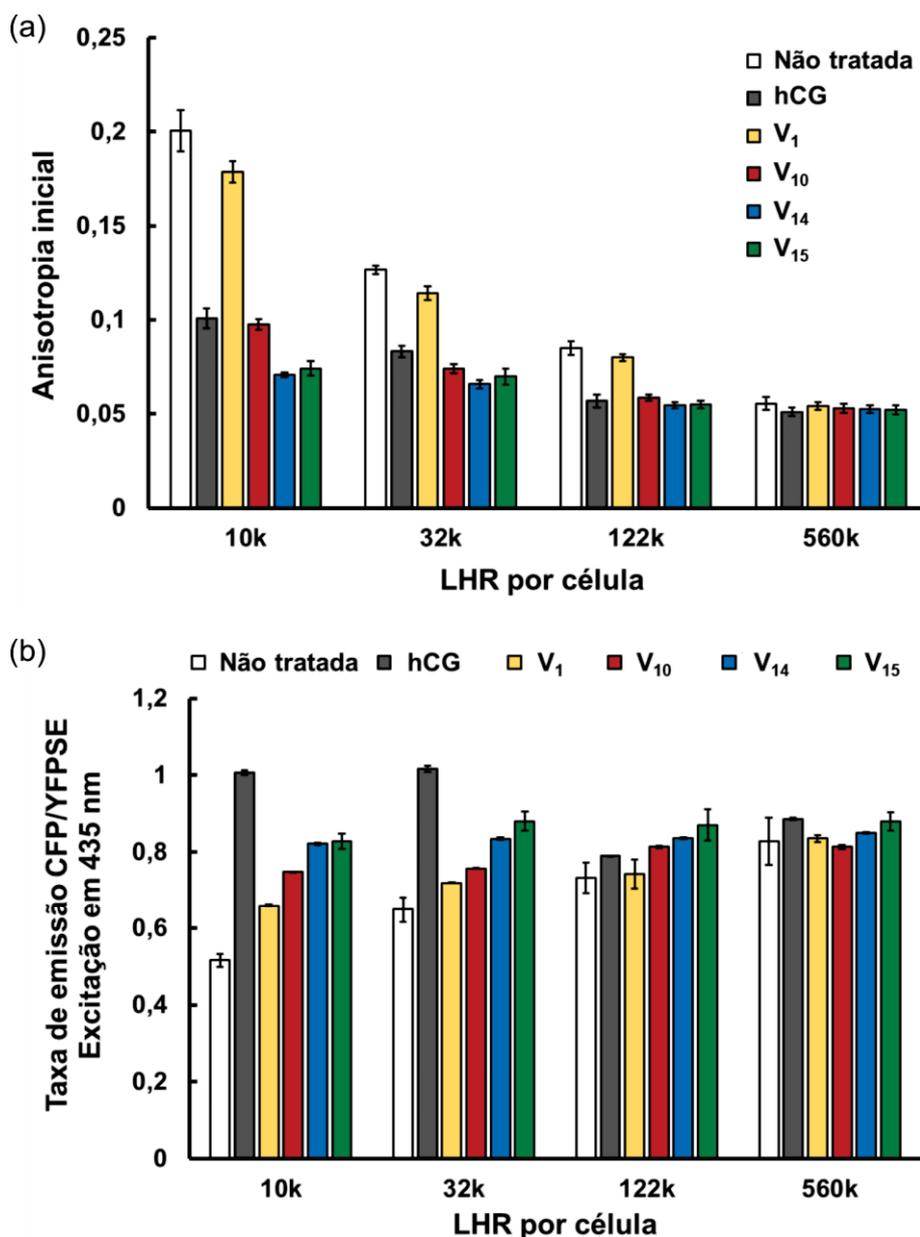


Figura 54 (a) Gráfico da anisotropia inicial em células expressando quantidades diferentes de LHR tratadas com V₁, V₁₀, V₁₄ e V₁₅. Valores menores de anisotropia inicial são indicativos de agregação do LHR. (b) Níveis intracelulares de cAMP, modulado pelo efeito do número de LHR por célula tratada com V₁, V₁₀, V₁₄ ou V₁₅. Os dados mostrados são a média e desvio padrão de 25 a 43 medições individuais, dependendo do tratamento. hCG = gonadotrofina coriônica humana, empregada como referência de resposta hormonal. Concentração: hCG = 100 nmol L⁻¹, V₁ = 10 μmol L⁻¹, V₁₀ = 2,0 μmol L⁻¹, V₁₄ = 4,0 μmol L⁻¹, V₁₅ = 6,0 μmol L⁻¹.

Na Figura 54a, o gráfico da anisotropia inicial em células CHO tratadas com V₁, V₁₀, V₁₄ e V₁₅ expressando diferentes quantidades de LHR é apresentado. Neste, quanto menores os valores de anisotropia inicial observados, maior a agregação de LHR causada pelo tratamento utilizado.

Portanto, dentre os compostos de vanádio avaliados, o **V₁** causou a menor perturbação na ordem lipídica da célula, levando a menor agregação do LHR do que os POVs. As respostas celulares obtidas para o **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** foram comparáveis com os resultados das culturas tratadas com a gonadotrofina coriônica humana (hCG), um hormônio produzido naturalmente por mulheres durante a gravidez e utilizado aqui como um controle.

Pode-se observar ainda que as células que expressaram pouco LHR (≤ 32000 LHR/ célula) exibiram alterações expressivas no empacotamento lipídico devido a interação com os POVs. Enquanto as células que superexpressaram o LHR (> 100000 LHR / célula) já possuem um alto índice de agregação do LHR devido à alta concentração do mesmo e, portanto, não apresentaram nenhum efeito.

Ao avaliar os níveis de cAMP, uma relação comparativamente simples entre estes e a agregação do LHR pode ser observada.^{120; 189} Isso se dá porque receptores amplamente agrupados também sinalizam ativamente, seja pela ligação ao controle hCG, exposição das células ao composto de vanádio, ou superexpressão de LHR. Portanto, mesmo considerando células que expressam 10000 LHR por célula, esta relação já é aparente.

O aumento na razão entre as proteínas CFP/YFPSE^a (proteína fluorescente ciano aprimorada/ proteína fluorescente amarela sensibilizada), apresentado no eixo y do gráfico na Figura 54b, indica um aumento no nível de cAMP intracelular. Enquanto na ausência de cAMP no meio, há uma redução na razão entre essas proteínas. Por exemplo, a amostra não tratada exibe altos valores de anisotropia inicial^b e têm baixos níveis basais de cAMP intracelular. Enquanto, a exposição das células ao controle hCG ou compostos (**V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**) aumenta o nível de cAMP intracelular.

Destaca-se que a atividade na agregação do LHR e aumento no nível de cAMP observada pelo **V₁₅** foi elevada. Uma vez que o nível de agregação do LHR em células tratadas com o POV diminuiu apenas após duas lavagens das

^a **Funcionamento da sonda no modelo utilizado** – Na ausência de cAMP, a estrutura molecular da sonda é dobrada de forma que o CFP fica perto do eYFP, dando origem a uma transferência substancial de energia do CFP para eYFP e assim uma emissão do eYFP sensibilizado. Já a ligação da cAMP leva a um desdobramento da sonda, causando um aumento na emissão do CFP e uma diminuição na emissão do eYFP sensibilizado.

^b **Anisotropia inicial** – Fornece informações sobre a dinâmica rotacional das sondas fluorescentes inseridas nos sistemas de interesse. Usada para caracterizar a estrutura e dinâmica de membranas plasmáticas, assim como interação de moléculas que modulam ou modificam suas propriedades.

células, enquanto para o V_{10} foi observada a reorganização na membrana lipídica após a primeira lavagem. Esta observação sugere que os efeitos desses compostos na fluidez da membrana e/ ou na sinalização iniciada resultam em mudanças estruturais que permitem a interação com a membrana ou a internalização do POV. Embora, a internalização do complexo de vanádio seria esperada para compostos menores, como o V_1 .

3.4.4. Estudo da estabilidade dos POVs no meio de cultura DMEM

A estabilidade e a especiação do V_1 , V_{10} , V_{14} ou V_{15} sob a condição dos ensaios biológicos foram avaliadas pelo preparo de soluções no meio DMEM e solução aquosa com pH ajustado para 7,4. As espécies formadas nessas condições e em soluções de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram monitoradas por 24 h em tempos de 0, 3, 10 e 24/34 h usando RMN de ^{51}V e RPE, uma vez que não é possível avaliar a estabilidade dos compostos na membrana celular.

Os espectros de RMN de ^{51}V no meio DMEM em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de V_1 (Apêndice 2, Figura 4a), mostram que houve a formação majoritária da espécie $V_1 + PV$ (HVPO_7^{3-}) em todo o decorrer do experimento, com uma pequena contribuição das espécies V_2 ($\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_4^{2-}$) e V_4 ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), favorecidas no pH estudado de 7,4.

Os estudos de RPE para o V_1 foram realizados para verificar se houve a redução dos centros de vanádio no meio de cultura, mas nenhum sinal foi observado nos mesmos. Isso indica que a adição de V_1 às células CHO não leva à formação de grandes quantidades de espécies de vanádio(IV), como foi relatado anteriormente em levedura.¹⁹⁰

Os espectros da solução de V_{10} no meio de cultura DMEM mostram que uma pequena quantidade das espécies de menor nuclearidade de vanádio(V), V_1+PV e V_4 , se forma no tempo inicial, mas que alguma concentração de V_{10} permanece em solução até o tempo de 10 h (Apêndice 2, Figura 4b).

Com o decorrer do experimento, pode ser observado que a concentração de V_{10} diminui, passando de 80% no tempo inicial para menos de 5% após 24 h, com um aumento gradativo na concentração das espécies de menor nuclearidade (V_4 e V_5). Assim como o resultado de RPE para o V_1 , não foi

observada a redução dos centros de vanádio(V) e formação de espécies contendo vanádio(IV) nas amostras de V_{10} e, portanto, nenhum sinal no RPE.

Para o V_{14} , que contém 12 átomos de V^V e 2 de V^{IV} , o espectro de RMN de ^{51}V apresenta inicialmente uma baixa intensidade de sinais relativos a espécies de vanádio(V). Uma vez que, a presença dos centros de vanádio(IV) na estrutura do POV e a deslocalização de elétrons torna o polioxovanadato de valência mista indetectável pela técnica. Na Figura 55a, pode-se observar que, de forma semelhante ao V_{10} , o V_{14} foi parcialmente decomposto no tempo inicial, apresentando uma pequena quantidade de V_{10} , V_1+PV e V_4 .

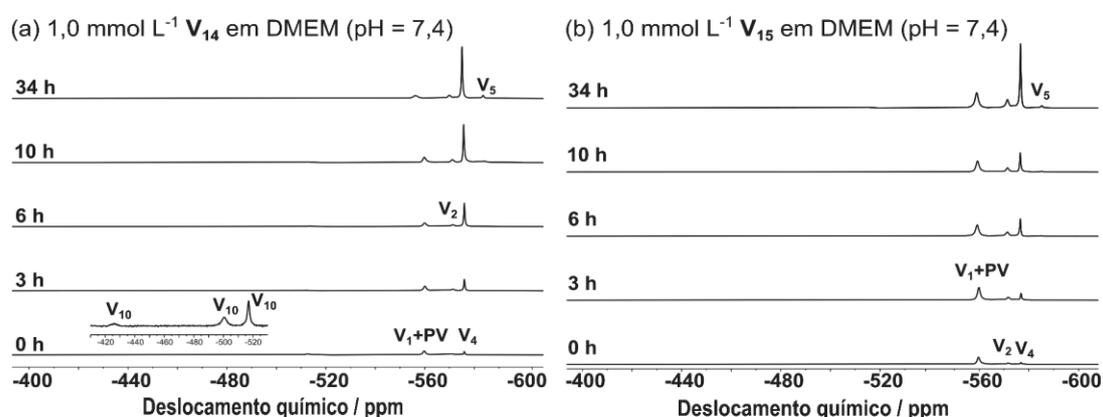


Figura 55 Espectros de RMN de ^{51}V para (a) V_{14} , (b) V_{15} em um período de 0, 3, 6 e 24/34 h em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) em concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As espécies de vanádio(V) observadas nos espectros foram: V_1 ($H_2VO_4^-$), V_2 ($H_2V_2O_7^{2-}$), V_4 ($V_4O_{12}^{4-}$), V_5 ($V_5O_{15}^{5-}$), PV ($HVPO_7^{3-}$) e V_{10} ($H_2V_{10}O_{28}^{4-}$).

Após 3 h de incubação da solução de V_{14} no meio DMEM, a concentração de espécies de vanádio(V) na solução aumenta, com a formação da espécie V_2 em soma ao V_1+PV e V_4 . No entanto, não há mais evidência de V_{10} , uma espécie predominantemente estável em pH de 3 a 6. Após 24 h, os espectros indicam que a amostra do V_{14} sofre quebra completa formando apenas espécies de menor nuclearidade de vanádio(V) e nenhum sinal referente a espécies contendo o V^{IV} presente. Combinados, esses resultados indicam que a adição de V_{14} às células CHO resulta em uma interação do POV intacto com o meio de cultura nos tempos iniciais do experimento e que os centros de vanádio(IV) do agregado são oxidados durante a incubação e no decorrer do experimento levando a quebra da estrutura polinuclear.

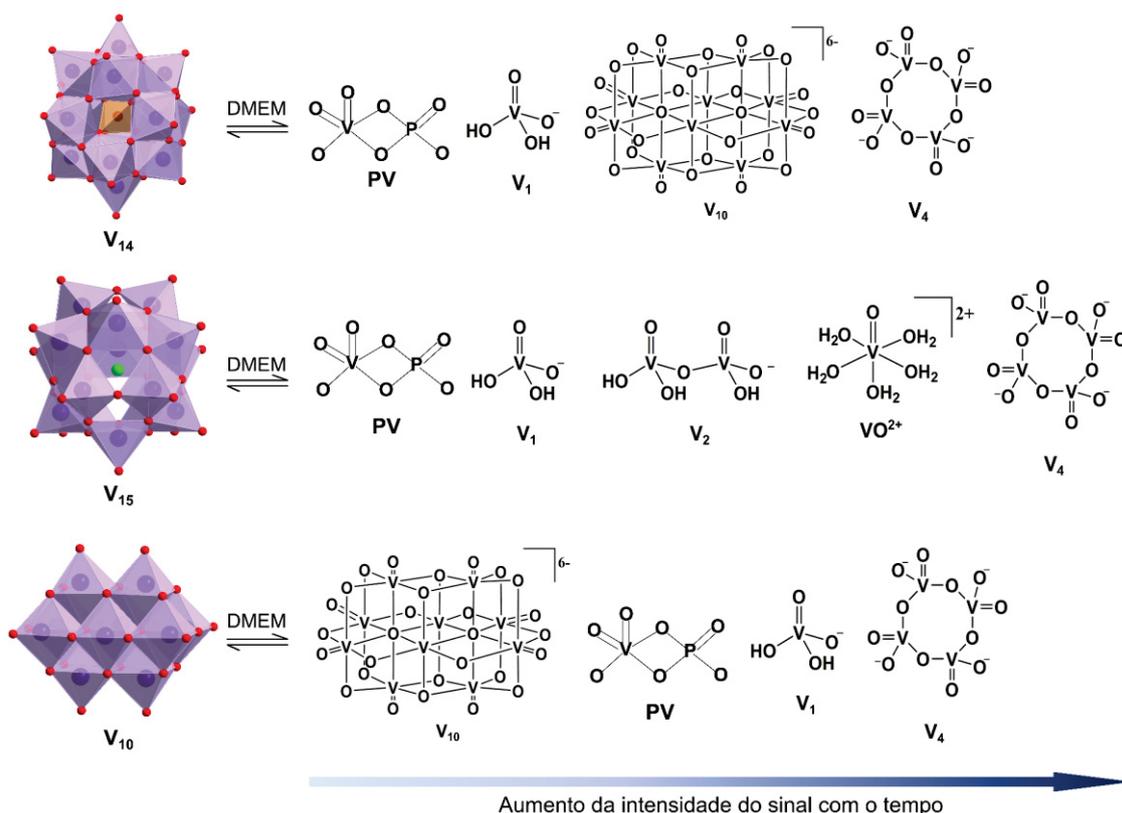
De forma similar ao V_{14} , o V_{15} intacto não apresentaria sinais no RMN de ^{51}V devido à presença de valência mista (7 V^V e 8 V^{IV}) em sua estrutura. Os resultados apresentados na Figura 55b, apontam para a formação de sinais de baixa intensidade relativos à formação de espécies de menor nuclearidade (V_{1+PV} , V_2 e V_4) no tempo inicial da solução de V_{15} em meio DMEM, as quais se mantêm durante o experimento, indicando uma manutenção parcial da estrutura do agregado no meio.

Nenhuma evidencia da formação de espécies de maior nuclearidade de vanádio(V), como o V_{10} ou a espécie análoga ao V_{15} completamente oxidada (V_{15}^V), foi observada nesses espectros. Esta última sendo descrita previamente por raios X de monocristal e por espectroscopia de RMN de ^{51}V ($\delta = -507, -531, -584$ e -597 ppm) apresentando baixa estabilidade em solução.¹⁹¹ No entanto, dificilmente esta espécie seria formada nesse sistema, uma vez que, sua quebra é descrita em pH abaixo de 3,5 e produz as espécies V_1 e decavanadato na solução resultante.¹⁹¹

Neste trabalho, o meio DMEM é tamponado em pH 7,4, o que leva a formação de V_1 e outras espécies de menor nuclearidade estáveis nessas condições como pode ser observado no Esquema 10 que mostra as espécies formadas no tempo 0 h para o V_{14} , V_{15} e V_{10} .

Nos períodos mais longos de incubação do V_{15} , pode-se observar que a quantidade de oxocompostos de vanádio(V) aumenta, mas mesmo após 24 h, a distribuição das espécies V_{1+PV} , V_2 , V_4 e V_5 é consistente com uma concentração menor de vanádio(V) disponível no meio de cultura do que aquela observada para o V_{14} nas mesmas condições, por exemplo.

Portanto, os resultados de RMN de ^{51}V apresentados para esse sistema em DMEM sugerem uma quebra menor da estrutura polinuclear do V_{15} e nenhuma formação da espécie V_{10} no meio, o que nos permite atribuir o efeito na agregação do LHR ao contato do sistema com o polioxovanadato de valência mista de origem.



Esquema 10 Equilíbrios gerados para os sistemas de V_{14} , V_{15} e V_{10} no meio de cultura DMEM (pH = 7,4) determinadas por RMN de ^{51}V e de RPE, com flexa indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.

Para verificar as espécies de vanádio(IV) formadas no meio de cultura, foram ainda avaliadas duas concentrações dos POVs V_{14} e V_{15} em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) por RPE (Figura 56).

Os espectros para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de V_{14} são apresentados na Figura 56, mostrando que para o V_{14} o sinal alargado da espécie polinuclear ($g = 1,98$ e $\Delta_{pp} = 32 \text{ mT}$) aumenta no período de 3 h e reduz expressivamente após 24h, indicando que pode ocorrer uma interconversão entre diferentes espécies de vanádio e redução dos centros de vanádio(IV) a vanádio(V), como proposto anteriormente para o sistema estudado em meio de cultura LB (Seção 4.2.3.).

O V_{15} , por sua vez, apresenta um espectro com a presença de um sinal alargado atribuído a presença de uma espécie polinuclear contendo valência mista ($g = 1,97$ e $\Delta_{pp} = 36,2 \text{ mT}$) sobreposto ao espectro hiperfino de espécies mononucleares de vanádio(IV) (Figura 56). Como a análise foi realizada em

DMEM, a espécie mononuclear de vanádio(IV) poderia ser tanto o complexo de oxovanádio(IV), $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, quanto um produto formado entre as espécies de vanádio(IV) liberadas após a quebra do POV e componentes do meio.

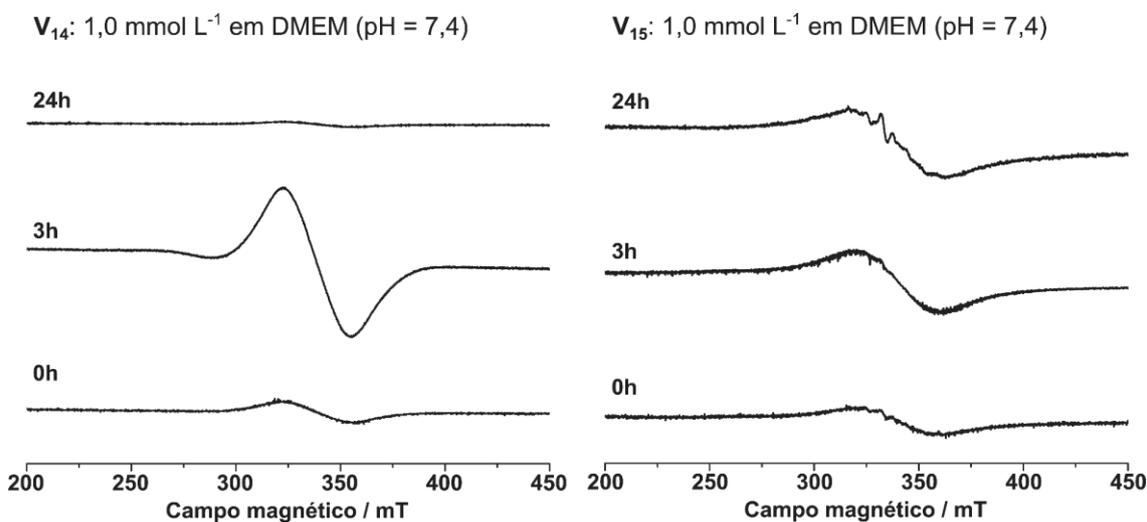


Figura 56 Espectros de RPE em banda-X a 77K para (a) V_{14} , (b) V_{15} em um período de 0, 3 e 24 h em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) em concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Observa-se ainda um pequeno aumento na intensidade do sinal relativo à espécie polinuclear com o tempo no espectro do V_{15} , assim como, do sinal hiperfino indicando uma maior formação da espécie mononuclear. Essa espécie polinuclear pode ser o próprio polioxovanadato de origem, V_{15} , ou um produto da interconversão entre diferentes espécies polinucleares de valência mista.

Os estudos de RPE também foram realizados em concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Apêndice 2, Figura 5), os quais apresentaram resultados bastante parecidos com a menor concentração, porém com uma maior redução da intensidade do sinal do V_{15} com o tempo. Quando comparados ao espectro do sulfato de vanadila (Apêndice 2, Figura 6) nas mesmas condições, o qual apresenta um característico da espécie de oxovanádio(IV), $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, pode se observar que os perfis dos espectros são distintos em meio DMEM. No entanto, o comportamento das espécies se repete entre eles, com a redução da intensidade do sinal com o tempo, indicando decomposição ou interações com o meio de cultura em questão.

3.4.5. Estudo da estabilidade dos POVs em solução aquosa pH 7,4

Análises comparativas dos POVs foram realizadas em solução aquosa a pH 7,4 (Figura 57), visando a utilização de um meio menos complexo do que o DMEM. Uma vez que, no meio de cultura e nos ensaios biológicos há componentes como o fosfato e tampões, e com isso, a possibilidade de formação de espécies de vanádio com esses componentes, como por exemplo o complexo de vanádio e fosfato (PV, $HVPO_7^{3-}$), que fornece um sinal alargado no espectro de RMN de ^{51}V .

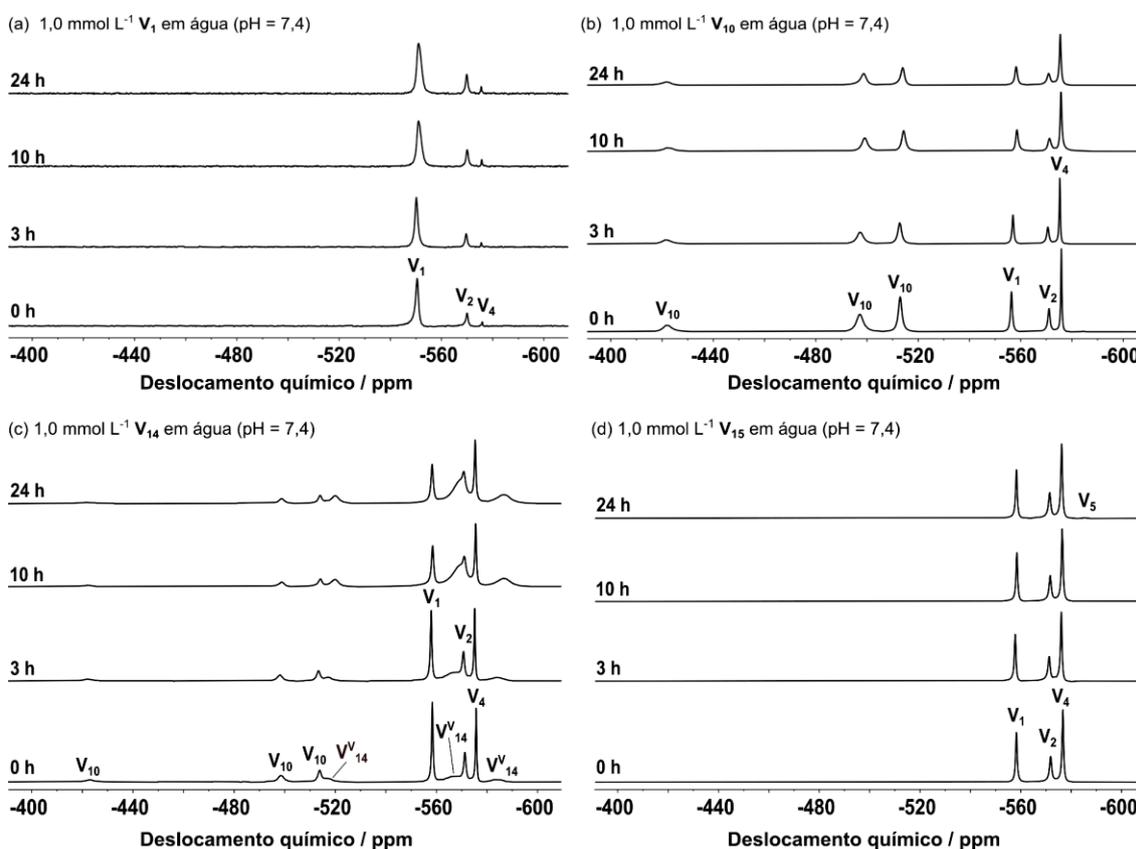


Figura 57 Espectros de RMN de ^{51}V para (a) V₁, (b) V₁₀, (c) V₁₄ e (d) V₁₅ em um período de 0, 3, 6 e 24/34 h em solução aquosa com pH ajustado para 7,4 em concentração de 1,0 mmol L⁻¹. As espécies de vanádio(V) observadas nos espectros foram: V₁ ($H_2VO_4^-$), V₂ ($H_2V_2O_7^{2-}$), V₄ ($V_4O_{12}^{4-}$), V₅ ($V_5O_{15}^{5-}$), V₁₀ ($H_2V_{10}O_{28}^{4-}$) e V₁₄ ($H_4V_{14}O_{42}P^{5-}$).

Nos espectros em solução aquosa do V₁, por exemplo, o sinal relativo a essa espécie contendo fosfato não é observado, dando lugar ao sinal característico e estreito do V₁, o qual mantém sua intensidade nas 24 h do

experimento (Figura 57a). Para o V_{10} , pode-se observar uma decomposição menos expressiva, o qual está presente em 75% no tempo inicial e 50% após um período de 24h (Figura 57b).

O V_{14} mostrou uma quebra distinta da observada em DMEM quando estudado em solução aquosa com pH 7,4 (Figura 57c, Tabela 17). Nesses espectros foi observada a formação da espécie polinuclear V_{14} -oxidado ($\delta = -523, -572$ e -590 ppm, $H_4V_{14}O_{42}P^{5-}$ ou V_{14} -oxidado) que aumenta com o tempo em solução, de 22 a 45% dentro das 24 h de experimento, além da presença dos oligômeros V_1, V_2 e V_4 . Outra diferença notável entre os resultados da solução de V_{14} é a presença de sinais relativos à espécie decavanadato no ponto inicial, o que não foi observado para a mesma condição em meio DMEM.

Tabela 17 Composição proposta para a solução aquosa (pH = 7,4) e em meio DMEM (pH = 7,4) para o V_1, V_{10}, V_{14} e V_{15} na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ no tempo de 0h e 24h (*)

Tempo	Espécies de $V^{V(a)}$	Espécies de $V^{IV(b)}$	Espécies de $V^{V(a)}$	Espécies de $V^{IV(b)}$
	Meio aquoso (pH = 7,4)		Meio DMEM	
V_1	0h	V_1, V_2, V_4	Nenhuma	V_1, PV, V_2, V_4
V_1	24h	V_1, V_2, V_4	Nenhuma	$V_1, PV, V_2, V_4, V_{10}$
V_{10}	0h	$V_1, V_2, V_4, V_5, V_{10}$	Nenhuma	V_1, V_2, V_4, V_{10}
V_{10}	24h	V_1, V_2, V_4	Nenhuma	V_1, PV, V_2, V_4, V_5
V_{14}	0h	V_1, V_2, V_4, V_{10}	POV-VM ^(d) , VO^{2+}	V_1, PV, V_2, V_4, V_5
V_{14}	24h	$V_1, V_2, V_4, V_{10}, V_{14}$ -oxidado	POV-VM, VO^{2+}	V_1, PV, V_2, V_4, V_5
V_{15}	0h	V_1, V_2, V_4	POV-VM, VO^{2+}	V_1, PV
V_{15}	24h	V_1, V_2, V_4	POV-VM, VO^{2+}	V_1, PV, V_2, V_4

(*) Sumário dos resultados de RMN de ^{51}V e RPE apresentados nesta seção.

(a) Determinado por RMN de ^{51}V a temperatura ambiente. (b) Determinado por RPE em banda X a 77 K. (d) POV-VM = polioxovanadato de valência mista não identificado. (e) VO(L) = produto formado das espécies de V^{IV} liberadas após a quebra do agregado e potencial interação com os componentes do meio.

O V_{15} , por sua vez, apresentou menores quantidades dos oligômeros V_1, V_2 e V_4 quando comparado ao resultado em DMEM, porém neste caso sem alterações com o decorrer do tempo, indicando que a estrutura polinuclear se mantém parcialmente nessas condições Figura 57d.

Os resultados apresentados nas seções 3.4.5. e 3.4.6 foram resumidos na Tabela 17. Esses dados refletem o decréscimo da concentração de V_{10} de 80% no tempo inicial para 5% após 24h, calculado por meio de integração dos

sinais de RMN. De forma similar, o V_{14} é decomposto no decorrer das 24 h do experimento, enquanto a linha alargada no EPR correspondente a espécie polinuclear sugere que o V_{15} se mantém em solução após 24 h, se não em sua totalidade, pelo menos parcialmente.

Deve-se notar que os três POVs estão presentes no meio de cultura ao início do tratamento celular. Porém, após 24 h, o V_{15} parece ser o único POV ainda em solução, embora alguma decomposição possa ser observada. Interessantemente, não houve a formação de V_{10} nas soluções de V_{15} e V_{14} , indicando que quaisquer efeitos na função celular desses compostos não devem ser atribuídos a formação de V_{10} no meio.

Além disso, os resultados indicam que a interação do POV com os lipídios da membrana celular pode não requerer ligação covalente, consistente com a proposta do POV atuando como entidade responsável pelo resultado e não apenas pela formação de V_{10} ou outros oxovanadatos no meio.

3.4.6. Considerações sobre o sistema

3.4.6.1. Efeito dos polioxovanadatos na camada lipídica de células CHO

Os três POVs e o V_1 interagem com os lipídios da membrana, reduzindo o seu empacotamento nas condições avaliadas. Esse efeito foi diminuído ao longo das 24 h decorridas do experimento ou, no caso do V_1 e V_{15} , por lavagem adicional das células nessas condições.

Em todos os pontos avaliados durante a recuperação das células mediante a exposição ao composto de vanádio, a perturbação na ordem lipídica da célula que aumentou em relação aos valores basais pareceu afetar a extensão da agregação de LHR quando expresso em números de 10000 LHR por célula. Porém, o mesmo efeito da perturbação lipídica na agregação do LHR não foi observado quando os receptores foram superexpressados nas células CHO e a aglomeração natural dos receptores é observada.

Propomos que a associação dos POVs com os lipídios apropriadamente associados pode não requerer uma ligação covalente e interações não covalentes podem ser suficientes. Esses resultados são consistentes com o POV

atuando como entidade intacta e não por meio da formação de V_{10} . Para o V_{15} , este efeito é particularmente claro, porque não foi observada a formação de V_{10} no sistema e parte de V_{15} parece estar intacta ao final da incubação.

A migração de LHR da membrana principal, onde há interação dos POVs ou V_1 com os lipídios da membrana, para os microdomínios da membrana, onde os lipídios estão mais densamente compactados, concentra os receptores de forma mais efetiva. Essa concentração de receptores em microdomínios de membrana, conforme demonstrado anteriormente para o BMOV ou $VOSO_4$, produz a agregação de LHR e ativação dos receptores, que então sinalizam intracelularmente.¹²⁰ Embora pareça que os POVs são decompostos e eliminados da membrana em aproximadamente 24 h, não é claro o que acontece com os compostos ao longo deste tempo.

Sabemos que, mesmo monitorando os vanadatos no meio de cultura com uso de técnicas espectroscópicas, não é possível monitorar os eventos que ocorrem na membrana celular. Portanto, nossa proposta leva em consideração que várias espécies se formam no meio, o que torna improvável que apenas um tipo de interação esteja ocorrendo no sistema. Sendo assim, foram propostos três modos de ação com que os POVs e outros oxovanadatos podem estar exercendo seu efeito sobre o sistema celular, apresentados na Figura 58.

Os modelos apresentados levam em consideração propostas relatadas anteriormente para interação de compostos de vanádio com modelos de membranas celulares,^{134; 182; 183} como mostrado na Figura 15, e os resultados obtidos neste trabalho. Aqui propomos que em (a) os POVs podem interagir com as proteínas de membrana das células sem ser internalizados; ou seja, que os POVs podem interagir com estruturas extracelulares, mas, devido à sua hidrofobicidade, são menos propensos a se inserir em bicamadas lipídicas.

Em (b) propomos que os POVs podem ainda impactar a bicamada lipídica, sofrer hidrólise, seguida da internalização das espécies formadas nessa condição; ou seja, mesmo que os POVs sejam menos propensos a se inserir em bicamadas lipídicas, a especiação desses compostos pode ser suficiente para produzir compostos contendo vanádio que são mais lipofílicos e, desta forma, mais propensos a interagir com a bicamada lipídica. E por fim, (c) o efeito pode ser gerado através de um processo de transferência de elétrons entre o

POV/oxovanadato e as proteínas de membrana, gerando conversão de V^{IV} em V^V ou vice-versa.

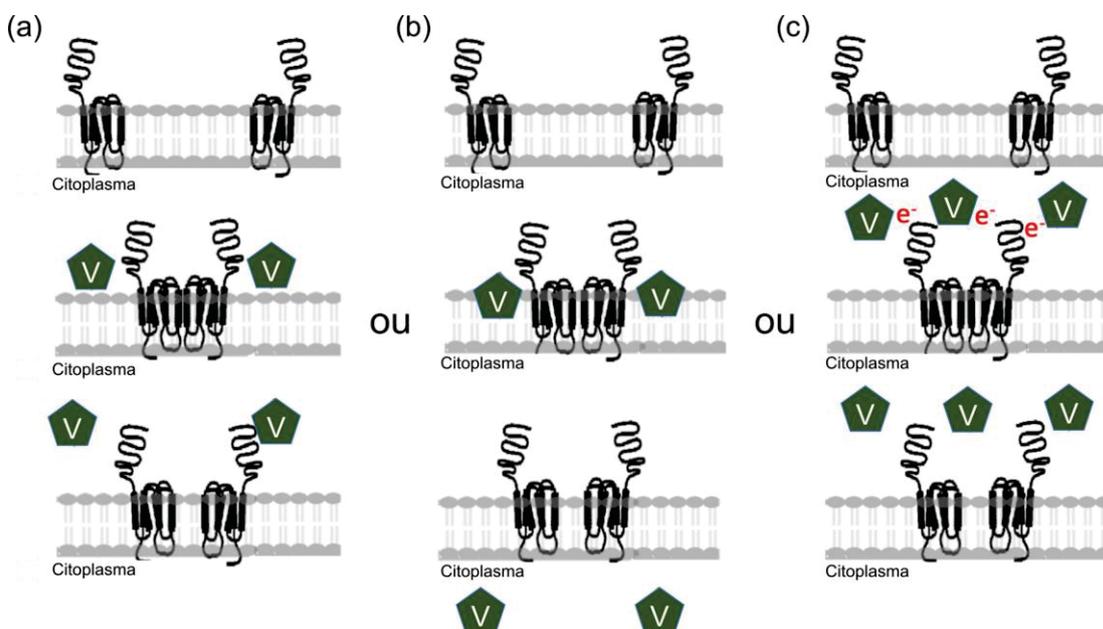


Figura 58 Modelos de modos de ação alternativos dos POVs nas membranas celulares com baixa densidade de receptores. (a) POV interage com as membranas celulares CHO sem ser internalizado; (b) POV impacta a bicamada lipídica, hidrolisa e a espécie gerada é internalizada; ou (c) POV age através de transferência de elétrons.

Os oxocompostos de vanádio podem, pelo menos em parte, ser responsáveis pelas mudanças no empacotamento de lipídios que são observados nas células e pela concentração de LHR nas jangadas (do inglês, *rafts*) de membrana. Por exemplo, nossos resultados mostram que o V_{15} não foi removido prontamente por lavagens de células adicionais, assim como o V_1 , provavelmente refletindo o fato de que estes estão sendo internalizados; é, no entanto, possível que o V_{15} e os demais POVs internalizem seus produtos de hidrólise.

Pode ser interessante considerar que as mudanças conformacionais no LHR que levam à transdução de sinal podem ser devido a interação do receptor com as ROS disponíveis no meio. Assim, as interações indiretas de POMs com LHR podem ser acompanhadas por um processo de transferência de elétrons envolvendo ROS que leva a mudanças na conformação do receptor, promoção da agregação de LHR e subsequente sinalização.

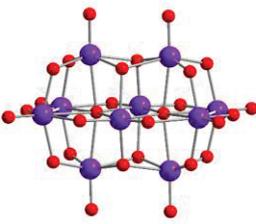
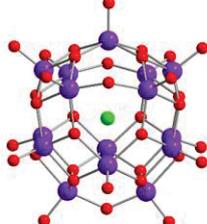
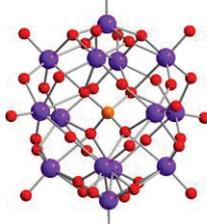
As interações da bicamada lipídica com espécies lipofílicas e a internalização de compostos de vanádio são atraentes do ponto de vista

funcional, uma vez que os alvos de fosfatase para esses compostos são encontrados no citoplasma da célula.¹⁸⁶ Para muitos compostos que funcionam como drogas, a capacidade de transitar pela membrana plasmática, entrar no citoplasma celular e, em seguida, atingir funções ou estruturas intracelulares é fundamental para sua ação¹⁹².

Sendo preciso considerar que o transporte desses compostos pode ocorrer por uma via ainda não identificada de transporte pela membrana para o interior da célula CHO. E que de acordo com as regras de Lipinski^{193; 194}, que descrevem os requisitos para uma droga ideal capaz de atravessar membranas, compostos pequenos e neutros, tais como BMOV, podem penetrar nas membranas,¹⁷⁸ ao contrário dos POVs descritos aqui. No entanto, não podemos afirmar que esses mecanismos ocorram exclusivamente a nível celular devido à natureza complexa da especiação de compostos de vanádio e à multiplicidade de efeitos possíveis em um determinado momento após a introdução dos compostos no meio de cultura.

3.4.6.2. *Correlação entre espécies identificadas nos diferentes meios de cultura para V₁₀, V₁₅ e V₁₄*

Anteriormente, a química em solução dos polioxovanadatos foi avaliada em diferentes condições de meio de cultura, com o meio LB (Luria-Bertani, pH = 6,0)^{52; 53} e nas seções anteriores em meio 7H9 (pH = 6,6) e DMEM (pH = 7,4). Nesses foi observada a formação de espécies de vanádio(IV) e vanádio(V) após a solubilização dos POVs (**V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**) mostrando que o perfil de especiação muda de acordo com o meio de cultura estudado (Esquema 11). Além disso, podemos observar um aumento na complexidade dos equilíbrios presentes em solução para os sistemas contendo valência mista, quando comparados ao POV completamente oxidado V₁₀. No entanto, em todas as condições esses POVs sofrem processos de hidrólise dentro do período de 24 h avaliado.

	POV	POV valência mista	
			
Especiação (0 h)	V₁₀	V₁₅	V₁₄
H ₂ O	V ₁₀	POV, V ₁ , V ^{IV} O ²⁺	POV, V _{14-oxidado} , V ₁₀ , V ^{IV} O ²⁺
LB	V ₄ , V ₁₀	POV, V ₁ , PV, V ^{IV} O(L)	POV, V ₁₀ , V ^{IV} O(L)
7H9	V ₁₀	POV, V ₁ , PV, V ^{IV} O(L)	POV, V _{cit} , V ₁ , PV, V ₅ , V ^{IV} O(L)
DMEM	V ₁ , V ₂ , V ₄ , V ₁₀	POV, V ₁ , PV	POV, V ₁ , PV, V ₂ , V ₄ , V ₅

Esquema 11 Resumo dos principais resultados de especiação no tempo de 0 h em solução aquosa e meios de cultura LB (pH = 6,0), 7H9 (pH = 6,6) e DMEM (pH = 7,4) publicados e obtidos neste trabalho por RMN de ⁵¹V e RPE para os POVs **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**. Os átomos de vanádio são mostrados em roxo, oxigênio em vermelho, fosforo em laranja e o cloreto em verde claro.

A análise dos POVs de valência mista, **V₁₄** e **V₁₅**, nos diferentes meios indica que nas condições em que o efeito inibidor do crescimento celular é observado, ou seja, em baixa concentração dos agregados, a formação do **V₁₀** no meio não seria observada. Uma vez que, nos meios de cultura avaliados com os produtos, **V₁₄** e **V₁₅**, o decavanadato pode ser observado apenas na maior concentração estudada e após um período de 24 h de incubação.

No geral, os estudos anteriores de compostos de vanádio em sua atividade inibitória de culturas micobacterianas indicaram a liberação de um componente excretado pelas culturas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* na presença dos compostos, atribuído à rápida hidrólise do **V₁₀** no meio de crescimento celular.¹⁰⁵ De forma complementar, outros estudos de sistemas micobacterianos,¹⁹⁵¹⁹⁷ foram identificadas duas fosfatases, PtpA e PtpB, no genoma da *M. tuberculosis* e acredita-se que ambas possam ser secretadas pela bactéria no citoplasma das células hospedeiras. Portanto, durante a incubação e crescimento das culturas micobacterianas essas proteínas podem ser secretadas no meio de cultura, interagindo com os POVs avaliados.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós aprimoramos os procedimentos sintéticos relatados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, relatando não apenas a mudança no ânion encapsulado no agregado, mas também a escolha do agente redutor orgânico aplicado para redução dos centros de vanádio(V), que por sua vez, levou à melhora do rendimento do POV. A metodologia adotada foi efetiva para expansão racional da rota sintética previamente descrita para o preparo do **V₁₄** e **V₁₅**. Assim como, para as sínteses de dois octadecavanadatos de valência mista contendo encapsulados os ânions iodeto, $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{I}] \cdot \text{Me}_4\text{N} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**V_{18I}**), e fosfato, $[\{\text{K}_6(\text{H}_2\text{O})_{12}\text{V}_{18}\text{O}_{41}(\text{PO}_4)\} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$ (**V_{18P}**). Ambos possuem a estrutura do polioxoânion pseudoesférico descrita na literatura, porém na presença de diferentes contraíons e proporção de centros de V^V e V^{IV}.⁷⁹

A avaliação da estabilidade em solução aquosa do **V_{18I}** e **V_{18P}** com auxílio de análises espectroscópicas mostrou que o **V_{18I}** é mais estável do que os demais produtos avaliados pelo nosso grupo de pesquisa, incluindo o **V_{18P}**. O qual apresenta uma especiação mais complexa em solução aquosa, indicando a presença de um equilíbrio de agregação/desagregação da estrutura polinuclear, gerando espécies de menor nuclearidade de V^V, V^{IV} e polinucleares de valência mista (V^V/V^{IV}).

No geral, nossos estudos sugerem que compostos de vanádio podem exibir propriedades que dependem do modelo biológico utilizado,³⁶ o que nos levou ao estudo dos efeitos exercidos por POVs sobre culturas de *E. coli*, *M. smegmatis* e células CHO, permitindo a identificação dos POVs como agentes importantes para os efeitos observados nos sistemas avaliados.

Este trabalho trouxe novas informações e propostas sobre os padrões de reatividade de POVs com agentes alquilantes, explorando a atividade quimioprotetora dos ânions **V_{18I}**, **V_{18P}** e **V₁₀** usando *E. coli* como modelo biológico. Um estudo comparativo entre a natureza das espécies químicas formadas em solução aquosa e em meio LB, na presença e ausência do agente alquilante dietilsulfato, reforça a hipótese de que a hidrólise do POV, seguida pela liberação de oligovanadatos em solução aumenta a toxicidade do agente

alquilante. Enquanto, o efeito quimioprotetor pode ser observado para as estruturas que permaneceram agregadas após a adição de dietilsulfato ao meio. De forma que, o V_{15} e o V_{18} foram os ânions mais promissores na quimioproteção de sistemas biológicos avaliados.

Aqui, também foram avaliados os POVs V_{14} e V_{15} em sua habilidade de inibir o crescimento de culturas de *M. smegmatis*, um sistema ainda pouco estudado e compreendido na literatura atual. Nosso trabalho consiste no segundo estudo de POVs com micobactérias e o primeiro utilizando compostos de valência mista, no qual observou-se que o V_{14} e V_{15} foram efetivos na inibição do crescimento da cultura de *M. smegmatis*, com potencial inibidor de 6 e 100 vezes maior do que o oxovanadato, V_1 , respectivamente. O V_{15} também se mostrou mais efetivo que o V_{14} e o V_{10} , relatado previamente.¹⁰⁵ A avaliação da estabilidade no meio de cultura 7H9 por meio de análises espectroscópicas mostrou que o V_{14} oxida mais rapidamente que o V_{15} , apresentando sinais relativos à formação do V_{10} apenas após 24 h e em elevada concentração dos produtos. O efeito de inibição do crescimento da cultura micobacteriana foi atribuído ao POV, com possível contribuição da química em solução de outras espécies polinucleares e de menor nuclearidade geradas no meio.⁵²

Por fim, avaliamos pela primeira vez na literatura o efeito de polioxovanadatos (V_{10} , V_{14} e V_{15}) na agregação de receptores hormonais da membrana celular. Nos quais, estudos prévios sugerem que compostos de vanádio pequenos podem ser absorvidos pela membrana. Porém, esse processo é consideravelmente mais complexo para POVs, uma vez que, estes são moléculas grandes com carga elevada. De fato, estudos com micela reversa na presença de decavanadato mostram que ele se afasta da interface na camada aquosa.¹¹⁰ Nossos estudos indicam o potencial do V_1 e dos POVs na inicialização da sinalização gerada por receptores presentes na membrana celular, incluindo compostos que não atravessam as membranas facilmente. Corroborando a proposta de que os POVs possam hidrolisar e internalizar na membrana como moléculas menores contendo vanádio. Os estudos de especiação em meio DMEM mostraram a presença de espécies de V^{IV} e V^V sendo formadas no meio, documentando também um potencial envolvimento de processos de transferência de elétrons no efeito observado.

Ao comparar nossos resultados e padrões espectroscópicos, foi possível observar que os polioxovanadatos de valência mista, **V₁₈I** e **V₁₅**, parecem ser os poliânions mais promissores dentre os avaliados, fornecendo a melhor relação entre estabilidade e atividade biológica nos sistemas estudados. No entanto, a estabilidade dos produtos e a grande complexidade dos sistemas em solução ainda são um dos grandes desafios enfrentados na química de polioxovanadatos, especialmente os de valência mista. Deste modo, a avaliação do papel de um número ainda maior de espécies polinucleares em diversos sistemas biológicos é de grande importância para a área, visando o desenvolvimento de sistemas capazes de aprimorar a seletividade dos compostos e a racionalização de drogas mais efetivas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZHAO, J.-W.; LI, Y.-Z.; CHEN, L.-J.; YANG, G.-Y. Research progress on polyoxometalate-based transition-metal–rare-earth heterometallic derived materials: synthetic strategies, structural overview and functional applications. **Chemical Communications**, v. 52, n. 24, p. 4418-4445, 2016.
2. EL MOLL, H.; NOHRA, B.; MIALANE, P.; MARROT, J.; DUPRÉ, N.; RIFLADE, B.; MALACRIA, M.; THORIMBERT, S.; HASENKNOPF, B.; LACÔTE, E.; APARICIO, P. A.; LÓPEZ, X.; POBLET, J. M.; DOLBECQ, A. Lanthanide Polyoxocationic Complexes: Experimental and Theoretical Stability Studies and Lewis Acid Catalysis. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, n. 50, p. 14129-14138, 2011.
3. POPE, M. T. Chapter 9 - Structural chemistry of actinide polyoxometalates. Em: KRIVOVICHEV, S. V.; BURNS, P. C. e TANANAEV, I. G. (Ed.). **Structural Chemistry of Inorganic Actinide Compounds**. Amsterdam: Elsevier, p.341-361, 2007.
4. BHATTACHARYA, S.; AYASS, W. W.; TAFFA, D. H.; NISAR, T.; BALSTER, T.; HARTWIG, A.; WAGNER, V.; WARK, M.; KORTZ, U. Polyoxopalladate-Loaded Metal–Organic Framework (POP@MOF): Synthesis and Heterogeneous Catalysis. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 10512-10521, 2020.
5. LANG, Z.; YANG, P.; LIN, Z.; YAN, L.; LI, M.-X.; CARBÓ, J. J.; KORTZ, U.; POBLET, J. M. Size and charge effect of guest cations in the formation of polyoxopalladates: a theoretical and experimental study. **Chemical science**, v. 8, n. 11, p. 7862-7872, 2017.
6. PLEY, M.; WICKLEDER, M. S. The Cluster Ion $[Pt_{12}O_8(SO_4)_{12}]^{4-}$. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 32, p. 4168-4170, 2004.
7. WU, C.; MA, T.; YAN, L.; ZHANG, T.; SU, Z. Exploring the electronic properties and cation complexation of polyoxoaurates $[Au^{III}_4X_4O_m]^{n-}$ (X = Si^{IV}, P^V, Ge^{IV}, As^V, and Se^{IV}) using quantum chemical calculations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 17, p. 11521-11526, 2015.
8. IZAROVA, N. V.; VANKOVA, N.; HEINE, T.; BIBOUM, R. N.; KEITA, B.; NADJO, L.; KORTZ, U. Polyoxometalates made of gold: the polyoxoaurate $[Au(III)_4As(V)_4O_{20}]_8$. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 10, p. 1886-9, 2010.
9. LIVAGE, J. Hydrothermal Synthesis of Nanostructured Vanadium Oxides. **Materials**, v. 3, n. 8, p. 4175, 2010.
10. GUMEROVA, N. I.; ROMPEL, A. Polyoxometalates in solution: speciation under spotlight. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 21, p. 7568-7601, 2020.

11. MÜLLER, A.; BECKMANN, E.; BÖGGE, H.; SCHMIDTMANN, M.; DRESS, A. Inorganic Chemistry Goes Protein Size: A Mo₃₆₈ Nano-Hedgehog Initiating Nanochemistry by Symmetry Breaking. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 7, p. 1162-1167, 2002.
12. LARONZE, N.; MARROT, J.; HERVÉ, G. Cation-Directed Synthesis of Tungstosilicates. 1. Syntheses and Structures of K₁₀A- α -[SiW₉O₃₄] \cdot 24H₂O, of the Sandwich-Type Complex K_{10.75}[Co(H₂O)₆]_{0.5}[Co(H₂O)₄Cl]_{0.25}A- α -[K₂{Co(H₂O)₂]₃(SiW₉O₃₄)₂] \cdot 32H₂O and of Cs₁₅[K(SiW₁₁O₃₉)₂] \cdot 39H₂O. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 19, p. 5857-5862, 2003.
13. GODIN, B.; VAISSERMANN, J.; HERSON, P.; RUHLMANN, L.; VERDAGUER, M.; GOUZERH, P. Coordination chemistry of the hexavacant tungstophosphate [H₂P₂W₁₂O₄₈]¹²⁻: synthesis and characterization of iron(III) complexes derived from the unprecedented {P₂W₁₄O₅₄} fragment. **Chemical Communications**, n. 45, p. 5624-5626, 2005.
14. CAMPBELL, M. L.; SULEJMANOVIC, D.; SCHILLER, J. B.; TURNER, E. M.; HWU, S.-J.; WHITEHEAD, D. C. Room-temperature catalytic oxidation of alcohols with the polyoxovanadate salt Cs₅(V₁₄As₈O₄₂Cl). **Catalysis Science & Technology**, v. 6, n. 9, p. 3208-3213, 2016.
15. MONAKHOV, K. Y.; BENSCH, W.; KOGERLER, P. Semimetal-functionalised polyoxovanadates. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 23, p. 8443-8483, 2015.
16. MASLYUK, V. V.; MERTIG, I.; FARBEROVICH, O. V.; TARANTUL, A.; TSUKERBLAT, B. Electronic and spin structures of polyoxometalate V₁₅ from a first-principles non-collinear molecular-magnetism approach. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 10-11, p. 1897-1902, 2013.
17. JANJUA, M. R. S. A.; SU, Z.-M.; GUAN, W.; IRFAN, A.; MUHAMMAD, S.; IQBAL, M. A DFT study on the electronic and redox properties of [X₈V₁₄O₅₀]ⁿ⁻ (X = Si^{IV}, Ge^{IV}, P^V, and As^V). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 88, n. 5, p. 434-442, 2010.
18. WANG, L.; FAN, H.; DU, C.; XING, X.; ZHAO, Y.; CHEN, B.; WANG, L. Synthesis, structure and properties of a Co-crystallized complex based on polyoxovanadate [V^{IV}₁₂V^V₆O₄₂]⁶⁻ and a mononuclear vanadium complex [VON(CH₂CH₂O)₃]. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 63, p. 39-41, 2016.
19. WANG, G.; MA, P.; ZHANG, D.; NIU, J.; WANG, J. NiIII-embedded polyoxovanadate: Synthesis, structure and magnetic properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 686, p. 1032-1036, 2016.
20. REHDER, D. The future of/for vanadium. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 33, p. 11749-11761, 2013.

21. HAYASHI, Y. Hetero and lacunary polyoxovanadate chemistry: synthesis, reactivity and structural aspects. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 19–20, p. 2270-2280, 2011.
22. XIE, Y.; HUANG, B.; XU, C.; HU, X.; CHEN, W.; XIAO, Z.; WU, P. A novel 3D network constructed from tetra-substituted trisalkoxy-hexavanadate clusters: $\text{Na}_2[\text{V}^{\text{IV}}_6\text{O}_7\{(\text{OCH}_2)_3\text{CNH}_2\}_4]$. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 84, p. 96-98, 2017.
23. FORSTER, J.; RÖSNER, B.; FINK, R. H.; NYE, L. C.; IVANOVIC-BURMAZOVIC, I.; KASTNER, K.; TUCHER, J.; STREB, C. Oxidation-driven self-assembly gives access to high-nuclearity molecular copper vanadium oxide clusters. **Chemical Science**, v. 4, n. 1, p. 418-424, 2013.
24. AMMAM, M. Polyoxometalates: formation, structures, principal properties, main deposition methods and application in sensing. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, n. 21, p. 6291-6312, 2013.
25. LOPEZ, X.; CARBO, J. J.; BO, C.; POBLET, J. M. Structure, properties and reactivity of polyoxometalates: a theoretical perspective. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 22, p. 7537-7571, 2012.
26. AURELIANO, M.; CRANS, D. C. Decavanadate ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 536-546, 2009.
27. LAYE, R. H.; WEI, Q.; MASON, P. V.; SHANMUGAM, M.; TEAT, S. J.; BRECHIN, E. K.; COLLISON, D.; MCINNES, E. J. L. A highly reduced vanadium(III/IV) polyoxovanadate comprising an octavanadyl square-prism surrounding a dimetallic vanadium(III) fragment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 28, p. 9020-9021, 2006.
28. CHEN, L.; JIANG, F.; WU, M.; LI, N.; XU, W.; YAN, C.; YUE, C.; HONG, M. Half-open hollow cages of pentadecavanadate and hexadecavanadate compounds with large -O-V-O-V- windows. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 11, p. 4092-4099, 2008.
29. MÜLLER, A.; SESSOLI, R.; KRICKEMEYER, E.; BÖGGE, H.; MEYER, J.; GATTESCHI, D.; PARDI, L.; WESTPHAL, J.; HOVEMEIER, K.; ROHLFING, R.; DÖRING, J.; HELLWEG, F.; BEUGHOLT, C.; SCHMIDTMANN, M. Polyoxovanadates: high-nuclearity spin clusters with interesting host-guest systems and different electron populations. synthesis, spin organization, magnetochemistry, and spectroscopic studies. **Inorganic Chemistry**, v. 36, n. 23, p. 5239-5250, 1997.
30. MÜLLER, A.; REUTER, H.; DILLINGER, S. Supramolecular inorganic chemistry: small guests in small and large hosts. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, n. 21, p. 2328-2361, 1995.
31. THOMAS, J.; SHARMA, S.; LOFLAND, S. E.; RAMANUJACHARY, K. V.; RAMANAN, A. Formation of high nuclearity mixed-valent polyoxovanadates in the presence of copper amine complexes. **Journal of Chemical Sciences**, v. 118, n. 1, p. 79-86,

32. HAYASHI, Y.; SHINGUCHI, T.; KURATA, T.; ISOBE, K. Stepwise synthesis of disk- and ball-shaped polyoxovanadates: all-inorganic coordination chemistry of polyoxovanadates. Em: (Ed.). **Vanadium: The Versatile Metal**: American Chemical Society, v.974, 2007. cap. 29, p.408-423. (ACS Symposium Series).
33. SOLÉ-DAURA, A.; NOTARIO-ESTÉVEZ, A.; CARBÓ, J. J.; POBLET, J. M.; DE GRAAF, C.; MONAKHOV, K. Y.; LÓPEZ, X. How does the redox state of polyoxovanadates influence the collective behavior in solution? A case study with $[I@V_{18}O_{42}]^{q-}$ ($q = 3, 5, 7, 11, \text{ and } 13$). **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3881-3894, 2019.
34. AURELIANO, M. Decavanadate toxicology and pharmacological activities: V_{10} or V_1 , both or none? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 6103457, 2016.
35. COSTA PESSOA, J. Thirty years through vanadium chemistry. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 147, p. 4-24, 2015.
36. KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 2, p. 195-200, 2012.
37. BARRIO, D. A.; ETCHEVERRY, S. B. Potential use of vanadium compounds in therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3632-3642, 2010.
38. WAI-YIN SUN, R.; MA, D.-L.; WONG, E. L.-M.; CHE, C.-M. Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. **Dalton Transactions**, n. 43, p. 4884-4892, 2007.
39. BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; LEAL, S. M.; GUISET, H.; PESSOA, J. C.; LORENZO, J.; TANCO, S.; ESCOBAR, P.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 303-312, 2011.
40. TOUMI, S.; RATEL-RAMOND, N.; AKRICHE, S. Decavanadate cage-like cluster templated by organic counter cation: synthesis, characterization and its antimicrobial effect against gram positive *e-feacium*. **Journal of Cluster Science**, v. 26, n. 5, p. 1821-1831, 2015.
41. TRACEY, A. S.; WILLSKY, G. R.; TAKEUCHI, E. S. **Vanadium: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Practical Applications**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press., 2007. 250
42. REHDER, D.; POLENOVA, T.; BÜHL, M. Vanadium-51 NMR. In: WEBB, G. A. (Ed.). **Annual Reports on NMR Spectroscopy**: Academic Press, v.62, 2007. p.49-114.
43. PETTERSSON, L.; ANDERSSON, I.; HEDMAN, B. Multicomponent polyanions. 37. A potentiometric and vanadium-51 NMR study of equilibria in the hydrogen ion-vanadate (H^+ - HVO_4^{2-}) system in 3.0 M-sodium

- perchlorate medium covering the range $1 \lesssim -\lg[\text{H}^+] \lesssim 10$. **Chemica Scripta**, v. 25, n. 4, p. 309-317, 1985.
44. ELVINGSON, K.; GONZÁLEZ BARÓ, A.; PETTERSSON, L. Speciation in Vanadium Bioinorganic Systems. 2. An NMR, ESR, and potentiometric study of the aqueous H^+ -vanadate-maltol system. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 3388-3393, 1996.
 45. ANDERSSON, I.; GORZSÁS, A.; KEREZSI, C.; TÓTH, I.; PETTERSSON, L. Speciation in the aqueous $\text{H}^+/\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{H}_2\text{O}_2/\text{phosphate}$ system. **Dalton Transactions**, n. 22, p. 3658-3666, 2005.
 46. GORZSÁS, A.; GETTY, K.; ANDERSSON, I.; PETTERSSON, L. Speciation in the aqueous $\text{H}^+/\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{H}_2\text{O}_2/\text{citrate}$ system of biomedical interest. **Dalton Transactions**, n. 18, p. 2873-2882, 2004.
 47. MIRANDA, C. T.; CARVALHO, S.; YAMAKI, R. T.; PANIAGO, E. B.; BORGES, R. H. U.; DE BELLIS, V. M. pH-metric, UV-Vis and ^{51}V NMR study of vanadium(V) coordination to α -aminohydroxamic acids in aqueous solutions. **Polyhedron**, v. 29, n. 2, p. 897-903, 2010.
 48. MIRANDA, C. T.; CARVALHO, S.; YAMAKI, R. T.; PANIAGO, E. B.; BORGES, R. H. U.; DE BELLIS, V. M. Formation and structure in aqueous solution of complexes between vanadium(V) and aminohydroxamic acids that potentiates vanadium's insulinomimetic activity: l-glutamic γ -hydroxamic and l-aspartic- β -hydroxamic acids. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, n. 14, p. 3776-3783, 2010.
 49. GORZSÁS, A.; ANDERSSON, I.; PETTERSSON, L. Speciation in aqueous vanadate-ligand and peroxovanadate-ligand systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 517-526, 2009.
 50. CRANS, D. C.; SMEE, J. J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 849-902, 2004.
 51. CRANS, D. C., POSTAL, K., MACGREGOR, J.A. . Vanadium—Speciation chemistry can be important when assessing health effects on living systems. Em: BAGCHI, D. B., M. (Ed.). **Metal Toxicology Handbook** 1st edition. Boca Raton: CRC Press., 2021. cap. Chapter 12, p.510.
 52. POSTAL, K.; MALUF, D. F.; VALDAMERI, G.; RÜDIGER, A. L.; HUGHES, D. L.; DE SÁ, E. L.; RIBEIRO, R. R.; DE SOUZA, E. M.; SOARES, J. F.; NUNES, G. G. Chemoprotective activity of mixed valence polyoxovanadates against diethylsulphate in *E. coli* cultures: insights from solution speciation studies. **RSC Advances**, v. 6, n. 115, p. 114955-114968, 2016.
 53. NUNES, G. G.; BONATTO, A. C.; DE ALBUQUERQUE, C. G.; BARISON, A.; RIBEIRO, R. R.; BACK, D. F.; ANDRADE, A. V. C.; DE SÁ, E. L.; PEDROSA, F. D. O.; SOARES, J. F.; DE SOUZA, E. M. Synthesis, characterization and chemoprotective activity of polyoxovanadates

- against DNA alkylation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 108, p. 36-46, 2012.
54. LINNENBERG, O.; MOORS, M.; SOLÉ-DAURA, A.; LÓPEZ, X.; BÄUMER, C.; KENTZINGER, E.; PYCKHOUT-HINTZEN, W.; MONAKHOV, K. Y. Molecular Characteristics of a Mixed-Valence Polyoxovanadate $\{V^{IV/V}_{18}O_{42}\}$ in Solution and at the Liquid–Surface Interface. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 19, p. 10419-10429, 2017.
55. MARQUES, M. P. M.; GIANOLIO, D.; RAMOS, S.; BATISTA DE CARVALHO, L. A. E.; AURELIANO, M. An EXAFS approach to the study of polyoxometalate–protein interactions: The Case of Decavanadate–Actin. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 10893-10903, 2017.
56. AURELIANO, M.; GANDARA, R. M. Decavanadate effects in biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 979-85, 2005.
57. NOMIYA, K.; TORII, H.; HASEGAWA, T.; NEMOTO, Y.; NOMURA, K.; HASHINO, K.; UCHIDA, M.; KATO, Y.; SHIMIZU, K.; ODA, M. Insulin mimetic effect of a tungstate cluster. Effect of oral administration of homopolyoxotungstates and vanadium-substituted polyoxotungstates on blood glucose level of STZ mice. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 86, n. 4, p. 657-667, 2001.
58. REHDER, D. Perspectives for vanadium in health issues. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 325-338, 2016.
59. PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 24-48, 2015.
60. LI, Y. T.; ZHU, C. Y.; WU, Z. Y.; JIANG, M.; YAN, C. W. Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds. **Transition Metal Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 597-603, 2010.
61. ZHAI, F.; WANG, X.; LI, D.; ZHANG, H.; LI, R.; SONG, L. Synthesis and biological evaluation of decavanadate $Na_4Co(H_2O)_6V_{10}O_{28} \cdot 18H_2O$. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 63, n. 1, p. 51-5, 2009.
62. BISHAYEE, A.; WAGHRAY, A.; PATEL, M. A.; CHATTERJEE, M. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The *in vivo* evidence. **Cancer Letters**, v. 294, n. 1, p. 1-12, 2010.
63. LEON, 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. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 134, p. 106-17, 2014.
64. YANG, H.-K.; CHENG, Y.-X.; SU, M.-M.; XIAO, Y.; HU, M.-B.; WANG, W.; WANG, Q. Polyoxometalate–biomolecule conjugates: a new approach to

- create hybrid drugs for cancer therapeutics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 5, p. 1462-1466, 2013.
65. KIOSEOGLU, E.; PETANIDIS, S.; GABRIEL, C.; SALIFOGLOU, A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 87-105, 2015.
66. ASSEM, F. L.; LEVY, L. S. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 4, p. 289-306, 2009.
67. LEE, S.-Y.; FIENE, A.; LI, W.; HANCK, T.; BRYLEV, K. A.; FEDOROV, V. E.; LECKA, J.; HAIDER, A.; PIETZSCH, H.-J.; ZIMMERMANN, H.; SÉVIGNY, J.; KORTZ, U.; STEPHAN, H.; MÜLLER, C. E. Polyoxometalates—Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, n. 2, p. 171-181, 2015.
68. XU, X.; SPASOJEVIĆ-DE BIRÉ, A.; GHERMANI, N. E.; WEI, Y.; NOVAKOVIĆ, S.; BOŠNJAKOVIĆ-PAVLOVIĆ, N.; WU, P. Experimental evidence of charge transfer in a functionalized hexavanadate: a high resolution X-ray diffraction study. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 19, n. 28, p. 18162-18166, 2017.
69. YATIME, L.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; MUSGAARD, M.; MORTH, J. P.; WINTHER, A.-M. L.; PEDERSEN, B. P.; OLESEN, C.; ANDERSEN, J. P.; VILSEN, B.; SCHIØTT, B.; PALMGREN, M. G.; MØLLER, J. V.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1787, n. 4, p. 207-220, 2009.
70. STEPHAN, H.; KUBEIL, M.; EMMERLING, F.; MÜLLER, C. E. Polyoxometalates as versatile enzyme inhibitors. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 10-11, p. 1585-1594, 2013.
71. BIJELIC, A.; AURELIANO, M.; ROMPEL, A. Polyoxometalates as potential next-generation metallodrugs in the combat against cancer. **Angewandte Chemie International Edition** v. 58, n. 10, p. 2980-2999, 2019.
72. FAUTCH, J. M.; FANWICK, P. E.; WILKER, J. J. Oxidovanadium complexes for the consumption of alkylating toxins. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, n. 1, p. 33-37, 2009.
73. GALANI, A.; TSITSIAS, V.; STELLAS, D.; PSYCHARIS, V.; RAPTOPOULOU, C. P.; KARALIOTA, A. Two novel compounds of vanadium and molybdenum with carnitine exhibiting potential pharmacological use. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 142, p. 109-117, 2015.
74. CHENG, M.; LI, N.; WANG, N.; HU, K.; XIAO, Z.; WU, P.; WEI, Y. Synthesis, structure and antitumor studies of a novel decavanadate complex with a wavelike two-dimensional network. **Polyhedron**, v. 155, p. 313-319, 2018.

75. LIU, Y.; TIAN, S.; LIU, S.; WANG, E. *In vitro* inhibitory effect of polyoxometalates on human tumor cells. **Transition Metal Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 113-117, 2005.
76. QI, W.; ZHANG, B.; QI, Y.; GUO, S.; TIAN, R.; SUN, J.; ZHAO, M. The Anti-proliferation activity and mechanism of action of $K_{12}[V_{18}O_{42}(H_2O)] \cdot 6H_2O$ on breast cancer cell lines. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, p. 1535, 2017.
77. ROUBATIS, L.; ANASTASIADIS, N. C.; PARATRIANTAFYLLOPOULOU, C.; MOUSHI, E.; TASIOPOULOS, A. J.; KARKABOUNAS, S. C.; VELTSISTAS, P. G.; PERLEPES, S. P.; EVANGELOU, A. M. A missing oxidation-state level in the family of polyoxo(azide)octadecavanadate(IV/V) clusters: Synthesis, structure and antitumoural properties of $[V^{IV}_{11}V^{V}_7O_{44}(N_3)]^{10-}$ in a sodium containing-3D architecture. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 69, p. 85-88, 2016.
78. FAUTCH, J. M.; WILKER, J. J. Solution speciation, kinetics, and observing reaction intermediates in the alkylation of oxidovanadium compounds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 4791-4801, 2010.
79. FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 104-120, 2012.
80. DEPHAMPHILIS, M. L. **DNA Replication and Human Disease**. Cold Spring Harbor, 2006.
81. SEDGWICK, B.; LINDAHL, T. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 8886-94, 2002.
82. EKER, A. P. M.; QUAYLE, C.; CHAVES, I.; VAN DER HORST, G. T. J. DNA Repair in Mammalian Cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 968-980, 2009.
83. ELLER, M. S.; ASARCH, A.; GILCHREST, B. A. Photoprotection in human skin—A multifaceted sos response. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 2, p. 339-349, 2008.
84. JANION, C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 6, p. 338-44, 2008.
85. BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n. 1, p. 11-30, 1990.
86. FALNES, P. Ø.; KLUNGLAND, A.; ALSETH, I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. **Neuroscience**, v. 145, n. 4, p. 1222-1232, 2007.

87. YOU, C.; WANG, Y. Mass spectrometry-based quantitative strategies for assessing the biological consequences and repair of DNA adducts. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 2, p. 205-213, 2016.
88. KLEIBL, K. Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O₆-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 512, n. 1, p. 67-84, 2002.
89. LIAO, X.; LU, J.; YING, P.; ZHAO, P.; BAI, Y.; LI, W.; LIU, M. DNA binding, antitumor activities, and hydroxyl radical scavenging properties of novel oxovanadium(IV) complexes with substituted isoniazid. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 975-984, 2013.
90. SAMANTA, S.; CHATTERJEE, M.; GHOSH, B.; RAJKUMAR, M.; RANA, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium and 1, 25 (OH)₂ vitamin D₃ combination in inhibitions of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 10, p. 1106-14, 2008.
91. HAMILTON, E. E.; FANWICK, P. E.; WILKER, J. J. Alkylation of Inorganic Oxo Compounds and Insights on Preventing DNA Damage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 10, p. 3388-3395, 2006.
92. HAMILTON, E. E.; WILKER, J. J. Inorganic Oxo Compounds React with Alkylating Agents: Implications for DNA Damage. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 25, p. 3290-3292, 2004.
93. HAMILTON, E. E.; WILKER, J. J. Inhibition of DNA alkylation damage with inorganic salts. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 894-902, 2004.
94. WHO. Global tuberculosis report. 2018.
95. LIVIA, V.; CIARAN, S.; MALACHY, M.; MICHAEL, D. Tuberculosis: an inorganic medicinal chemistry perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 2199-2224, 2015.
96. MAHAJAN, A.; KREMER, L.; LOUW, S.; GUÉRADEL, Y.; CHIBALE, K.; BIOT, C. Synthesis and *in vitro* antitubercular activity of ferrocene-based hydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 2866-2868, 2011.
97. CORREIA, I.; ADÃO, P.; ROY, S.; WAHBA, M.; MATOS, C.; MAURYA, M. R.; MARQUES, F.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; AVECILLA, F.; COSTA PESSOA, J. Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 141, p. 83-93, 2014.
98. GAJERA, S. B.; MEHTA, J. V.; PATEL, M. N. DNA interaction, cytotoxicity, antibacterial and antituberculosis activity of oxovanadium(IV) complexes derived from fluoroquinolones and 4-hydroxy-5-((4-hydroxyphenyl)diazonyl)thiazole-2(3H)-thione. **RSC Advances**, v. 5, n. 28, p. 21710-21719, 2015.

99. CHEN, S.; WU, G.; LONG, D.; LIU, Y. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan–Ca₃V₁₀O₂₈ complex membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 92-97, 2006.
100. FUKUDA, N.; YAMASE, T. **In Vitro Antibacterial Activity of Vanadate and Vanadyl Compounds against Streptococcus pneumoniae**. p. 927-30, 1997.
101. SHAHID, M.; SHARMA, P. K.; ANJULI; CHIBBER, S.; SIDDIQI, Z. A. Isolation of a Decavanadate Cluster [H₂V₁₀O₂₈][4-picH]₄·2H₂O (4-pic = 4-picoline): Crystal Structure, Electrochemical Characterization, Genotoxic and Antimicrobial Studies. **Journal of Cluster Science**, v. 25, n. 5, p. 1435-1447, 2014.
102. TURNER, T. L.; NGUYEN, V. H.; MCLAUCHLAN, C. C.; DYMON, Z.; DORSEY, B. M.; HOOKER, J. D.; JONES, M. A. Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 108, p. 96-104, 2012.
103. DORSEY, B. M.; MCLAUCHLAN, C. C.; JONES, M. A. Evidence that speciation of oxovanadium complexes does not solely account for inhibition of leishmania acid phosphatases. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 109, 2018.
104. MISSINA, J. M.; GAVINHO, B.; POSTAL, K.; SANTANA, F. S.; VALDAMERI, G.; DE SOUZA, E. M.; HUGHES, D. L.; RAMIREZ, M. I.; SOARES, J. F.; NUNES, G. G. Effects of decavanadate salts with organic and inorganic cations on *Escherichia coli*, *Giardia intestinalis*, and Vero cells. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 11930-11941, 2018.
105. SMART, N.; ARHOUMA, Z.; KUMAR, S.; MURAKAMI, H. A.; CRICK, D. C.; CRANS, D. C. Decavanadate inhibits mycobacterial growth more potently than other oxovanadates. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 519, 2018.
106. KOSTENKOVA, K.; ARHOUMA, Z.; POSTAL, K.; RAJAN, A.; KORTZ, U.; NUNES, G. G.; CRICK, D. C.; CRANS, D. C. Pt^{IV}- or Mo^{VI}-substituted decavanadates inhibit the growth of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 111356, 2021.
107. SMART, N.; SAEGER, J.; HALLER, K. J.; AURELIANO, M.; CRANS, D. C. Interaction of decavanadate with interfaces and biological model membrane systems: characterization of soft oxometalate systems. **Journal of Molecular and Engineering Materials**, v. 02, n. 01, p. 1440007, 2014.
108. CRANS, D. C.; BARUAH, B.; ROSS, A.; LEVINGER, N. E. Impact of confinement and interfaces on coordination chemistry: using oxovanadate reactions and proton transfer reactions as probes in reverse micelles. **Coordination Chemical Review**, v. 253, n. 17-18, p. 2178-2185, 2009.
109. SANCHEZ-LOMBARDO, I.; BARUAH, B.; ALVAREZ, S.; WERST, K. R.; SEGALINE, N. A.; LEVINGER, N. E.; CRANS, D. C. Size and shape trump

charge in interactions of oxovanadates with self-assembled interfaces: application of continuous shape measure analysis to the decavanadate anion. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 962-975, 2016.

110. BARUAH, B.; RODEN, J. M.; SEDGWICK, M. A.; CORREA, N. M.; CRANS, D. C.; LEVINGER, N. E. When is water not water? Exploring water confined in large reverse micelles using a highly charged inorganic molecular probe. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 12758-12765, 2006.
111. STOVER, J.; RITHNER, C. D.; INAFUKU, R. A.; CRANS, D. C.; LEVINGER, N. E. Interaction of dipicolinatodioxovanadium(V) with polyatomic cations and surfaces in reverse micelles. **Langmuir**, v. 21, n. 14, p. 6250-6258, 2005.
112. CRANS, D. C.; SCHOEBERL, S.; GAIDAMAUSKAS, E.; BARUAH, B.; ROESS, D. A. Antidiabetic vanadium compound and membrane interfaces: interface-facilitated metal complex hydrolysis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 961-972, 2011.
113. CHATKON, A.; CHATTERJEE, P. B.; SEDGWICK, M. A.; HALLER, K. J.; CRANS, D. C. Counterion affects interaction with interfaces: the antidiabetic drugs metformin and decavanadate. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 10-11, p. 1859-1868, 2013.
114. CRANS, D. C.; PETERS, B. J.; WU, X.; MCLAUCHLAN, C. C. Does anion-cation organization in Na⁺-containing X-ray crystal structures relate to solution interactions in inhomogeneous nanoscale environments: Sodium-decavanadate in solid state materials, minerals, and microemulsions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 344, p. 115-130, 2017.
115. SEDGWICK, M. A.; CRANS, D. C.; LEVINGER, N. E. What is inside a nonionic reverse micelle? Probing the interior of Igepal reverse micelles using decavanadate. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5496-503, 2009.
116. RAMOS, S.; MOURA, J. J. G.; AURELIANO, M. Actin as a potential target for decavanadate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 12, p. 1234-1239, 2010.
117. AURELIANO, M.; CRANS, D. C. Decavanadate and oxovanadates: Oxometalates with many biological activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 536-546, 2009.
118. AURELIANO, M.; OHLIN, C. A. Decavanadate *in vitro* and *in vivo* effects: facts and opinions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 137, p. 123-130, 2014.
119. MCLAUCHLAN, C. C.; MURAKAMI, H. A.; WALLACE, C. A.; CRANS, D. C. Coordination environment changes of the vanadium in vanadium-dependent haloperoxidase enzymes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 186, p. 267-279, 2018.

120. ALTHUMAIRY, D.; MURAKAMI, H. A.; ZHANG, D.; BARISAS, B. G.; ROESS, D. A.; CRANS, D. C. Effects of vanadium(IV) compounds on plasma membrane lipids leads to G protein-coupled receptor signal transduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 110873, 2019.
121. ROESS, D. A.; SMITH, S. M. L.; HOLDER, A. A.; BARUAH, B.; TRUJILLO, A. M.; GILSDORF, D.; STAHLA, M. L.; CRANS, D. C. Do vanadium compounds drive reorganization of the plasma membrane and activation of insulin receptors with lipid rafts? Em: **Vanadium: The Versatile Metal**: American Chemical Society, v.974, 2007. cap. 10, p.121-134. (ACS Symposium Series).
122. HU, G.-M.; MAI, T.-L.; CHEN, C.-M. Visualizing the GPCR network: Classification and evolution. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15495, 2017.
123. ASCOLI, M.; FANELLI, F.; SEGALOFF, D. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 2, p. 141-174, 2002.
124. WANG, D. X.; KUNG, H. H.; BARTEAU, M. A. Identification of vanadium species involved in sequential redox operation of VPO catalysts. **Applied Catalysis a-General**, v. 201, n. 2, p. 203-213, 2000.
125. STOLL, S.; SCHWEIGER, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 178, n. 1, p. 42-55, 2006.
126. CRANS, D. C.; WILLGING, E. M.; BUTLER, S. R. Vanadate tetramer as the inhibiting species in enzyme reactions *in vitro* and *in vivo*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 1, p. 427-432, 1990.
127. FARRUGIA, L. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.
128. SHELDRICK, G. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, n. 1, p. 112-122, 2008.
129. TEWELDEMEDHIN, Z. S.; FULLER, R. L.; GREENBLATT, M. Magnetic susceptibility measurements of solid manganese compounds with Evan's balance. **Journal of Chemical Education**, v. 73, n. 9, p. 906, 1996.
130. WOOLCOCK, J.; ZAFAR, A. Microscale techniques for determination of magnetic susceptibility. **Journal of Chemical Education**, v. 69, n. 6, p. A176, 1992.
131. KAHN, O. **Molecular Magnetism**. Wiley, 1993.
132. SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.
133. SINGH, A. K.; REYRAT, J.-M. Laboratory maintenance of *Mycobacterium smegmatis*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 10C.1.1-10C.1.12, 2009.

134. ALTHUMAIRY, D.; MURAKAMI, H. A.; ZHANG, D.; BARISAS, G.; ROESS, D.; CRANS, D. Effects of vanadium(IV) compounds on plasma membrane lipids lead to G protein-coupled receptor signal transduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p. 110873, 2019.
135. YERRA, S.; TRIPURAMALLU, B. K.; DAS, S. K. Decavanadate-based discrete compound and coordination polymer: synthesis, crystal structures, spectroscopy and nano-materials. **Polyhedron**, v. 81, p. 147-153, 2014.
136. CHEN, J.; LI, Y.; ZHANG, K.; WANG, H. Whole-genome sequence of phage-resistant strain *Escherichia coli* DH5 α . **Genome Announcements**, v. 6, n. 10, p. e00097-18, 2018.
137. ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.
138. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
139. PISTON, D. W.; RIZZO, M. A. FRET by fluorescence polarization microscopy. Em: SULLIVAN, K. F. (Ed.). **Fluorescent Proteins, Second Edition**, v.85, 2008. p.415-430. (Methods in Cell Biology).
140. YEOW, E. K. L.; CLAYTON, A. H. A. Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: theory and application. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 9, p. 3098-3104, 2007.
141. DIPILATO, L. M.; ZHANG, J. The role of membrane microdomains in shaping β 2-adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. **Molecular BioSystems**, v. 5, n. 8, p. 832-837, 2009.
142. ZHOU, Y.-Y.; YAO, S.; YAN, J.-H.; CHEN, L.; WANG, T.-T.; WANG, C.-J.; ZHANG, Z.-M. Design and synthesis of purely inorganic 3D frameworks composed of reduced vanadium clusters and manganese linkers. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 47, p. 20435-20440, 2015.
143. WUTKOWSKI, A.; NIEFIND, F.; NÄTHER, C.; BENSCH, W. A new mixed-valent high nuclearity polyoxovanadate cluster based on the $\{V_{18}O_{42}\}$ archetype. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 637, n. 14-15, p. 2198-2204, 2011.
144. LI, S.; LI, Z.; ZHANG, J.; SU, Z.; QI, S.; GUO, S.; TAN, X. Polyoxometalate-based 3D porous framework with inorganic molecular nanocage units. **Journal of Chemical Sciences**, v. 129, n. 5, p. 573-578, 2017.
145. ADDISON, A. W.; RAO, T. N.; REEDIJK, J.; VAN RIJN, J.; VERSCHOOR, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-

- dithiaheptane]copper(II) perchlorate. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 7, p. 1349-1356, 1984.
146. YANG, W.; LU, C.; ZHANG, Q.; CHEN, S.; ZHAN, X.; LIU, J. Structure and properties of a novel 3D straight-channel polyoxovanadate and an unexpected trimeric barbiturate obtained by hydrothermal reactions. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 22, p. 7309-7314, 2003.
 147. MONAKHOV, K. Y.; BENSCH, W.; KÖGERLER, P. Semimetal-functionalised polyoxovanadates. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 23, p. 8443-8483, 2015.
 148. VOIT, E. I.; DAVYDOV, V. A.; MASHKOVSKII, A. A.; VOIT, A. V. Investigation of oxofluorotitanates $(\text{NH}_4)_3\text{TiOF}_5$ and $\text{Rb}_2\text{KTiOF}_5$ by vibrational spectroscopy and quantum-chemical methods. **Journal of Structural Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 13-20, 2008.
 149. DONG, B.; PENG, J.; CHEN, Y.; KONG, Y.; TIAN, A.; LIU, H.; SHA, J. pH-controlled assembly of two polyoxovanadates based on $[\text{V}_{16}\text{O}_{38}(\text{Cl})]^{8-}$ and $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]^{6-}$ building blocks. **Journal of Molecular Structure**, v. 788, n. 1-3, p. 200-205, 2006.
 150. YI, Z.; YU, X.; XIA, W.; ZHAO, L.; YANG, C.; CHEN, Q.; WANG, X.; XU, X.; ZHANG, X. Influence of the steric hindrance of organic amines on the supramolecular network based on polyoxovanadates. **CrystEngComm**, v. 12, n. 1, p. 242-249, 2010.
 151. BROWN, I. D.; WU, K. K. Empirical parameters for calculating cation-oxygen bond valences. **Acta Crystallographica Section B**, v. 32, n. 7, p. 1957-1959, 1976.
 152. YAMASE, T.; SUZUKI, M.; OHTAKA, K. Structures of photochemically prepared mixed-valence polyoxovanadate clusters: oblong $[\text{V}_{18}\text{O}_{44}(\text{N}_3)]^{14-}$, superkeggin $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}(\text{PO}_4)]^{11-}$ and doughnut-shaped $[\text{V}_{12}\text{B}_{32}\text{O}_{84}\text{Na}_4]^{15-}$ anions. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 14, p. 2463-2472, 1997.
 153. ZHANG, Z.; GUO, J.; FU, J.; ZHENG, L.; ZHU, D.; XU, Y.; SONG, Y. Hydrothermal syntheses and crystal structures of two new vanadium phosphates. **Journal of Cluster Science**, v. 23, n. 2, p. 177-187, 2012.
 154. DAY, P. Mixed-valence compounds. **Recherche**, v. 12, n. 120, p. 304-311, 1981.
 155. DAY, P.; HUSH, N. S.; CLARK, R. J. H. Mixed valence: origins and developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 366, n. 1862, p. 5-14, 2008.
 156. ROCHA, R. C.; TOMA, H. E. Transferência de elétrons em sistemas inorgânicos de valência mista. **Química Nova**, v. 25, p. 624-638, 2002.
 157. KEENE, T. D.; D'ALESSANDRO, D. M.; KRÄMER, K. W.; PRICE, J. R.; PRICE, D. J.; DECURTINS, S.; KEPERT, C. J. $[\text{V}_{16}\text{O}_{38}(\text{CN})]^{9-}$: a soluble

- mixed-valence redox-active building block with strong antiferromagnetic coupling. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 9192-9199, 2012.
158. BENCINI, A.; GATTESCHI, D. **EPR of Exchange Coupled Systems**. Dover Publications, 2012.
 159. DANIEL, C.; HARTL, H. A mixed-valence V^{IV}/V^V alkoxo-polyoxovanadium cluster series [V₆O₈(OCH₃)₁₁]^{n+/-}: exploring the influence of a μ-oxo ligand in a spin frustrated structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 14, p. 5101-5114, 2009.
 160. OKAYA, K.; KOBAYASHI, T.; KOYAMA, Y.; HAYASHI, Y.; ISOBE, K. Formation of V^V lacunary polyoxovanadates and interconversion reactions of dodecavanadate species. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, n. 34, p. 5156-5163, 2009.
 161. MARQUES-DA-SILVA, D.; FRAQUEZA, G.; LAGOA, R.; VANNATHAN, A. A.; MAL, S. S.; AURELIANO, M. Polyoxovanadate inhibition of *Escherichia coli* growth shows a reverse correlation with Ca²⁺-ATPase inhibition. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 45, p. 17577-17587, 2019.
 162. ALTHUMAIRY, D.; POSTAL, K.; BARISAS, B. G.; NUNES, G. G.; ROESS, D. A.; CRANS, D. C. Polyoxometalates function as indirect activators of a G protein-coupled receptor. **Metallomics**, v. 12, p. 1044-1061, 2020.
 163. LITTLER, J. S.; WATERS, W. A. 552. Oxidations of organic compounds with quinquevalent vanadium. Part V. A comparative study of the oxidation of alcohols and glycols by cerium(IV), vanadium(V), and chromium(VI). **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 2767-2772, 1960.
 164. HANSON, S. K.; BAKER, R. T.; GORDON, J. C.; SCOTT, B. L.; SILKS, L. A. P.; THORN, D. L. Mechanism of alcohol oxidation by dipicolinate vanadium(v): unexpected role of pyridine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 50, p. 17804-17816, 2010.
 165. CAMPBELL, M. L.; SULEJMANOVIC, D.; SCHILLER, J. B.; TURNER, E. M.; HWU, S.-J.; WHITEHEAD, D. C. Alcohol oxidations using reduced polyoxovanadates. **Helvetica Chimica Acta**, v. 100, n. 3, p. 1600338, 2017.
 166. MULKAPURI, S.; KURAPATI, S. K.; DAS, S. K. Carbonate encapsulation from dissolved atmospheric CO₂ into a polyoxovanadate capsule. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 24, p. 8773-8781, 2019.
 167. KHAN, M. I.; YOHANNES, E.; DOEDENS, R. J. [M₃V₁₈O₄₂(H₂O)₁₂(XO₄)]·24H₂O (M=Fe, Co; X=V, S): metal oxide based framework materials composed of polyoxovanadate clusters. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 9, p. 1292-1294, 1999.
 168. WHO. Tuberculosis country profiles - Brazil. 2018.
 169. DA S. MAIA, P. I.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; LEMOS, S. S.; DE SOUSA, G. F.; BATISTA, A. A.; NASCIMENTO, O. R.; ELLENA, J.;

- CASTELLANO, E. E.; NIQUET, E.; DEFLON, V. M. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Polyhedron**, v. 28, n. 2, p. 398-406, 2009.
170. ALTAF, M.; MILLER, C. H.; BELLOWS, D. S.; O'TOOLE, R. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. **Tuberculosis**, v. 90, n. 6, p. 333-337, 2010.
171. LOPES, L. G. F.; CARVALHO, E. M.; SOUSA, E. H. S. A bioinorganic chemistry perspective on the roles of metals as drugs and targets against *Mycobacterium tuberculosis* – a journey of opportunities. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 45, p. 15988-16003, 2020.
172. WILLIAMS, M.; MIZRAHI, V.; KANA, B. D. Molybdenum cofactor: a key component of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? **Crit Rev Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 18-29, 2014.
173. MCLAUCHLAN, C. C.; PETERS, B. J.; WILLSKY, G. R.; CRANS, D. C. Vanadium–phosphatase complexes: phosphatase inhibitors favor the trigonal bipyramidal transition state geometries. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 163-199, 2015.
174. COSTA PESSOA, J.; GARRIBBA, E.; SANTOS, M. F. A.; SANTOS-SILVA, T. Vanadium and proteins: uptake, transport, structure, activity and function. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301-302, p. 49-86, 2015.
175. BIJELIC, A.; ROMPEL, A. Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. **ChemTexts**, v. 4, n. 3, p. 10, 2018.
176. AL-QATATI, A.; FONTES, F. L.; BARISAS, B. G.; ZHANG, D.; ROESS, D. A.; CRANS, D. C. Raft localization of Type I Fcε receptor and degranulation of RBL-2H3 cells exposed to decavanadate, a structural model for V₂O₅. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 33, p. 11912-11920, 2013.
177. AL-QATATI, A.; WINTER, P.; WOLF-RINGWALL, A.; CHATTERJEE, P.; VAN ORDEN, A.; CRANS, D. C.; ROESS, D. A.; BARISAS, B. G. Insulin receptors and downstream substrates associate with membrane microdomains after treatment with insulin or chromium(III) picolinate. **Cell Biochemistry and Biophysics**, p. 1-10, 2012.
178. WINTER, P. W.; AL-QATATI, A.; WOLF-RINGWALL, A. L.; SCHOEBERL, S.; CHATTERJEE, P. B.; BARISAS, B. G.; ROESS, D. A.; CRANS, D. C. The anti-diabetic bis(maltolato)oxovanadium(IV) decreases lipid order while increasing insulin receptor localization in membrane microdomains. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 21, p. 6419-6430, 2012.
179. BIJELIC, A.; AURELIANO, M.; ROMPEL, A. The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. **Chemical Communications**, v. 54, n. 10, p. 1153-1169, 2018.

180. POPE, M. T.; MÜLLER, A. Polyoxometalate chemistry: an old field with new dimensions in several disciplines. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 30, n. 1, p. 34-48, 1991.
181. HASENKNOPF, B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 275, p. 10.2741, 2005.
182. ROESS, D. A.; SMITH, S. M. L.; WINTER, P.; ZHOU, J.; DOU, P.; BARUAH, B.; TRUJILLO, A. M.; LEVINGER, N. E.; YANG, X.; BARISAS, B. G.; CRANS, D. C. Effects of vanadium-containing compounds on membrane lipids and on microdomains used in receptor-mediated signaling. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 8, p. 1558-1570, 2008.
183. AL-QATATI, A.; FONTES, F.; BARISAS, G.; ZHANG, D.; ROESS, D.; CRANS, D. Raft localization of Type I Fcε receptor and degranulation of RBL-2H3 cells exposed to decavanadate, a structural model for V₂O₅. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 42, 2013.
184. SILVA-NOLASCO, A. M.; CAMACHO, L.; SAAVEDRA-DÍAZ, R. O.; HERNÁNDEZ-ABREU, O.; LEÓN, I. E.; SÁNCHEZ-LOMBARDO, I. Kinetic studies of sodium and metforminium decavanadates decomposition and in vitro cytotoxicity and insulin- like activity. **Inorganics**, v. 8, n. 12, p. 67, 2020.
185. LI, Y.-T.; ZHU, C.-Y.; WU, Z.-Y.; JIANG, M.; YAN, C.-W. Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds. **Transition Metal Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 597-603, 2010.
186. CRANS, D. C. Antidiabetic, Chemical, and Physical Properties of Organic Vanadates as Presumed Transition-State Inhibitors for Phosphatases. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 11899-11915, 2015.
187. CRANS, D. C.; RITHNER, C. D.; BARUAH, B.; GOURLEY, B. L.; LEVINGER, N. E. Molecular probe location in reverse micelles determined by NMR dipolar interactions. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, n. 13, p. 4437-4445, 2006.
188. SAMART, N.; SAEGER, J.; HALLER, K. J.; AURELIANO, M.; CRANS, D. C. Interaction of decavanadate with interfaces and biological model membrane systems: characterization of soft oxometalate systems. **Journal of Molecular and Engineering Materials**, v. 2, n. 01, p. 1440007, 2014.
189. ALTHUMAIRY, D.; ROESS, D. A.; BARISAS, B. G. Effects of luteinizing hormone receptor expression level on receptor aggregation and function. **Biophysical Journal**, v. 118, n. 3, p. 95a, 2020.
190. WILLISKY, G. R.; WHITE, D. A.; MCCABE, B. C. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 21, p. 13273-13281, 1984.

191. HOU, D.; HAGEN, K. S.; HILL, C. L. Pentadecavanadate, $V_{15}O_{42}^{9-}$, a new highly condensed fully oxidized isopolyvanadate with kinetic stability in water. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, n. 4, p. 426-428, 1993.
192. PECK, T.; HILL, S.; WILLIAMS, M. Drug passage across the cell membrane. **Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care, 2nd edn. London: Greenwich Medical Media**, p. 3-10, 2003.
193. LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855, 2004.
194. LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, L.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
195. GRUNDNER, C.; NG, H.-L.; ALBER, T. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. **Structure**, v. 13, n. 11, p. 1625-1634, 2005.
196. ZHOU, B.; HE, Y.; ZHANG, X.; XU, J.; LUO, Y.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; YANG, Z.; CHAN, R. J.; LIU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, Z.-Y. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4573-4578, 2010.
197. DUTTA, N. K.; HE, R.; PINN, M. L.; HE, Y.; BURROWS, F.; ZHANG, Z.-Y.; KARAKOUSIS, P. C. Mycobacterial protein tyrosine phosphatases a and b inhibitors augment the bactericidal activity of the standard anti-tuberculosis regimen. **ACS infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 231-239, 2016.

APÊNDICE 1

Descrição completa da metodologia utilizada para a avaliação do efeito dos POVs na camada lipídica de células CHO

Os estudos com membranas de células CHO foram realizados em parceria com o grupo da professora Deborah Roess da CSU, pela doutoranda Duaa Althumairy, onde foram feitos os estudos biológicos incluindo:

(v) Análise da viabilidade celular dos POVs

As soluções-estoque de 10 mmol L^{-1} dos produtos **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** foram preparadas no momento do experimento dissolvendo os compostos em água e adicionando em seguida tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) de pH 7,3, contendo $1,0$ e $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de CaCl_2 e MgCl_2 , respectivamente.

Visando verificar o efeito dos polioxovanadatos no crescimento de culturas de células CHO e selecionar as concentrações apropriadas desses compostos para estudos posteriores. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados utilizando fluorimetria à base de resazurina, o qual conta o número de células viáveis em um volume fixo de células. Para isso, foram utilizadas diluições seriais do **V₁** e dos POVs **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** em meio DMEM.

As células foram semeadas em placas de 96-poços, aproximadamente 20000 células/poço, em $100 \mu\text{L}$ de meio livre de soro e tempo de adesão de 3 h. As concentrações dos compostos utilizadas para tratar as células foram de $1,0$, $5,0$, 10 , 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ com 10% de resazurina por 3 h para obter um controle do número de células, designado como medida inicial ($t = 0 \text{ h}$).

Uma população separada de células foi tratada de forma similar com cada composto por 12 h antes da adição dos 10% de resazurina, em seguida, foram aguardadas 3 h adicionais e a medida foi feita em $t = 15 \text{ h}$. Após a incubação com a resazurina foi realizada a medida de fluorescência para determinar o número de células em cada condição e para estabelecer um controle da taxa do crescimento celular. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 530 nm , com a medida de emissão em 590 nm . O número de células foi expresso

como uma razão dos valores no tempo obtidos em 15 h e 0 h e apresentados em porcentagem.

A IC_{50} (concentração em que apenas 50% das células permanece viável) foi calculada por uma adequação da curva ao log dos resultados obtidos para cada composto. Os resultados são mostrados como uma média dos experimentos realizados em triplicata usando regressão não linear com três parâmetros. Os gráficos foram preparados com auxílio do programa GraphPad Prism 8. A concentração dos compostos usadas nos experimentos subsequentes foi escolhida de forma a ser menor ou igual ao equivalente da IC_{75} de cada composto, como sendo 10, 2,0, 4,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**, respectivamente.

(vi) *Análise do efeito dos compostos na ordem da membrana lipídica*

Para os estudos utilizando de transferência de energia de ressonância de fluorescência homo (homo-FRET), realizada para obter os dados de agregação do LHR e nível de cAMP, diluições da solução estoque dos compostos foram feitas em médio livre de soro (500 mL de DMEM, 5,0 mL de solução 100× de amino ácido não essencial, 5,0 mL de penicilina/estreptomicina e 5,0 mL de L-glutamina) para obter uma concentração final do meio com os POVs de 10, 2,0, 4,0 e 6,0 $\mu\text{mmol L}^{-1}$ para **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅** respectivamente. Essas concentrações foram determinadas através de estudo de viabilidade celular nas células CHO.

Para avaliar o efeito dos POVs na ordem da membrana lipídica, células CHO não transfectadas, ou seja, que não passaram por processo de introdução de ácidos nucleicos, foram cultivadas até 80-90% de confluência da monocamada de células no frasco de cultura com 1,0 mL de tripsina-EDTA (0,25%) por 3 min. As células foram semeadas e após 12 h, foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com meio contendo tratamento com **V₁**, **V₁₀** ou **V₁₅**.

O controle foi imediatamente tratado com 200 μL da sonda di-4-ANEPPDHQ (estrutura representada na Figura 1) em concentração 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 15 min, lavado e imerso em PBS para leitura em um microscópio invertido

Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera Andor Du897E EMCCD.¹²⁰ Os demais frascos, com **V₁**, **V₁₀** ou **V₁₅** no meio, foram incubados por 10 h. Nos tempos indicados, os frascos foram removidos da incubadora, lavados uma vez com PBS e ressuspensos no meio livre de soro, com leituras feitas em 0, 1, 2, 6, e 24 h após a adição da sonda.

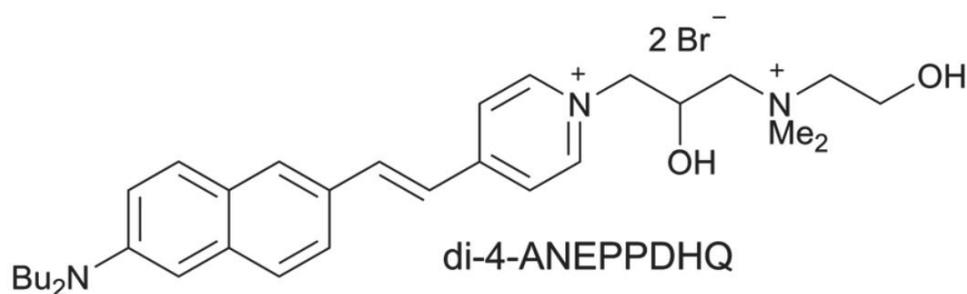


Figura 1 Representação da estrutura da sonda di-4-ANEPPDHQ, uma sonda fluorescente para detecção/visualização de microdomínios em membrana em células.

As amostras celulares foram iluminadas com uma lâmpada de arco com um filtro de excitação 480/30x ou 495/20x. A fluorescência de emissão foi coletada simultaneamente usando um filtro 535/40 nm (canal 1) e 620/40 nm (canal 2). O programa MetaFluor foi utilizado para analisar as imagens durante o experimento. A correção de fundo para cada imagem e a razão de intensidade de fluorescência de cálculo de 620/535 nm foram realizadas usando a Image J.

Em alguns experimentos da avaliação do efeito do **V₁** e **V₁₅** na ordem da membrana lipídica, células no tempo inicial e 6 h foram lavadas por duas vezes adicionais antes das medidas de ordem lipídica, visando avaliar o grau de associação do **V₁** e **V₁₅** a membrana celular.

(vii) *Análise do efeito dos compostos na agregação do LHR*

A extensão da agregação do LHR foi avaliada usando métodos homo-FRET e realizada conforme descrito anteriormente, usando linhagens celulares CHO expressando 10000, 32000, 122000 ou 560000 LHR por célula.¹²⁰ Esses LHR foram marcados em seu terminal-C intracelular com a ligação covalente de uma proteína fluorescente amarela (eYFP, do inglês *enhanced Yellow*

Fluorescent Protein, Figura 2) para fornecer um sinal de fluorescência indicado por hLHR-eYFP. O FRET entre hLHR-eYFP ocorre em uma intensidade significativa quando o doador eYFP e o aceitador eYFP ligados ao LHR, em seu domínio intracelular, estão dentro de 2 a 10 nm um do outro.¹³⁹

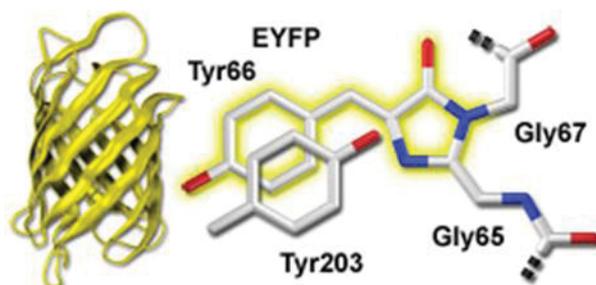


Figura 2 Representação da estrutura da variante da proteína fluorescente verde chamada proteína de fluorescente amarela (eYFP, do inglês *enhanced Yellow Fluorescent Protein*), utilizada para marcação de proteínas na medida de potencial de membrana e ativação de receptor.

Resumidamente, as células foram cultivadas até 80-90% de confluência em frascos de cultura e meio DMEM, incubadas com 1,0 mL de tripsina-EDTA (0,25%) por 3 min. As células, 500 μ L, foram colocadas em placas de Petri com fundo de vidro de 35 mm. Após 12 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS, solução salina (pH 7,3) e depois tratadas durante 10 h com 10, 2,0, 4,0 ou 6,0 μ mol L⁻¹ de **V**₁, **V**₁₀, **V**₁₄ e **V**₁₅, respectivamente. As células foram então lavadas uma vez para remover os compostos de vanádio, ressuspensas em meio livre de soro e analisadas usando métodos homo-FRET no tempo inicial (t = 0) e após 1, 2, 3, 6 e 24 h.

As imagens do homo-FRET foram coletadas usando um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 M com uma câmera Andor Du897E EMCCD e programa MetaMorph. A iluminação da lâmpada de arco passando por um filtro polarizado verticalmente forneceu excitação polarizada e aproximadamente 16 imagens foram adquiridas a uma taxa de uma imagem por minuto com um tempo de exposição de 15 s. Esta exposição tipicamente reduz a intensidade de coloração da eYFP covalentemente ligada ao terminal-C do LHR para aproximadamente 10% de sua intensidade de fluorescência inicial, processo chamado de branqueamento da eYFP.

Um divisor de imagem de visualização dupla da Princeton Instruments criou imagens lado a lado de fluorescência polarizada paralela ou perpendicular à polarização de excitação. Os fundos foram subtraídos das imagens de emissão de fluorescência e um fator g foi calculado para corrigir as diferenças de eficiência na óptica do instrumento, conforme descrito anteriormente por Yeow, E. K. L. *et al.*¹⁴⁰ O fator g constitui a correção específica do instrumento para diferentes sensibilidades de detecção para fluorescência polarizada verticalmente e horizontalmente.

Cerca de 5 a 7 células foram examinadas de cada placa e pelo menos 30 células foram examinadas para cada tratamento. A anisotropia intrínseca de um único fluoróforo eYFP é de 0,38.¹⁴⁰ Assumimos que o LHR monomérico marcado com eYFP exibiu esse valor e definimos como 0,38 a anisotropia aparente após o branqueamento completo. Os resultados do homo-FRET foram expressos como média das medidas realizadas. A avaliação estatística das diferenças médias nos grupos não tratados e tratados foi analisada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey e o teste t de Student para comparar entre dois grupos usando R versão 3.3.1. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

(viii) *Análise do efeito dos compostos nos níveis de cAMP intracelular*

Os ensaios de fluorescência de monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP) foram feitos usando um marcador do tipo ICUE (indicador de cAMP), expresso em células CHO pelo uso de um plasmídeo ICUE3 fornecido pelo Dr. Jin Zhang.¹⁴¹ O ICUE3 é um plasmídeo modificado a partir de um único domínio de ligação de nucleotídeo cíclico, sendo baseado na sonda Epac1(148–881), e fundido a uma proteína fluorescente ciano aprimorada (CFP, do inglês *enhanced ciano fluorescent protein*, Figura 3) e uma proteína fluorescente circularmente permutada (cpVenus, do inglês *circular-permutate Venus*).¹⁴¹

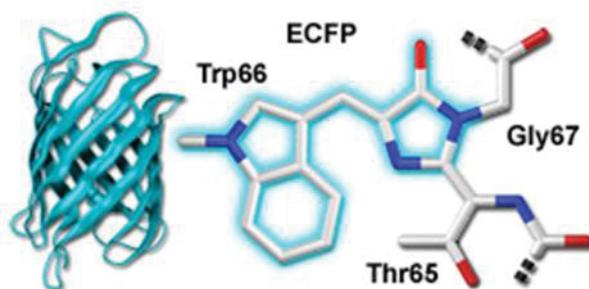


Figura 3 Representação da estrutura da variante da proteína fluorescente verde chamada proteína fluorescente ciano (CFP, do inglês *enhanced ciano fluorescent protein*), utilizada para marcação de proteínas na medida de potencial de membrana e ativação de receptor.

Na ausência de cAMP, a estrutura molecular da sonda é dobrada de forma que o CFP fica perto do cpVenus-eYFP, dando origem a uma transferência substancial de energia do CFP para eYFP e assim uma emissão do eYFP sensibilizado. Enquanto a ligação da cAMP leva a um desdobramento da sonda, reduzindo o FRET e causando um aumento na emissão do CFP e uma diminuição na emissão do eYFP sensibilizado.

Após a transfecção das células CHO, introdução intencional de ácido nucleicos heterólogos, com o plasmídeo ICUE3, as imagens foram adquiridas com uso de PBS para estabelecer os níveis basais de cAMP intracelular. Em seguida, o meio celular foi trocado por soluções contendo 100 nmol^{-1} hCG, 10, 2,0, 4,0 ou $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de **V₁**, **V₁₀**, **V₁₄** e **V₁₅**, respectivamente, por 15 min.

Antes e depois do tratamento das células, as imagens foram adquiridas usando uma objetiva de água 63x 1,2 NA em um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M com uma câmera Andor Du897E EMCCD, excitação de lâmpada de arco com filtro de excitação 436DF20, dois filtros de emissão 480DF40 para CFP e 535DF30 para eYFP e emissão eYFP sensibilizada (YFPSE, do inglês *yellow fluorescent protein sensitized emission*) devido à transferência de energia do CFP. Todos os filtros da Chroma Technology. As imagens foram adquiridas em intervalos de 60 segundos usando o programa MetaFluor. Após a subtração do fundo das imagens de fluorescência, os dados foram analisados usando o programa Image J para calcular as razões de intensidade de emissão CFP/YFPSE. Para cada placa, 2 a 5 células foram observadas e os dados foram coletados de pelo menos 15 células para cada tratamento.

APÊNDICE 2

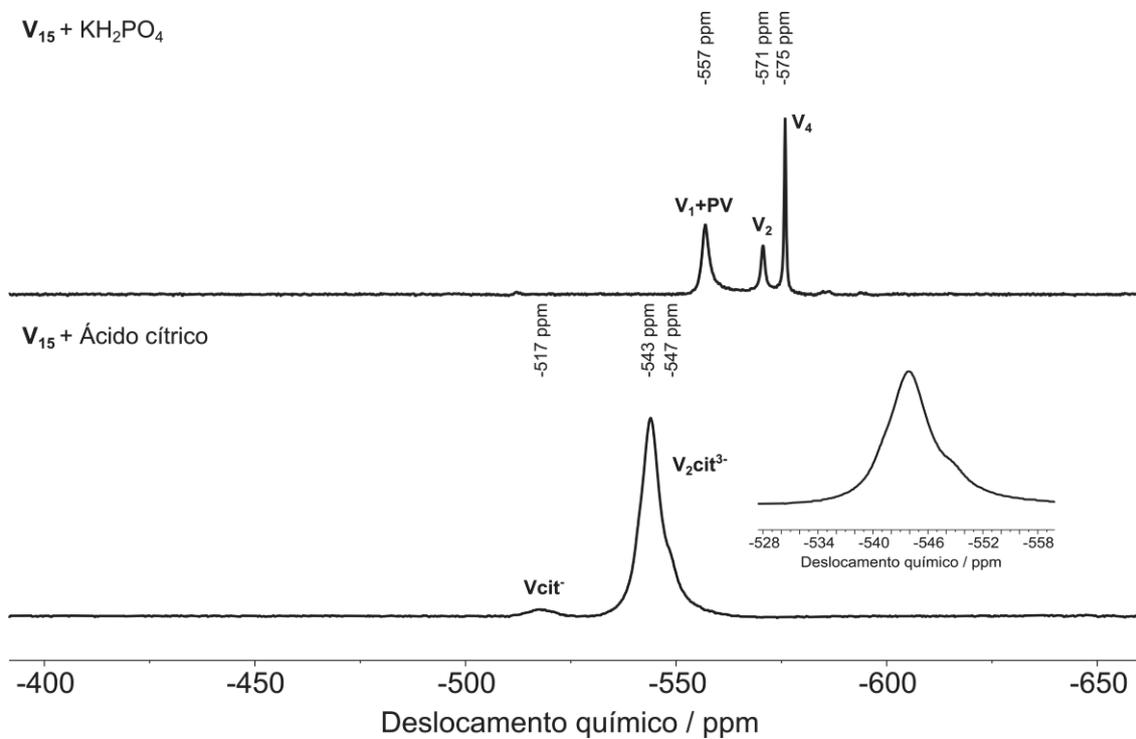


Figura 1 Espectro de RMN de ^{51}V de soluções aquosas de 1:2,5 de V_{15}/KH_2PO_4 (topo) e 1:2,5 de $V_{15}/\text{ácido cítrico}$ (baixo). Os espectros foram realizados 30 min após o preparo das soluções.

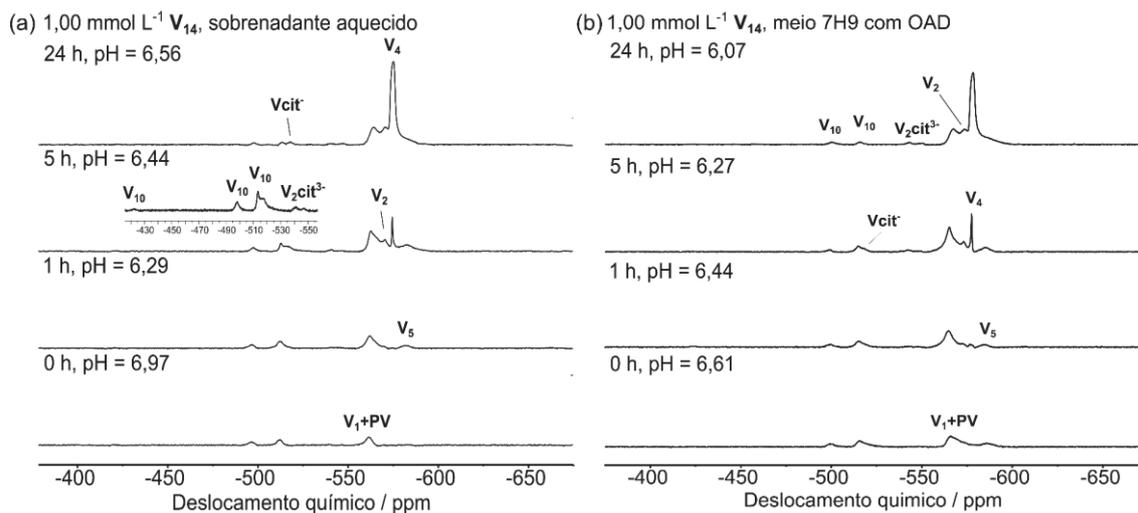


Figura 2 Espectros de RMN de ⁵¹V para V₁₄ em (a) sobrenadante aquecido e (b) meio 7H9 suplementado com OAD em 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos 0, 1, 5 e 24 h. As espécies de vanádio(V) observadas foram: V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₄ (V₄O₁₂⁴⁻), V₅ (V₅O₁₅⁵⁻), Vcit⁻, V₂cit³⁻, PV (HVPO₇³⁻), e V₁₀ (HV₁₀O₂₈⁵⁻).

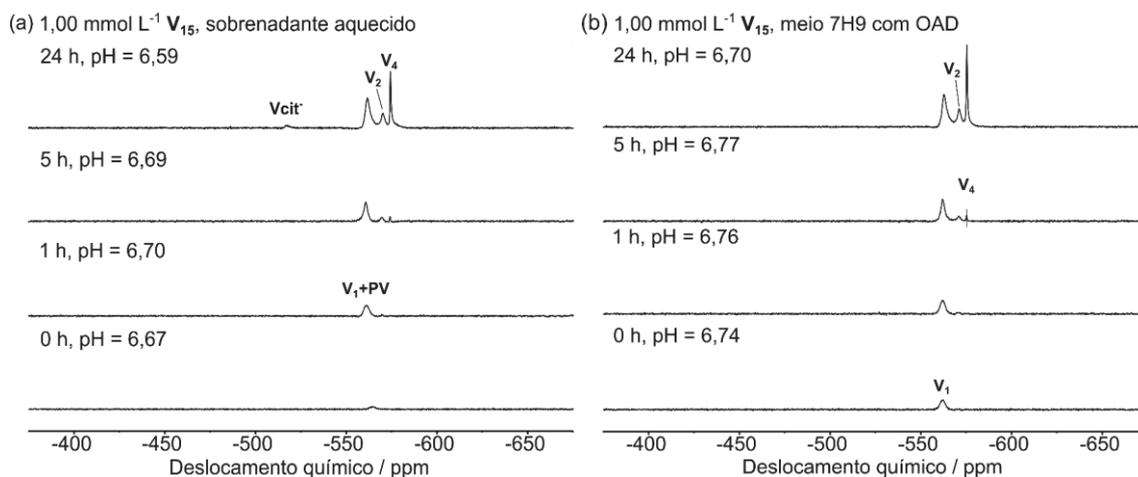


Figura 3 Espectros de RMN de ⁵¹V para V₁₅ em (a) sobrenadante aquecido e (b) meio 7H9 (pH = 6,6) suplementado com OAD em 1,0 mmol L⁻¹ nos tempos 0, 1, 5 e 24 h. As espécies de vanádio(V) observadas foram: V₁ (H₂VO₄⁻), V₂ (H₂V₂O₇²⁻), V₄ (V₄O₁₂⁴⁻), Vcit⁻, PV (HVPO₇³⁻).

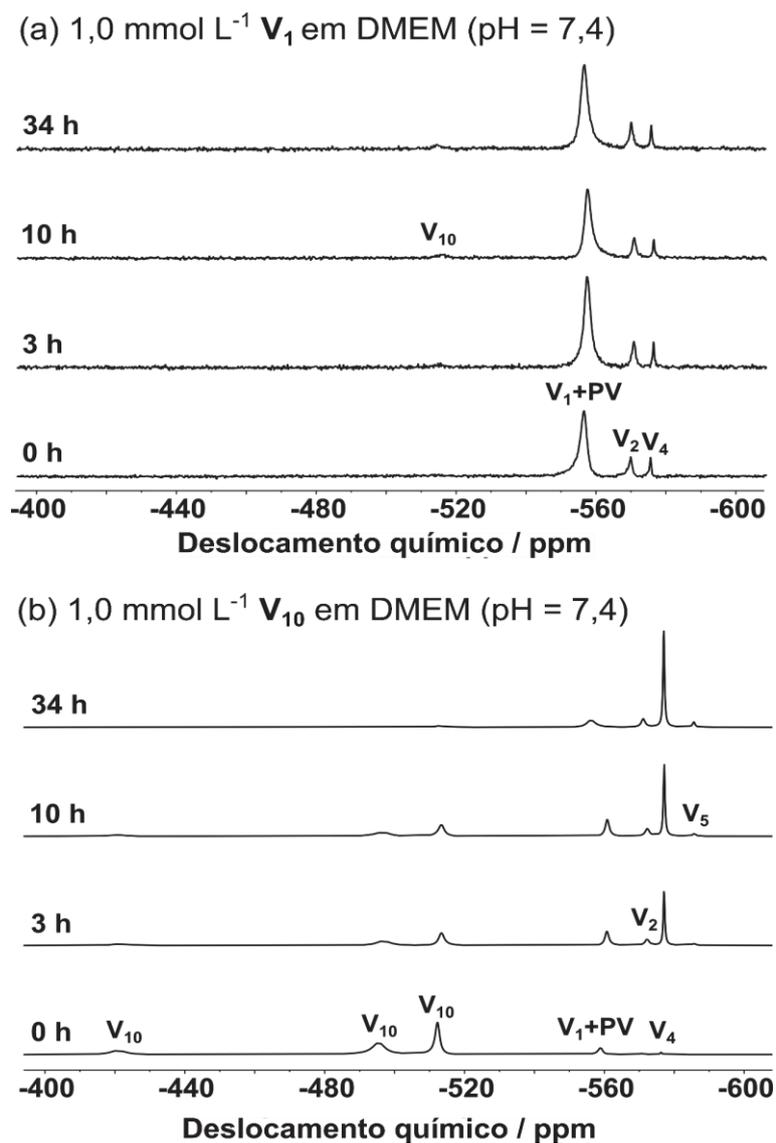


Figura 4 Espectros de RMN de ^{51}V para (a) V_1 e (b) V_{10} em um período de 0, 3, 6 e 24/34 h em meio de cultura DMEM (pH = 7,4) em concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As espécies de vanádio(V) observadas nos espectros foram: V_1 (H_2VO_4^-), V_2 ($\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$), V_4 ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), V_5 ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$), PV (HVPO_7^{3-}) e V_{10} ($\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$).

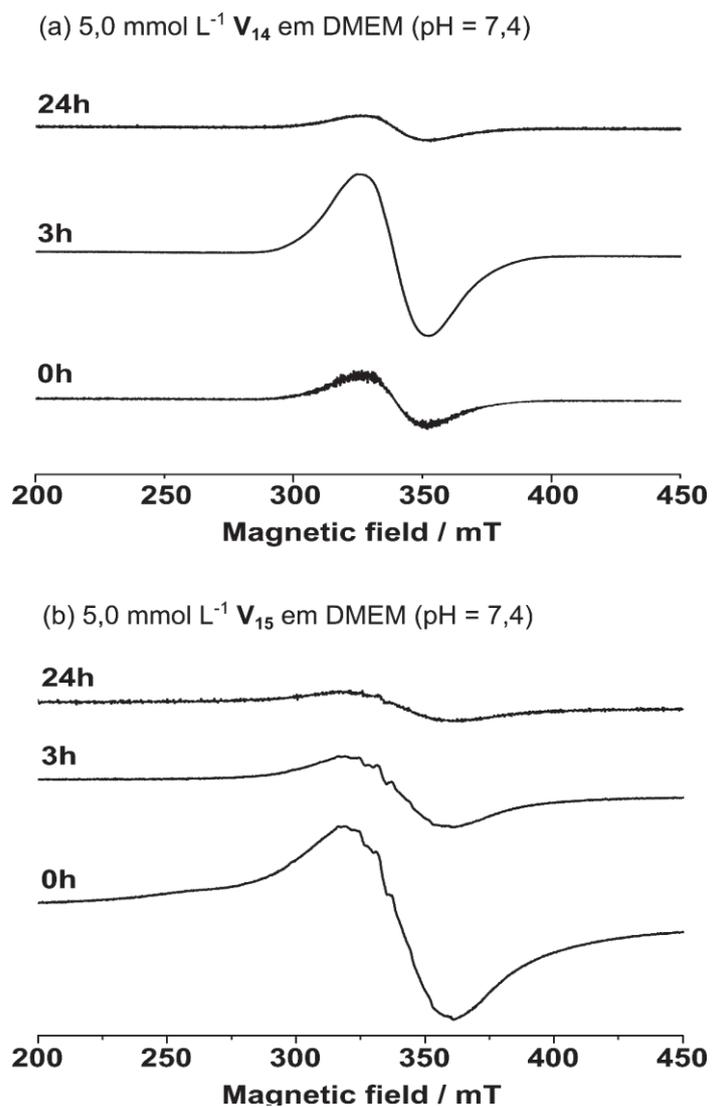


Figura 5 Espectro de RPE em banda-X obtidos em temperatura de 77 K para (a) \mathbf{V}_{14} e (b) \mathbf{V}_{15} em meio DMEM a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com variação no tempo de 0, 3 e 24 h.

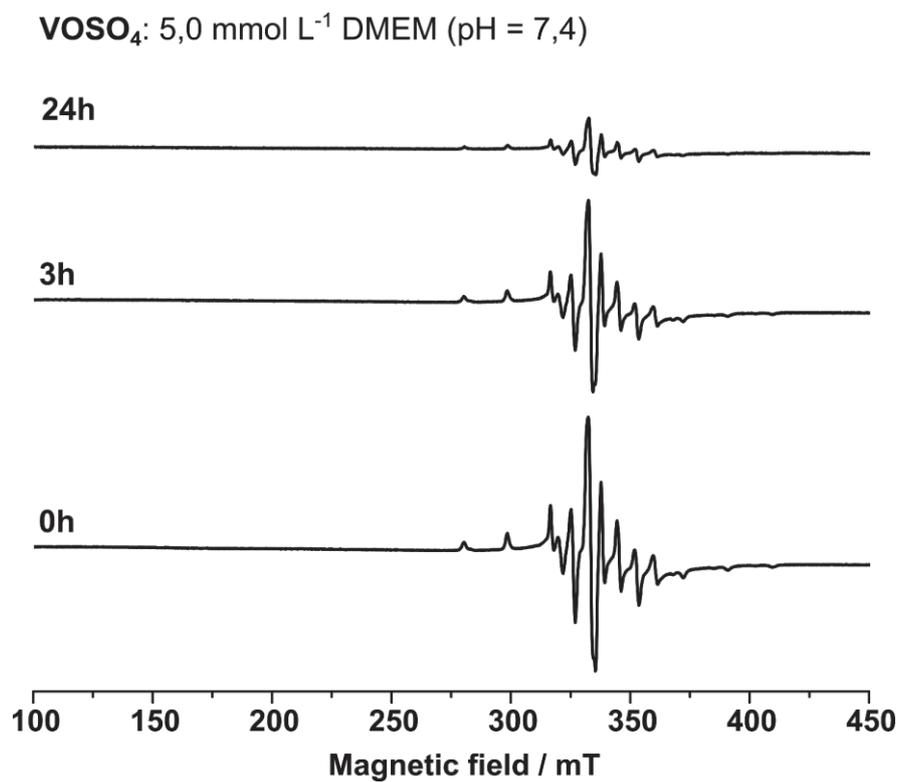


Figura 6 Espectro de RPE em banda-X obtidos em temperatura de 77 K para sulfato de vanadila (VOSO₄) em meio DMEM, pH = 7,4, a 5,0 mmol L⁻¹ com variação no tempo de 0, 3 e 24 h.

ANEXO 1

Dados cristalográficos obtidos para o refinamento parcial da estrutura do $V_{18}I$

Tabela 1 Dados cristalográficos e estruturais obtidos para o refinamento parcial da estrutura do $V_{18}I$

Fórmula	$V_{18}O_{42}I$
Sistema cristalino, grupo espacial	Cúbico, Fm-3m
Cor, forma do cristal	Verde-escuro, cubico
Temperatura / K	100(2)
$a = b = c / \text{Å}$	19.4906(8)
$\alpha = \beta = \gamma / ^\circ$	90
Volume / Å^3	7404,2(9)
Z, densidade calculada / mg/m^3	4; 1,550
F(000)	3260
Coeficiente de absorção / mm^{-1}	2,631
Comprimento de onda / Å	0,71073
Tamanho do cristal (mm)	0,352 x 0,085 x 0,046
No difratômetro:	
$\theta / ^\circ$	3,0 a 27,5
Índices limitantes	$-25 \leq h \leq 25$; $-25 \leq k \leq 25$; $-25 \leq l \leq 25$
Completude para $\theta = 25,2^\circ$	99,5%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
Max. e min. de transmissão	0,7456 e 0,6232
Reflexões coletadas / únicas	70276 / 481 [$R_{\text{int}} = 0,043$]
No. de reflexões 'observadas' [$I > 2\sigma(I)$]	436
Estrutura determinada por	Fase intrínseca, SHELXT
Refinamento:	Matriz integral mínimos quadrados, F^2
Dados / restrições / parâmetros	481 / 0 / 23
Qualidade de ajuste no F^2	3,921
Índice R final ('observados')	$R_1 = 0,218$, $wR_2 = 0,630$
Índice R final	$R_1 = 0,226$, $wR_2 = 0,654$
Coeficiente de extinção	n/a
Maior diferença pico-buraco / $e.\text{Å}^{-3}$	9,57 e -2,82
Localização da maior diferença de pico	n

Table 1 Atomic coordinates ($\times 10^5$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^4$). $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
I	0	50000	50000	320(20)
V(1)	0	69320(40)	50000	630(30)
V(2)	13270(20)	63270(20)	50000	580(30)
O(1)	-6730(50)	66450(100)	56730(50)	620(50)
O(2)	0	78000(200)	50000	710(80)
O(3)	19120(80)	69120(80)	50000	680(70)
O(1W)	50000	50000	50000	480(130)

Table 2 Molecular dimensions. Bond lengths are in Angstroms, angles in degrees. E.s.ds are in parentheses.

V(1)-O(2)	1.69(4)	V(1)-V(2)#4	2.842(4)
V(1)-O(1)	1.937(16)	V(1)-V(2)#5	2.842(4)
V(1)-O(1)#1	1.937(16)	V(2)-O(3)	1.61(2)
V(1)-O(1)#2	1.937(16)	V(2)-O(1)#3	1.931(6)
V(1)-O(1)#3	1.937(16)	V(2)-O(1)#6	1.931(6)
V(1)-V(2)	2.842(4)	V(2)-O(1)#2	1.931(6)
V(1)-V(2)#3	2.842(4)	V(2)-O(1)#7	1.931(6)
O(2)-V(1)-O(1)	106.8(5)	O(1)#1-V(1)-V(2)#5	119.7(4)
O(2)-V(1)-O(1)#1	106.8(5)	O(1)#2-V(1)-V(2)#5	42.62(17)
O(1)-V(1)-O(1)#1	85.2(3)	O(1)#3-V(1)-V(2)#5	119.7(4)
O(2)-V(1)-O(1)#2	106.8(6)	V(2)-V(1)-V(2)#5	80.10(14)
O(1)-V(1)-O(1)#2	85.2(3)	V(2)#3-V(1)-V(2)#5	80.10(14)
O(1)#1-V(1)-O(1)#2	146.4(11)	V(2)#4-V(1)-V(2)#5	131.0(4)
O(2)-V(1)-O(1)#3	106.8(6)	O(3)-V(2)-O(1)#3	103.9(5)
O(1)-V(1)-O(1)#3	146.4(11)	O(3)-V(2)-O(1)#6	103.9(5)
O(1)#1-V(1)-O(1)#3	85.2(3)	O(1)#3-V(2)-O(1)#6	87.9(11)
O(1)#2-V(1)-O(1)#3	85.2(3)	O(3)-V(2)-O(1)#2	103.9(5)
O(2)-V(1)-V(2)	114.50(18)	O(1)#3-V(2)-O(1)#2	85.5(10)
O(1)-V(1)-V(2)	119.7(4)	O(1)#6-V(2)-O(1)#2	152.2(9)
O(1)#1-V(1)-V(2)	119.7(4)	O(3)-V(2)-O(1)#7	103.9(5)
O(1)#2-V(1)-V(2)	42.62(17)	O(1)#3-V(2)-O(1)#7	152.2(9)
O(1)#3-V(1)-V(2)	42.62(17)	O(1)#6-V(2)-O(1)#7	85.5(10)
O(2)-V(1)-V(2)#3	114.50(18)	O(1)#2-V(2)-O(1)#7	87.9(11)
O(1)-V(1)-V(2)#3	42.62(17)	O(3)-V(2)-V(1)	110.50(18)
O(1)#1-V(1)-V(2)#3	42.62(17)	O(1)#3-V(2)-V(1)	42.8(5)
O(1)#2-V(1)-V(2)#3	119.7(4)	O(1)#6-V(2)-V(1)	124.4(6)
O(1)#3-V(1)-V(2)#3	119.7(4)	O(1)#2-V(2)-V(1)	42.8(5)
V(2)-V(1)-V(2)#3	131.0(4)	O(1)#7-V(2)-V(1)	124.4(6)
O(2)-V(1)-V(2)#4	114.50(18)	O(3)-V(2)-V(1)#6	110.50(18)
O(1)-V(1)-V(2)#4	119.7(4)	O(1)#3-V(2)-V(1)#6	124.4(6)
O(1)#1-V(1)-V(2)#4	42.62(17)	O(1)#6-V(2)-V(1)#6	42.8(5)
O(1)#2-V(1)-V(2)#4	119.7(4)	O(1)#2-V(2)-V(1)#6	124.4(6)
O(1)#3-V(1)-V(2)#4	42.62(17)	O(1)#7-V(2)-V(1)#6	42.8(5)
V(2)-V(1)-V(2)#4	80.10(14)	V(1)-V(2)-V(1)#6	139.0(4)
V(2)#3-V(1)-V(2)#4	80.10(14)	V(2)#3-O(1)-V(2)#5	142.6(11)
O(2)-V(1)-V(2)#5	114.50(18)	V(2)#3-O(1)-V(1)	94.6(5)
O(1)-V(1)-V(2)#5	42.62(17)	V(2)#5-O(1)-V(1)	94.6(5)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 x,y,-z+1; #2 -x,y,z; #3 -x,y,-z+1; #4 z-1/2,x+1/2,-y+1; #5 z-1/2,x+1/2,y;

#6 y-1/2,z,x+1/2; #7 y-1/2,z,-x+1/2

Table 3. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for the expression: $\exp \{-2\pi^2(h^2a^*U_{11} + \dots + 2hka^*b^*U_{12})\}$. E.s.ds are in parentheses.

	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
I	320(20)	320(20)	320(20)	0	0	0
V(1)	710(40)	450(40)	710(40)	0	0	0
V(2)	510(30)	510(30)	700(40)	0	0	-49(17)
O(1)	570(60)	710(90)	570(60)	-180(50)	-190(70)	180(50)
O(2)	580(100)	1000(300)	580(100)	0	0	0
O(3)	750(90)	750(90)	540(120)	0	0	-330(110)
O(1W)	480(130)	480(130)	480(130)	0	0	0

ANEXO 2

Dados cristalograficos obtidos para o refinamento da estrutura do **V₁₈P**

Dados cristalográficos e de refinamento estrutural para o $\{V_{18}O_{41}(PO_4)_n\}_n$, 6nK, ca 14.6n(H₂O) (**V₁₈P**)

Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, I2/m
Cor, forma do cristal	Verde-escuro, prisma
Temperatura / K	297(2)
a/ Å	14,8293(9)
b/ Å	10,9728(6)
c/ Å	16,0971(16)
$\alpha = \gamma / ^\circ$	90
$\beta / ^\circ$	90,947(2)
Volume / Å ³	2618,9(3)
Z, densidade calculada / mg/m ³	2; 2,747
F(000)	2100
Coefficiente de absorção / mm ⁻¹	3,686
Comprimento de onda / Å	0,71073
Tamanho do cristal (mm)	0,352 x 0,085 x 0,046
No difratômetro:	
$\theta / ^\circ$	3,4 a 27,5
Índices limitantes	-19 ≤ h ≤ 19; -14 ≤ k ≤ 14; -20 ≤ l ≤ 20
Completude para $\theta = 25,2^\circ$	99,6%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
Max. e min. de transmissão	0,7456 e 0,6232
Reflexões coletadas / únicas	59705 / 3156 [R _{int} = 0,052]
No. de reflexões 'observadas' [I > 2 σ (I)]	2705
Estrutura determinada por	Métodos duplos, SHELXT
Refinamento:	Matriz integral mínimos quadrados, F ²
Dados / restrições / parâmetros	3156 / 0 / 225
Qualidade de ajuste no F ²	1,121
Índice R final ('observados')	R1 = 0,095, wR2 = 0,273
Índice R final	R1 = 0,106, wR2 = 0,279
Reflexões ponderadas	
	$w = 1 / [s^2(Fo^2) + (0.1388P)^2 + 106.1464P]$ where $P = (Fo^2 + 2Fc^2) / 3$
Coefficiente de extinção	n/a
Maior diferença pico-buraco / e.Å ⁻³	2,18 e -3,70
Localização da maior diferença de pico	Próximo a O(4w)

Table 1 Atomic coordinates ($\times 10^5$) and equivalent isotropic displacement parameters $\text{\AA}^2 \times 10^4$. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor. E.s.ds are in parentheses.

	x	y	z	U(eq)	S.o.f.#
V(1)	46702(10)	26923(13)	34748(9)	216(4)	1
V(2)	66564(10)	26882(13)	47062(10)	212(4)	1
V(3)	45542(18)	50000	26076(14)	286(6)	1
V(4)	30147(14)	50000	37230(13)	210(5)	1
V(5)	76069(13)	50000	46347(14)	203(5)	1
V(6)	50000	14800(40)	50000	669(11)	1
V(7)	63460(14)	50000	31731(12)	186(5)	1
P(1)	50000	50000	50000	86(7)	1
O(1P)	42930(70)	58130(100)	45480(70)	130(20)	0.5
O(2P)	45320(70)	42060(90)	56450(60)	130(20)	0.5
O(1)	45190(50)	16310(60)	28070(40)	319(15)	1
O(2)	44010(100)	50000	15960(60)	470(30)	1
O(3)	21150(60)	50000	31560(60)	280(20)	1
O(4)	87020(60)	50000	45210(80)	410(30)	1
O(5)	69240(70)	50000	23310(60)	340(20)	1
O(6)	73790(50)	16300(60)	45770(50)	323(15)	1
O(7)	50000	0	50000	400(40)	1
O(8)	54420(50)	38230(70)	28770(50)	361(17)	1
O(9)	70360(50)	38680(60)	38840(40)	311(15)	1
O(10)	56900(50)	20790(80)	40650(60)	490(20)	1
O(11)	39940(60)	20860(90)	43590(50)	480(20)	1
O(12)	37550(50)	38570(70)	31400(50)	389(18)	1
O(13)	73070(60)	38310(70)	54230(40)	359(18)	1
K(1)	86050(30)	50000	16540(30)	600(12)	1
K(2)	31470(40)	0	36670(40)	732(14)	1
K(3)	102030(40)	50000	35340(40)	799(17)	1
O(1W)	58280(90)	65190(180)	9300(100)	1080(50)	1
O(2W)	63850(90)	82040(140)	20520(80)	890(40)	1
O(3W)	20300(90)	-20540(110)	33770(80)	800(40)	1
O(4W)	60230(160)	50000	2300(200)	1030(160)	0,5
O(5W)	6300(300)	-28400(400)	43000(200)	940(100)	0,4

- site occupancy, if different from 1.

* - U(iso) ($\text{\AA}^2 \times 10^4$)

Table 2 Molecular dimensions. Bond lengths are in Ångstroms, angles in degrees. E.s.ds are in parentheses.

V(1)-O(1)	1.597(6)	V(6)-O(10)	1.948(9)
V(1)-O(11)	1.877(7)	V(6)-O(10)#3	1.948(9)
V(1)-O(10)	1.896(7)	V(6)-K(1)#2	3.767(4)
V(1)-O(12)	1.934(7)	V(6)-K(1)#6	3.767(4)
V(1)-O(8)	1.952(7)	V(6)-K(2)	3.821(6)
V(1)-O(1P)#1	2.453(11)	V(7)-O(5)	1.616(9)
V(1)-V(6)	2.828(2)	V(7)-O(8)	1.916(7)
V(1)-V(3)	2.8951(19)	V(7)-O(8)#1	1.916(7)
V(1)-K(2)	3.735(4)	V(7)-O(9)	1.965(7)
V(1)-K(1)#2	3.916(3)	V(7)-O(9)#1	1.965(7)
V(2)-O(6)	1.596(6)	P(1)-O(2P)	1.531(10)
V(2)-O(10)	1.875(7)	P(1)-O(2P)#1	1.531(10)
V(2)-O(11)#3	1.918(7)	P(1)-O(2P)#3	1.531(10)
V(2)-O(9)	1.941(7)	P(1)-O(2P)#5	1.531(10)
V(2)-O(13)	1.949(7)	P(1)-O(1P)	1.549(10)
V(2)-V(6)	2.838(2)	P(1)-O(1P)#1	1.549(10)
V(2)-V(5)	2.9053(18)	P(1)-O(1P)#3	1.549(10)
V(2)-K(1)#2	3.690(3)	P(1)-O(1P)#5	1.549(10)
V(2)-K(2)#4	3.952(4)	O(1P)-O(2P)#5	1.775(14)
V(3)-O(2)	1.640(10)	O(1P)-O(1P)#1	1.78(2)
V(3)-O(8)#1	1.889(7)	O(1P)-O(2P)#1	1.796(15)
V(3)-O(8)	1.890(7)	O(2P)-O(2P)#1	1.74(2)
V(3)-O(12)	1.935(8)	O(1)-K(3)#2	2.840(8)
V(3)-O(12)#1	1.935(8)	O(1)-K(2)	3.059(9)
V(3)-V(7)	2.794(3)	O(1)-K(1)#2	3.408(9)
V(3)-V(4)	2.928(3)	O(3)-K(3)#7	2.910(11)
V(4)-O(3)	1.604(9)	O(3)-K(2)#8	2.954(11)
V(4)-O(12)#1	1.922(8)	O(4)-K(3)	2.756(12)
V(4)-O(12)	1.922(8)	O(5)-K(1)	2.736(11)
V(4)-O(13)#5	1.946(7)	O(6)-K(1)#2	3.027(9)
V(4)-O(13)#3	1.946(7)	O(7)-K(1)#2	3.399(4)
V(4)-O(1P)#1	2.464(10)	O(7)-K(1)#6	3.399(4)
V(4)-O(1P)	2.464(10)	O(10)-K(1)#2	2.771(11)
V(4)-V(5)#5	2.814(3)	O(11)-K(2)	2.831(11)
V(5)-O(4)	1.636(10)	K(1)-O(2W)#9	2.866(15)
V(5)-O(13)	1.863(7)	K(1)-O(2W)#10	2.866(15)
V(5)-O(13)#1	1.863(7)	K(2)-O(3W)#11	2.831(14)
V(5)-O(9)#1	1.919(7)	K(2)-O(3W)	2.831(14)
V(5)-O(9)	1.919(7)	K(3)-O(5W)#12	2.74(4)
V(5)-V(7)	2.981(3)	K(3)-O(5W)#13	2.74(4)
V(6)-O(7)	1.624(4)	K(3)-O(2W)#10	3.201(17)
V(6)-O(11)#3	1.919(9)	K(3)-O(2W)#9	3.201(17)
V(6)-O(11)	1.919(9)		
O(1)-V(1)-O(11)	100.4(4)	O(2P)#1-P(1)-O(2P)#3	180.0(6)
O(1)-V(1)-O(10)	100.4(4)	O(2P)-P(1)-O(2P)#5	180.0
O(11)-V(1)-O(10)	85.8(4)	O(2P)#1-P(1)-O(2P)#5	110.6(8)
O(1)-V(1)-O(12)	101.8(4)	O(2P)#3-P(1)-O(2P)#5	69.4(8)
O(11)-V(1)-O(12)	93.7(3)	O(2P)-P(1)-O(1P)	109.6(6)
O(10)-V(1)-O(12)	157.6(4)	O(2P)#1-P(1)-O(1P)	71.3(6)
O(1)-V(1)-O(8)	102.1(4)	O(2P)#3-P(1)-O(1P)	108.7(6)
O(11)-V(1)-O(8)	157.5(4)	O(2P)#5-P(1)-O(1P)	70.4(6)
O(10)-V(1)-O(8)	90.2(3)	O(2P)-P(1)-O(1P)#1	71.3(6)
O(12)-V(1)-O(8)	81.8(3)	O(2P)#1-P(1)-O(1P)#1	109.6(6)
O(1)-V(1)-O(1P)#1	158.4(4)	O(2P)#3-P(1)-O(1P)#1	70.4(6)
O(11)-V(1)-O(1P)#1	64.7(4)	O(2P)#5-P(1)-O(1P)#1	108.7(6)
O(10)-V(1)-O(1P)#1	94.2(4)	O(1P)-P(1)-O(1P)#1	70.4(8)

O(12)-V(1)-O(1P)#1	65.7(3)	O(2P)-P(1)-O(1P)#3	108.7(6)
O(8)-V(1)-O(1P)#1	93.7(3)	O(2P)#1-P(1)-O(1P)#3	70.4(6)
O(1)-V(1)-V(6)	105.2(3)	O(2P)#3-P(1)-O(1P)#3	109.6(6)
O(11)-V(1)-V(6)	42.4(3)	O(2P)#5-P(1)-O(1P)#3	71.3(6)
O(10)-V(1)-V(6)	43.4(3)	O(1P)-P(1)-O(1P)#3	109.6(8)
O(12)-V(1)-V(6)	131.5(2)	O(1P)#1-P(1)-O(1P)#3	180.0(6)
O(8)-V(1)-V(6)	129.2(2)	O(2P)-P(1)-O(1P)#5	70.4(6)
O(1P)#1-V(1)-V(6)	75.0(3)	O(2P)#1-P(1)-O(1P)#5	108.7(6)
O(1)-V(1)-V(3)	107.9(3)	O(2P)#3-P(1)-O(1P)#5	71.3(6)
O(11)-V(1)-V(3)	130.4(3)	O(2P)#5-P(1)-O(1P)#5	109.6(6)
O(10)-V(1)-V(3)	126.3(3)	O(1P)-P(1)-O(1P)#5	180.0
O(12)-V(1)-V(3)	41.6(2)	O(1P)#1-P(1)-O(1P)#5	109.6(8)
O(8)-V(1)-V(3)	40.3(2)	O(1P)#3-P(1)-O(1P)#5	70.4(8)
O(1P)#1-V(1)-V(3)	75.1(3)	P(1)-O(1P)-O(2P)#5	54.4(5)
V(6)-V(1)-V(3)	146.93(10)	P(1)-O(1P)-O(1P)#1	54.8(4)
O(1)-V(1)-K(2)	53.2(3)	O(2P)#5-O(1P)-O(1P)#1	89.3(5)
O(11)-V(1)-K(2)	47.6(3)	P(1)-O(1P)-O(2P)#1	53.9(5)
O(10)-V(1)-K(2)	99.0(3)	O(2P)#5-O(1P)-O(2P)#1	89.7(6)
O(12)-V(1)-K(2)	97.1(3)	O(1P)#1-O(1P)-O(2P)#1	89.3(5)
O(8)-V(1)-K(2)	154.7(3)	P(1)-O(1P)-V(1)#1	123.8(5)
O(1P)#1-V(1)-K(2)	109.0(3)	O(2P)#5-O(1P)-V(1)#1	69.4(5)
V(6)-V(1)-K(2)	69.65(11)	O(1P)#1-O(1P)-V(1)#1	131.9(2)
V(3)-V(1)-K(2)	134.47(11)	O(2P)#1-O(1P)-V(1)#1	131.1(6)
O(1)-V(1)-K(1)#2	59.9(3)	P(1)-O(1P)-V(4)	123.6(6)
O(11)-V(1)-K(1)#2	97.5(3)	O(2P)#5-O(1P)-V(4)	130.5(6)
O(10)-V(1)-K(1)#2	40.7(3)	O(1P)#1-O(1P)-V(4)	68.8(2)
O(12)-V(1)-K(1)#2	160.0(3)	O(2P)#1-O(1P)-V(4)	131.5(6)
O(8)-V(1)-K(1)#2	93.7(2)	V(1)#1-O(1P)-V(4)	92.6(4)
O(1P)#1-V(1)-K(1)#2	134.3(3)	P(1)-O(2P)-O(2P)#1	55.3(4)
V(6)-V(1)-K(1)#2	65.64(9)	P(1)-O(2P)-O(1P)#5	55.3(5)
V(3)-V(1)-K(1)#2	131.91(9)	O(2P)#1-O(2P)-O(1P)#5	90.7(5)
K(2)-V(1)-K(1)#2	78.71(10)	P(1)-O(2P)-O(1P)#1	54.8(5)
O(6)-V(2)-O(10)	100.2(4)	O(2P)#1-O(2P)-O(1P)#1	90.7(5)
O(6)-V(2)-O(11)#3	101.5(4)	O(1P)#5-O(2P)-O(1P)#1	90.3(6)
O(10)-V(2)-O(11)#3	85.4(4)	V(1)-O(1)-K(3)#2	161.8(4)
O(6)-V(2)-O(9)	101.1(4)	V(1)-O(1)-K(2)	102.1(3)
O(10)-V(2)-O(9)	95.2(3)	K(3)#2-O(1)-K(2)	94.7(2)
O(11)#3-V(2)-O(9)	156.9(4)	V(1)-O(1)-K(1)#2	96.2(3)
O(6)-V(2)-O(13)	102.6(4)	K(3)#2-O(1)-K(1)#2	74.6(2)
O(10)-V(2)-O(13)	157.2(4)	K(2)-O(1)-K(1)#2	97.1(2)
O(11)#3-V(2)-O(13)	90.5(3)	V(4)-O(3)-K(3)#7	133.3(5)
O(9)-V(2)-O(13)	80.1(3)	V(4)-O(3)-K(2)#8	131.3(5)
O(6)-V(2)-V(6)	105.5(3)	K(3)#7-O(3)-K(2)#8	95.5(3)
O(10)-V(2)-V(6)	43.1(3)	V(5)-O(4)-K(3)	151.2(7)
O(11)#3-V(2)-V(6)	42.3(3)	V(7)-O(5)-K(1)	146.4(6)
O(9)-V(2)-V(6)	133.4(2)	V(2)-O(6)-K(1)#2	101.4(3)
O(13)-V(2)-V(6)	128.6(2)	V(6)#4-O(7)-V(6)	180.0
O(6)-V(2)-V(5)	107.6(3)	V(6)#4-O(7)-K(1)#2	90.0
O(10)-V(2)-V(5)	131.0(3)	V(6)-O(7)-K(1)#2	90.000(1)
O(11)#3-V(2)-V(5)	125.6(3)	V(6)#4-O(7)-K(1)#6	90.000(1)
O(9)-V(2)-V(5)	40.9(2)	V(6)-O(7)-K(1)#6	90.0
O(13)-V(2)-V(5)	39.3(2)	K(1)#2-O(7)-K(1)#6	180.0
V(6)-V(2)-V(5)	146.76(10)	V(3)-O(8)-V(7)	94.5(3)
O(6)-V(2)-K(1)#2	53.5(3)	V(3)-O(8)-V(1)	97.8(3)
O(10)-V(2)-K(1)#2	46.9(3)	V(7)-O(8)-V(1)	136.0(4)
O(11)#3-V(2)-K(1)#2	98.1(3)	V(5)-O(9)-V(2)	97.6(3)
O(9)-V(2)-K(1)#2	99.1(2)	V(5)-O(9)-V(7)	100.2(3)
O(13)-V(2)-K(1)#2	155.7(3)	V(2)-O(9)-V(7)	131.7(4)
V(6)-V(2)-K(1)#2	69.08(9)	V(2)-O(10)-V(1)	138.2(5)
V(5)-V(2)-K(1)#2	136.10(9)	V(2)-O(10)-V(6)	95.8(4)

O(6)-V(2)-K(2)#4	60.1(3)	V(1)-O(10)-V(6)	94.7(4)
O(10)-V(2)-K(2)#4	98.4(3)	V(2)-O(10)-K(1)#2	103.5(4)
O(11)#3-V(2)-K(2)#4	41.9(3)	V(1)-O(10)-K(1)#2	112.7(4)
O(9)-V(2)-K(2)#4	158.5(2)	V(6)-O(10)-K(1)#2	104.6(4)
O(13)-V(2)-K(2)#4	93.3(2)	V(1)-O(11)-V(2)#3	139.0(5)
V(6)-V(2)-K(2)#4	66.15(10)	V(1)-O(11)-V(6)	96.3(4)
V(5)-V(2)-K(2)#4	130.34(10)	V(2)#3-O(11)-V(6)	95.4(4)
K(1)#2-V(2)-K(2)#4	78.62(9)	V(1)-O(11)-K(2)	103.1(4)
O(2)-V(3)-O(8)#1	108.2(4)	V(2)#3-O(11)-K(2)	111.2(4)
O(2)-V(3)-O(8)	108.2(4)	V(6)-O(11)-K(2)	105.5(4)
O(8)#1-V(3)-O(8)	86.2(4)	V(4)-O(12)-V(1)	134.3(5)
O(2)-V(3)-O(12)	111.3(5)	V(4)-O(12)-V(3)	98.7(4)
O(8)#1-V(3)-O(12)	140.4(4)	V(1)-O(12)-V(3)	96.9(3)
O(8)-V(3)-O(12)	83.4(3)	V(5)-O(13)-V(4)#5	95.2(3)
O(2)-V(3)-O(12)#1	111.3(5)	V(5)-O(13)-V(2)	99.3(3)
O(8)#1-V(3)-O(12)#1	83.4(3)	V(4)#5-O(13)-V(2)	135.9(4)
O(8)-V(3)-O(12)#1	140.4(4)	O(5)-K(1)-O(10)#2	121.3(2)
O(12)-V(3)-O(12)#1	80.8(5)	O(5)-K(1)-O(10)#15	121.3(2)
O(2)-V(3)-V(7)	116.0(5)	O(10)#2-K(1)-O(10)#15	110.8(4)
O(8)#1-V(3)-V(7)	43.1(2)	O(5)-K(1)-O(2W)#9	72.8(3)
O(8)-V(3)-V(7)	43.1(2)	O(10)#2-K(1)-O(2W)#9	150.7(4)
O(12)-V(3)-V(7)	116.2(2)	O(10)#15-K(1)-O(2W)#9	74.9(3)
O(12)#1-V(3)-V(7)	116.2(2)	O(5)-K(1)-O(2W)#10	72.8(3)
O(2)-V(3)-V(1)#1	118.99(5)	O(10)#2-K(1)-O(2W)#10	74.9(3)
O(8)#1-V(3)-V(1)#1	41.9(2)	O(10)#15-K(1)-O(2W)#10	150.7(4)
O(8)-V(3)-V(1)#1	116.8(3)	O(2W)#9-K(1)-O(2W)#10	86.8(6)
O(12)-V(3)-V(1)#1	112.7(3)	O(5)-K(1)-O(6)#2	80.1(2)
O(12)#1-V(3)-V(1)#1	41.6(2)	O(10)#2-K(1)-O(6)#2	54.6(2)
V(7)-V(3)-V(1)#1	78.13(6)	O(10)#15-K(1)-O(6)#2	113.2(3)
O(2)-V(3)-V(1)	119.00(5)	O(2W)#9-K(1)-O(6)#2	151.5(3)
O(8)#1-V(3)-V(1)	116.8(3)	O(2W)#10-K(1)-O(6)#2	93.8(3)
O(8)-V(3)-V(1)	41.9(2)	O(5)-K(1)-O(6)#15	80.1(2)
O(12)-V(3)-V(1)	41.6(2)	O(10)#2-K(1)-O(6)#15	113.2(3)
O(12)#1-V(3)-V(1)	112.7(3)	O(10)#15-K(1)-O(6)#15	54.6(2)
V(7)-V(3)-V(1)	78.13(6)	O(2W)#9-K(1)-O(6)#15	93.8(3)
V(1)#1-V(3)-V(1)	122.00(10)	O(2W)#10-K(1)-O(6)#15	151.5(3)
O(2)-V(3)-V(4)	120.8(5)	O(6)#2-K(1)-O(6)#15	72.4(3)
O(8)#1-V(3)-V(4)	114.0(2)	O(5)-K(1)-O(7)#16	151.9(3)
O(8)-V(3)-V(4)	114.0(2)	O(10)#2-K(1)-O(7)#16	55.52(19)
O(12)-V(3)-V(4)	40.5(2)	O(10)#15-K(1)-O(7)#16	55.52(19)
O(12)#1-V(3)-V(4)	40.5(2)	O(2W)#9-K(1)-O(7)#16	125.0(2)
V(7)-V(3)-V(4)	123.17(10)	O(2W)#10-K(1)-O(7)#16	125.0(2)
V(1)#1-V(3)-V(4)	75.23(6)	O(6)#2-K(1)-O(7)#16	77.30(17)
V(1)-V(3)-V(4)	75.23(6)	O(6)#15-K(1)-O(7)#16	77.30(17)
O(3)-V(4)-O(12)#1	101.5(4)	O(5)-K(1)-O(1)#15	130.1(2)
O(3)-V(4)-O(12)	101.5(4)	O(10)#2-K(1)-O(1)#15	103.1(2)
O(12)#1-V(4)-O(12)	81.5(4)	O(10)#15-K(1)-O(1)#15	50.33(19)
O(3)-V(4)-O(13)#5	101.0(4)	O(2W)#9-K(1)-O(1)#15	57.3(3)
O(12)#1-V(4)-O(13)#5	93.6(3)	O(2W)#10-K(1)-O(1)#15	100.5(4)
O(12)-V(4)-O(13)#5	157.5(4)	O(6)#2-K(1)-O(1)#15	149.3(2)
O(3)-V(4)-O(13)#3	101.0(4)	O(6)#15-K(1)-O(1)#15	103.81(17)
O(12)#1-V(4)-O(13)#3	157.5(4)	O(7)#16-K(1)-O(1)#15	72.20(14)
O(12)-V(4)-O(13)#3	93.6(3)	O(5)-K(1)-O(1)#2	130.1(2)
O(13)#5-V(4)-O(13)#3	82.5(4)	O(10)#2-K(1)-O(1)#2	50.33(19)
O(3)-V(4)-O(1P)#1	158.8(2)	O(10)#15-K(1)-O(1)#2	103.1(2)
O(12)#1-V(4)-O(1P)#1	93.4(4)	O(2W)#9-K(1)-O(1)#2	100.5(4)
O(12)-V(4)-O(1P)#1	65.6(4)	O(2W)#10-K(1)-O(1)#2	57.3(3)
O(13)#5-V(4)-O(1P)#1	93.1(4)	O(6)#2-K(1)-O(1)#2	103.81(17)
O(13)#3-V(4)-O(1P)#1	64.9(3)	O(6)#15-K(1)-O(1)#2	149.3(2)
O(3)-V(4)-O(1P)	158.8(2)	O(7)#16-K(1)-O(1)#2	72.20(14)

O(12)#1-V(4)-O(1P)	65.6(4)	O(1)#15-K(1)-O(1)#2	63.4(2)
O(12)-V(4)-O(1P)	93.4(4)	O(5)-K(1)-V(2)#2	98.56(17)
O(13)#5-V(4)-O(1P)	64.9(3)	O(10)#2-K(1)-V(2)#2	29.62(15)
O(13)#3-V(4)-O(1P)	93.1(4)	O(10)#15-K(1)-V(2)#2	116.5(2)
O(1P)#1-V(4)-O(1P)	42.5(5)	O(2W)#9-K(1)-V(2)#2	168.4(3)
O(3)-V(4)-V(5)#5	104.6(4)	O(2W)#10-K(1)-V(2)#2	83.2(3)
O(12)#1-V(4)-V(5)#5	131.1(2)	O(6)#2-K(1)-V(2)#2	25.09(12)
O(12)-V(4)-V(5)#5	131.1(2)	O(6)#15-K(1)-V(2)#2	92.23(19)
O(13)#5-V(4)-V(5)#5	41.2(2)	O(7)#16-K(1)-V(2)#2	66.06(7)
O(13)#3-V(4)-V(5)#5	41.2(2)	O(1)#15-K(1)-V(2)#2	130.38(17)
O(1P)#1-V(4)-V(5)#5	75.8(3)	O(1)#2-K(1)-V(2)#2	78.94(12)
O(1P)-V(4)-V(5)#5	75.8(3)	O(5)-K(1)-V(2)#15	98.56(17)
O(3)-V(4)-V(3)	107.5(4)	O(10)#2-K(1)-V(2)#15	116.5(2)
O(12)#1-V(4)-V(3)	40.8(2)	O(10)#15-K(1)-V(2)#15	29.62(15)
O(12)-V(4)-V(3)	40.8(2)	O(2W)#9-K(1)-V(2)#15	83.2(3)
O(13)#5-V(4)-V(3)	129.5(2)	O(2W)#10-K(1)-V(2)#15	168.4(3)
O(13)#3-V(4)-V(3)	129.5(2)	O(6)#2-K(1)-V(2)#15	92.23(19)
O(1P)#1-V(4)-V(3)	74.3(3)	O(6)#15-K(1)-V(2)#15	25.09(12)
O(1P)-V(4)-V(3)	74.3(3)	O(7)#16-K(1)-V(2)#15	66.06(7)
V(5)#5-V(4)-V(3)	147.89(10)	O(1)#15-K(1)-V(2)#15	78.94(12)
O(4)-V(5)-O(13)	108.9(4)	O(1)#2-K(1)-V(2)#15	130.38(17)
O(4)-V(5)-O(13)#1	108.9(4)	V(2)#2-K(1)-V(2)#15	106.12(14)
O(13)-V(5)-O(13)#1	87.0(4)	O(11)-K(2)-O(11)#11	107.9(4)
O(4)-V(5)-O(9)#1	111.0(4)	O(11)-K(2)-O(3W)#11	71.1(3)
O(13)-V(5)-O(9)#1	140.0(4)	O(11)#11-K(2)-O(3W)#11	164.4(4)
O(13)#1-V(5)-O(9)#1	82.8(3)	O(11)-K(2)-O(3W)	164.4(4)
O(4)-V(5)-O(9)	111.0(4)	O(11)#11-K(2)-O(3W)	71.1(3)
O(13)-V(5)-O(9)	82.8(3)	O(3W)#11-K(2)-O(3W)	105.5(5)
O(13)#1-V(5)-O(9)	140.0(4)	O(11)-K(2)-O(3)#8	116.2(2)
O(9)#1-V(5)-O(9)	80.6(4)	O(11)#11-K(2)-O(3)#8	116.2(2)
O(4)-V(5)-V(4)#5	116.5(5)	O(3W)#11-K(2)-O(3)#8	76.7(3)
O(13)-V(5)-V(4)#5	43.5(2)	O(3W)-K(2)-O(3)#8	76.7(3)
O(13)#1-V(5)-V(4)#5	43.5(2)	O(11)-K(2)-O(1)#11	110.9(3)
O(9)#1-V(5)-V(4)#5	116.3(2)	O(11)#11-K(2)-O(1)#11	53.87(19)
O(9)-V(5)-V(4)#5	116.3(2)	O(3W)#11-K(2)-O(1)#11	141.5(4)
O(4)-V(5)-V(2)	119.16(4)	O(3W)-K(2)-O(1)#11	81.4(3)
O(13)-V(5)-V(2)	41.4(2)	O(3)#8-K(2)-O(1)#11	68.2(2)
O(13)#1-V(5)-V(2)	116.9(3)	O(11)-K(2)-O(1)	53.9(2)
O(9)#1-V(5)-V(2)	112.4(2)	O(11)#11-K(2)-O(1)	110.9(3)
O(9)-V(5)-V(2)	41.5(2)	O(3W)#11-K(2)-O(1)	81.4(3)
V(4)#5-V(5)-V(2)	78.23(5)	O(3W)-K(2)-O(1)	141.5(4)
O(4)-V(5)-V(2)#1	119.16(4)	O(3)#8-K(2)-O(1)	68.2(2)
O(13)-V(5)-V(2)#1	116.9(3)	O(1)#11-K(2)-O(1)	71.6(3)
O(13)#1-V(5)-V(2)#1	41.4(2)	O(11)-K(2)-V(1)	29.29(15)
O(9)#1-V(5)-V(2)#1	41.5(2)	O(11)#11-K(2)-V(1)	114.0(2)
O(9)-V(5)-V(2)#1	112.4(2)	O(3W)#11-K(2)-V(1)	73.1(3)
V(4)#5-V(5)-V(2)#1	78.23(5)	O(3W)-K(2)-V(1)	165.7(4)
V(2)-V(5)-V(2)#1	121.65(9)	O(3)#8-K(2)-V(1)	89.28(17)
O(4)-V(5)-V(7)	121.5(5)	O(1)#11-K(2)-V(1)	91.0(2)
O(13)-V(5)-V(7)	112.6(2)	O(1)-K(2)-V(1)	24.72(12)
O(13)#1-V(5)-V(7)	112.6(2)	O(11)-K(2)-V(1)#11	114.0(2)
O(9)#1-V(5)-V(7)	40.4(2)	O(11)#11-K(2)-V(1)#11	29.29(15)
O(9)-V(5)-V(7)	40.4(2)	O(3W)#11-K(2)-V(1)#11	165.7(4)
V(4)#5-V(5)-V(7)	122.04(9)	O(3W)-K(2)-V(1)#11	73.1(3)
V(2)-V(5)-V(7)	74.50(5)	O(3)#8-K(2)-V(1)#11	89.28(17)
V(2)#1-V(5)-V(7)	74.50(5)	O(1)#11-K(2)-V(1)#11	24.72(12)
O(7)-V(6)-O(11)#3	110.3(3)	O(1)-K(2)-V(1)#11	91.0(2)
O(7)-V(6)-O(11)	110.3(3)	V(1)-K(2)-V(1)#11	104.55(16)
O(11)#3-V(6)-O(11)	139.4(7)	O(11)-K(2)-V(6)#4	79.2(2)
O(7)-V(6)-O(10)	109.7(3)	O(11)#11-K(2)-V(6)#4	28.94(18)

O(11)#3-V(6)-O(10) 83.4(3)
 O(11)-V(6)-O(10) 83.2(3)
 O(7)-V(6)-O(10)#3 109.7(3)
 O(11)#3-V(6)-O(10)#3 83.2(3)
 O(11)-V(6)-O(10)#3 83.4(3)
 O(10)-V(6)-O(10)#3 140.6(6)
 O(7)-V(6)-V(1) 118.06(8)
 O(11)#3-V(6)-V(1) 115.2(3)
 O(11)-V(6)-V(1) 41.3(2)
 O(10)-V(6)-V(1) 41.9(2)
 O(10)#3-V(6)-V(1) 115.3(3)
 O(7)-V(6)-V(1)#3 118.06(8)
 O(11)#3-V(6)-V(1)#3 41.3(2)
 O(11)-V(6)-V(1)#3 115.2(3)
 O(10)-V(6)-V(1)#3 115.3(3)
 O(10)#3-V(6)-V(1)#3 41.9(2)
 V(1)-V(6)-V(1)#3 123.88(16)
 O(7)-V(6)-V(2)#3 117.85(8)
 O(11)#3-V(6)-V(2)#3 114.6(3)
 O(11)-V(6)-V(2)#3 42.3(2)
 O(10)-V(6)-V(2)#3 116.0(3)
 O(10)#3-V(6)-V(2)#3 41.1(2)
 V(1)-V(6)-V(2)#3 77.72(8)
 V(1)#3-V(6)-V(2)#3 76.90(8)
 O(7)-V(6)-V(2) 117.85(8)
 O(11)#3-V(6)-V(2) 42.3(2)
 O(11)-V(6)-V(2) 114.6(3)
 O(10)-V(6)-V(2) 41.1(2)
 O(10)#3-V(6)-V(2) 116.0(3)
 V(1)-V(6)-V(2) 76.90(8)
 V(1)#3-V(6)-V(2) 77.72(8)
 V(2)#3-V(6)-V(2) 124.30(15)
 O(7)-V(6)-K(1)#2 64.46(6)
 O(11)#3-V(6)-K(1)#2 95.6(2)
 O(11)-V(6)-K(1)#2 101.6(2)
 O(10)-V(6)-K(1)#2 45.4(3)
 O(10)#3-V(6)-K(1)#2 173.3(3)
 V(1)-V(6)-K(1)#2 71.22(7)
 V(1)#3-V(6)-K(1)#2 136.67(9)
 V(2)#3-V(6)-K(1)#2 143.73(9)
 V(2)-V(6)-K(1)#2 66.21(6)
 O(7)-V(6)-K(1)#6 64.46(6)
 O(11)#3-V(6)-K(1)#6 101.6(2)
 O(11)-V(6)-K(1)#6 95.6(2)
 O(10)-V(6)-K(1)#6 173.3(3)
 O(10)#3-V(6)-K(1)#6 45.4(3)
 V(1)-V(6)-K(1)#6 136.67(9)
 V(1)#3-V(6)-K(1)#6 71.22(7)
 V(2)#3-V(6)-K(1)#6 66.21(6)
 V(2)-V(6)-K(1)#6 143.73(9)
 K(1)#2-V(6)-K(1)#6 128.93(12)
 O(7)-V(6)-K(2) 64.85(7)
 O(11)#3-V(6)-K(2) 174.2(3)
 O(11)-V(6)-K(2) 45.5(3)
 O(10)-V(6)-K(2) 95.3(2)
 O(10)#3-V(6)-K(2) 101.3(2)
 V(1)-V(6)-K(2) 66.42(7)
 V(1)#3-V(6)-K(2) 143.12(10)
 V(2)#3-V(6)-K(2) 71.07(8)
 V(2)-V(6)-K(2) 136.18(10)
 O(3W)#11-K(2)-V(6)#4 147.6(3)
 O(3W)-K(2)-V(6)#4 99.6(2)
 O(3)#8-K(2)-V(6)#4 129.8(2)
 O(1)#11-K(2)-V(6)#4 61.80(16)
 O(1)-K(2)-V(6)#4 91.4(2)
 V(1)-K(2)-V(6)#4 87.26(13)
 V(1)#11-K(2)-V(6)#4 43.94(7)
 O(11)-K(2)-V(6) 28.94(18)
 O(11)#11-K(2)-V(6) 79.2(2)
 O(3W)#11-K(2)-V(6) 99.6(2)
 O(3W)-K(2)-V(6) 147.6(3)
 O(3)#8-K(2)-V(6) 129.8(2)
 O(1)#11-K(2)-V(6) 91.4(2)
 O(1)-K(2)-V(6) 61.80(16)
 V(1)-K(2)-V(6) 43.94(7)
 V(1)#11-K(2)-V(6) 87.26(13)
 V(6)#4-K(2)-V(6) 50.31(13)
 O(11)-K(2)-V(2)#3 26.90(15)
 O(11)#11-K(2)-V(2)#3 108.4(2)
 O(3W)#11-K(2)-V(2)#3 63.4(2)
 O(3W)-K(2)-V(2)#3 137.7(4)
 O(3)#8-K(2)-V(2)#3 131.71(7)
 O(1)#11-K(2)-V(2)#3 134.0(2)
 O(1)-K(2)-V(2)#3 79.66(13)
 V(1)-K(2)-V(2)#3 55.00(5)
 V(1)#11-K(2)-V(2)#3 127.38(16)
 V(6)#4-K(2)-V(2)#3 84.29(13)
 V(6)-K(2)-V(2)#3 42.78(6)
 O(5W)#12-K(3)-O(5W)#13119.5(16)
 O(5W)#12-K(3)-O(4) 85.7(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(4) 85.7(8)
 O(5W)#12-K(3)-O(1)#2 148.4(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(1)#2 76.3(8)
 O(4)-K(3)-O(1)#2 124.5(3)
 O(5W)#12-K(3)-O(1)#15 76.3(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(1)#15 148.4(8)
 O(4)-K(3)-O(1)#15 124.5(3)
 O(1)#2-K(3)-O(1)#15 78.1(3)
 O(5W)#12-K(3)-O(3)#17 82.7(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(3)#17 82.7(8)
 O(4)-K(3)-O(3)#17 156.9(4)
 O(1)#2-K(3)-O(3)#17 71.8(2)
 O(1)#15-K(3)-O(3)#17 71.8(2)
 O(5W)#12-K(3)-O(2W)#10146.0(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(2W)#10 76.5(8)
 O(4)-K(3)-O(2W)#10 64.7(3)
 O(1)#2-K(3)-O(2W)#10 60.2(3)
 O(1)#15-K(3)-O(2W)#10 106.2(4)
 O(3)#17-K(3)-O(2W)#10 130.8(2)
 O(5W)#12-K(3)-O(2W)#9 76.5(8)
 O(5W)#13-K(3)-O(2W)#9 146.0(8)
 O(4)-K(3)-O(2W)#9 64.7(3)
 O(1)#2-K(3)-O(2W)#9 106.2(4)
 O(1)#15-K(3)-O(2W)#9 60.2(3)
 O(3)#17-K(3)-O(2W)#9 130.8(3)
 O(2W)#10-K(3)-O(2W)#9 76.0(5)
 O(5W)#12-K(3)-K(1) 119.7(8)
 O(5W)#13-K(3)-K(1) 119.7(8)
 O(4)-K(3)-K(1) 87.7(3)
 O(1)#2-K(3)-K(1) 59.5(2)

K(1)#2-V(6)-K(2)	79.52(12)	O(1)#15-K(3)-K(1)	59.5(2)
K(1)#6-V(6)-K(2)	79.36(12)	O(3)#17-K(3)-K(1)	115.4(3)
O(5)-V(7)-O(8)	99.8(4)	O(2W)#10-K(3)-K(1)	47.3(3)
O(5)-V(7)-O(8)#1	99.8(4)	O(2W)#9-K(3)-K(1)	47.3(3)
O(8)-V(7)-O(8)#1	84.8(4)	O(5W)#12-K(3)-K(2)#2	103.7(8)
O(5)-V(7)-O(9)	102.2(4)	O(5W)#13-K(3)-K(2)#2	103.7(8)
O(8)-V(7)-O(9)	94.3(3)	O(4)-K(3)-K(2)#2	160.5(4)
O(8)#1-V(7)-O(9)	157.9(4)	O(1)#2-K(3)-K(2)#2	44.63(16)
O(5)-V(7)-O(9)#1	102.2(4)	O(1)#15-K(3)-K(2)#2	44.63(16)
O(8)-V(7)-O(9)#1	157.9(4)	O(3)#17-K(3)-K(2)#2	42.7(2)
O(8)#1-V(7)-O(9)#1	94.3(3)	O(2W)#10-K(3)-K(2)#2	100.5(3)
O(9)-V(7)-O(9)#1	78.4(4)	O(2W)#9-K(3)-K(2)#2	100.5(3)
O(5)-V(7)-V(3)	104.0(4)	K(1)-K(3)-K(2)#2	72.76(14)
O(8)-V(7)-V(3)	42.4(2)	O(5W)#12-K(3)-K(3)#14	65.6(8)
O(8)#1-V(7)-V(3)	42.4(2)	O(5W)#13-K(3)-K(3)#14	65.6(8)
O(9)-V(7)-V(3)	132.3(2)	O(4)-K(3)-K(3)#14	46.6(3)
O(9)#1-V(7)-V(3)	132.3(2)	O(1)#2-K(3)-K(3)#14	140.80(17)
O(5)-V(7)-V(5)	109.1(4)	O(1)#15-K(3)-K(3)#14	140.80(17)
O(8)-V(7)-V(5)	128.6(2)	O(3)#17-K(3)-K(3)#14	110.3(3)
O(8)#1-V(7)-V(5)	128.6(2)	O(2W)#10-K(3)-K(3)#14	100.8(3)
O(9)-V(7)-V(5)	39.3(2)	O(2W)#9-K(3)-K(3)#14	100.8(3)
O(9)#1-V(7)-V(5)	39.3(2)	K(1)-K(3)-K(3)#14	134.3(2)
V(3)-V(7)-V(5)	146.90(9)	K(2)#2-K(3)-K(3)#14	152.9(2)
O(2P)-P(1)-O(2P)#1	69.4(8)	K(1)#9-O(2W)-K(3)#9	77.6(4)
O(2P)-P(1)-O(2P)#3	110.6(8)		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

- #1 $x, -y+1, z$ #2 $-x+3/2, -y+1/2, -z+1/2$
 #3 $-x+1, y, -z+1$ #4 $-x+1, -y, -z+1$ #5 $-x+1, -y+1, -z+1$
 #6 $x-1/2, y-1/2, z+1/2$ #7 $x-1, y, z$
 #8 $-x+1/2, -y+1/2, -z+1/2$ #9 $-x+3/2, -y+3/2, -z+1/2$
 #10 $-x+3/2, y-1/2, -z+1/2$ #11 $x, -y, z$
 #12 $x+1, y+1, z$ #13 $x+1, -y, z$ #14 $-x+2, -y+1, -z+1$
 #15 $-x+3/2, y+1/2, -z+1/2$ #16 $x+1/2, y+1/2, z-1/2$
 #17 $x+1, y, z$

Table 3. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for the expression: $\exp \{-2\pi^2(h_2a^*2U_{11} + \dots + 2hka^*b^*U_{12})\}$. E.s.ds are in parentheses.

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
V(1)	297(8)	132(7)	219(7)	-68(5)	-16(6)	23(5)
V(2)	184(7)	110(7)	344(8)	-18(5)	63(6)	37(5)
V(3)	406(13)	247(12)	206(11)	0	1(9)	0
V(4)	157(9)	246(11)	226(10)	0	-42(7)	0
V(5)	136(9)	189(10)	285(11)	0	49(8)	0
V(6)	750(30)	470(20)	790(30)	0	60(20)	0
V(7)	201(10)	203(10)	157(9)	0	70(7)	0
P(1)	98(16)	66(16)	95(16)	0	25(13)	0
O(1P)	80(40)	110(50)	200(50)	-10(40)	-30(40)	40(40)
O(2P)	180(50)	80(40)	150(50)	0(40)	70(40)	10(40)
O(1)	450(40)	230(30)	280(30)	-130(30)	20(30)	-80(30)
O(2)	760(90)	490(70)	160(50)	0	-100(50)	0
O(3)	230(40)	300(50)	310(50)	0	-90(40)	0
O(4)	130(40)	470(70)	640(80)	0	60(40)	0
O(5)	300(50)	510(70)	220(50)	0	100(40)	0
O(6)	270(30)	190(30)	520(40)	-30(30)	20(30)	100(30)
O(7)	550(100)	40(60)	630(100)	0	30(80)	0
O(8)	320(40)	230(30)	530(50)	140(30)	-70(30)	-50(30)
O(9)	420(40)	180(30)	340(40)	80(30)	-100(30)	-70(30)
O(10)	420(50)	340(40)	710(60)	240(40)	-320(40)	-160(30)
O(11)	560(50)	480(50)	420(40)	210(40)	310(40)	280(40)
O(12)	360(40)	300(40)	510(50)	180(30)	150(30)	140(30)
O(13)	640(50)	240(30)	200(30)	-70(30)	100(30)	-160(30)
K(1)	570(30)	630(30)	610(30)	0	230(20)	0
K(2)	800(40)	630(30)	770(30)	0	-40(30)	0
K(3)	660(30)	990(40)	760(30)	0	370(30)	0
O(1W)	660(80)	1370(150)	1230(120)	130(110)	210(80)	-250(90)
O(2W)	840(80)	960(100)	860(80)	120(80)	320(70)	-350(80)
O(3W)	920(80)	600(70)	860(80)	60(60)	-540(70)	180(60)
O(4W)	80(110)	2000(500)	1000(300)	0	-160(130)	0

Table 4. Torsion angles, in degrees. E.s.ds are in parentheses.

O(2P)-P(1)-O(1P)-O(2P)#5	180.001(2)	K(1)#6-V(6)-O(7)-K(1)#2	180.000(1)
O(2P)#1-P(1)-O(1P)-O(2P)#5	121.0(7)	K(2)-V(6)-O(7)-K(1)#2	90.09(14)
O(2P)#3-P(1)-O(1P)-O(2P)#5	-59.0(7)	O(11)#3-V(6)-O(7)-K(1)#6	93.5(2)
O(1P)#1-P(1)-O(1P)-O(2P)#5	-119.2(5)	O(11)-V(6)-O(7)-K(1)#6	-86.5(2)
O(1P)#3-P(1)-O(1P)-O(2P)#5	60.8(5)	O(10)-V(6)-O(7)-K(1)#6	-176.4(2)
O(2P)-P(1)-O(1P)-O(1P)#1	-60.8(5)	O(10)#3-V(6)-O(7)-K(1)#6	3.6(2)
O(2P)#1-P(1)-O(1P)-O(1P)#1	-119.8(5)	V(1)-V(6)-O(7)-K(1)#6	-131.21(10)
O(2P)#3-P(1)-O(1P)-O(1P)#1	60.2(5)	V(1)#3-V(6)-O(7)-K(1)#6	48.79(10)
O(2P)#5-P(1)-O(1P)-O(1P)#1	119.2(5)	V(2)#3-V(6)-O(7)-K(1)#6	-40.70(10)
O(1P)#3-P(1)-O(1P)-O(1P)#1	180.000(1)	V(2)-V(6)-O(7)-K(1)#6	139.30(10)
O(2P)-P(1)-O(1P)-O(2P)#1	59.0(7)	K(1)#2-V(6)-O(7)-K(1)#6	180.000(1)
O(2P)#3-P(1)-O(1P)-O(2P)#1	180.000(4)	K(2)-V(6)-O(7)-K(1)#6	-89.91(14)
O(2P)#5-P(1)-O(1P)-O(2P)#1	-121.0(7)	O(2)-V(3)-O(8)-V(7)	108.9(5)
O(1P)#1-P(1)-O(1P)-O(2P)#1	119.8(5)	O(8)#1-V(3)-O(8)-V(7)	1.0(5)
O(1P)#3-P(1)-O(1P)-O(2P)#1	-60.2(5)	O(12)-V(3)-O(8)-V(7)	-140.8(4)
O(2P)-P(1)-O(1P)-V(1)#1	178.4(6)	O(12)#1-V(3)-O(8)-V(7)	-73.9(6)
O(2P)#1-P(1)-O(1P)-V(1)#1	119.4(8)	V(1)#1-V(3)-O(8)-V(7)	-28.7(4)
O(2P)#3-P(1)-O(1P)-V(1)#1	-60.6(8)	V(1)-V(3)-O(8)-V(7)	-137.7(5)
O(2P)#5-P(1)-O(1P)-V(1)#1	-1.6(6)	V(4)-V(3)-O(8)-V(7)	-113.6(2)
O(1P)#1-P(1)-O(1P)-V(1)#1	-120.8(5)	O(2)-V(3)-O(8)-V(1)	-113.4(5)
O(1P)#3-P(1)-O(1P)-V(1)#1	59.2(5)	O(8)#1-V(3)-O(8)-V(1)	138.65(17)
O(2P)-P(1)-O(1P)-V(4)	-61.1(8)	O(12)-V(3)-O(8)-V(1)	-3.1(4)
O(2P)#1-P(1)-O(1P)-V(4)	-120.1(8)	O(12)#1-V(3)-O(8)-V(1)	63.8(6)
O(2P)#3-P(1)-O(1P)-V(4)	59.9(8)	V(7)-V(3)-O(8)-V(1)	137.7(5)
O(2P)#5-P(1)-O(1P)-V(4)	118.9(8)	V(1)#1-V(3)-O(8)-V(1)	109.0(3)
O(1P)#1-P(1)-O(1P)-V(4)	-0.3(8)	V(4)-V(3)-O(8)-V(1)	24.0(4)
O(1P)#3-P(1)-O(1P)-V(4)	179.7(8)	O(6)-V(2)-O(10)-V(1)	-154.5(8)
O(2P)#3-P(1)-O(2P)-O(2P)#1	180.000(3)	O(11)#3-V(2)-O(10)-V(1)	104.6(9)
O(1P)-P(1)-O(2P)-O(2P)#1	-60.2(5)	O(9)-V(2)-O(10)-V(1)	-52.2(9)
O(1P)#1-P(1)-O(2P)-O(2P)#1	-120.4(5)	O(13)-V(2)-O(10)-V(1)	24.5(15)
O(1P)#3-P(1)-O(2P)-O(2P)#1	59.6(5)	V(6)-V(2)-O(10)-V(1)	103.7(10)
O(1P)#5-P(1)-O(2P)-O(2P)#1	119.8(5)	V(5)-V(2)-O(10)-V(1)	-30.1(11)
O(2P)#1-P(1)-O(2P)-O(1P)#5	-119.8(5)	K(1)#2-V(2)-O(10)-V(1)	-149.7(10)
O(2P)#3-P(1)-O(2P)-O(1P)#5	60.2(5)	K(2)#4-V(2)-O(10)-V(1)	144.6(8)
O(1P)-P(1)-O(2P)-O(1P)#5	180.001(2)	O(6)-V(2)-O(10)-V(6)	101.8(4)
O(1P)#1-P(1)-O(2P)-O(1P)#5	119.8(8)	O(11)#3-V(2)-O(10)-V(6)	0.9(4)
O(1P)#3-P(1)-O(2P)-O(1P)#5	-60.2(8)	O(9)-V(2)-O(10)-V(6)	-155.9(4)
O(2P)#1-P(1)-O(2P)-O(1P)#1	120.4(5)	O(13)-V(2)-O(10)-V(6)	-79.2(9)
O(2P)#3-P(1)-O(2P)-O(1P)#1	-59.6(5)	V(5)-V(2)-O(10)-V(6)	-133.9(2)
O(1P)-P(1)-O(2P)-O(1P)#1	60.2(8)	K(1)#2-V(2)-O(10)-V(6)	106.5(4)
O(1P)#3-P(1)-O(2P)-O(1P)#1	180.000(1)	K(2)#4-V(2)-O(10)-V(6)	40.8(4)
O(1P)#5-P(1)-O(2P)-O(1P)#1	-119.8(8)	O(6)-V(2)-O(10)-K(1)#2	-4.7(4)
O(11)-V(1)-O(1)-K(3)#2	-150.7(14)	O(11)#3-V(2)-O(10)-K(1)#2	-105.6(4)
O(10)-V(1)-O(1)-K(3)#2	-63.2(14)	O(9)-V(2)-O(10)-K(1)#2	97.6(3)
O(12)-V(1)-O(1)-K(3)#2	113.2(14)	O(13)-V(2)-O(10)-K(1)#2	174.2(7)
O(8)-V(1)-O(1)-K(3)#2	29.2(15)	V(6)-V(2)-O(10)-K(1)#2	-106.5(4)
O(1P)#1-V(1)-O(1)-K(3)#2	165.1(10)	V(5)-V(2)-O(10)-K(1)#2	119.6(3)
V(6)-V(1)-O(1)-K(3)#2	-107.5(14)	K(2)#4-V(2)-O(10)-K(1)#2	-65.7(3)
V(3)-V(1)-O(1)-K(3)#2	70.6(14)	O(1)-V(1)-O(10)-V(2)	154.7(8)
K(2)-V(1)-O(1)-K(3)#2	-156.7(16)	O(11)-V(1)-O(10)-V(2)	-105.4(9)
K(1)#2-V(1)-O(1)-K(3)#2	-58.0(13)	O(12)-V(1)-O(10)-V(2)	-16.1(16)
O(11)-V(1)-O(1)-K(2)	6.0(4)	O(8)-V(1)-O(10)-V(2)	52.4(8)
O(10)-V(1)-O(1)-K(2)	93.5(4)	O(1P)#1-V(1)-O(10)-V(2)	-41.3(9)
O(12)-V(1)-O(1)-K(2)	-90.0(3)	V(6)-V(1)-O(10)-V(2)	-104.1(10)
O(8)-V(1)-O(1)-K(2)	-174.0(3)	V(3)-V(1)-O(10)-V(2)	33.3(10)
O(1P)#1-V(1)-O(1)-K(2)	-38.2(11)	K(2)-V(1)-O(10)-V(2)	-151.3(8)
V(6)-V(1)-O(1)-K(2)	49.3(3)	K(1)#2-V(1)-O(10)-V(2)	147.9(11)
V(3)-V(1)-O(1)-K(2)	-132.7(2)	O(1)-V(1)-O(10)-V(6)	-101.1(4)

K(1)#2-V(1)-O(1)-K(2)	98.7(3)	O(11)-V(1)-O(10)-V(6)	-1.3(4)
O(11)-V(1)-O(1)-K(1)#2	-92.7(3)	O(12)-V(1)-O(10)-V(6)	88.1(9)
O(10)-V(1)-O(1)-K(1)#2	-5.1(3)	O(8)-V(1)-O(10)-V(6)	156.6(4)
O(12)-V(1)-O(1)-K(1)#2	171.3(2)	O(1P)#1-V(1)-O(10)-V(6)	62.9(4)
O(8)-V(1)-O(1)-K(1)#2	87.3(3)	V(3)-V(1)-O(10)-V(6)	137.4(2)
O(1P)#1-V(1)-O(1)-K(1)#2	-136.8(9)	K(2)-V(1)-O(10)-V(6)	-47.1(4)
V(6)-V(1)-O(1)-K(1)#2	-49.4(2)	K(1)#2-V(1)-O(10)-V(6)	-108.0(4)
V(3)-V(1)-O(1)-K(1)#2	128.64(15)	O(1)-V(1)-O(10)-K(1)#2	6.8(4)
K(2)-V(1)-O(1)-K(1)#2	-98.7(3)	O(11)-V(1)-O(10)-K(1)#2	106.7(4)
O(12)#1-V(4)-O(3)-K(3)#7	-138.2(2)	O(12)-V(1)-O(10)-K(1)#2	-164.0(7)
O(12)-V(4)-O(3)-K(3)#7	138.2(2)	O(8)-V(1)-O(10)-K(1)#2	-95.5(4)
O(13)#5-V(4)-O(3)-K(3)#7	-42.2(2)	O(1P)#1-V(1)-O(10)-K(1)#2	170.8(4)
O(13)#3-V(4)-O(3)-K(3)#7	42.2(2)	V(6)-V(1)-O(10)-K(1)#2	108.0(4)
O(1P)#1-V(4)-O(3)-K(3)#7	88.3(12)	V(3)-V(1)-O(10)-K(1)#2	-114.6(3)
O(1P)-V(4)-O(3)-K(3)#7	-88.3(12)	K(2)-V(1)-O(10)-K(1)#2	60.8(4)
V(5)#5-V(4)-O(3)-K(3)#7	0.000(1)	O(1)-V(1)-O(11)-V(2)#3	-153.1(8)
V(3)-V(4)-O(3)-K(3)#7	180.000(1)	O(10)-V(1)-O(11)-V(2)#3	107.1(8)
O(12)#1-V(4)-O(3)-K(2)#8	41.8(2)	O(12)-V(1)-O(11)-V(2)#3	-50.4(8)
O(12)-V(4)-O(3)-K(2)#8	-41.8(2)	O(8)-V(1)-O(11)-V(2)#3	26.9(15)
O(13)#5-V(4)-O(3)-K(2)#8	137.8(2)	O(1P)#1-V(1)-O(11)-V(2)#3	10.4(7)
O(13)#3-V(4)-O(3)-K(2)#8	-137.8(2)	V(6)-V(1)-O(11)-V(2)#3	105.8(10)
O(1P)#1-V(4)-O(3)-K(2)#8	-91.7(12)	V(3)-V(1)-O(11)-V(2)#3	-28.7(10)
O(1P)-V(4)-O(3)-K(2)#8	91.7(12)	K(2)-V(1)-O(11)-V(2)#3	-146.6(10)
V(5)#5-V(4)-O(3)-K(2)#8	180.000(1)	K(1)#2-V(1)-O(11)-V(2)#3	146.2(7)
V(3)-V(4)-O(3)-K(2)#8	0.000(1)	O(1)-V(1)-O(11)-V(6)	101.1(5)
O(13)-V(5)-O(4)-K(3)	133.3(3)	O(10)-V(1)-O(11)-V(6)	1.3(4)
O(13)#1-V(5)-O(4)-K(3)	-133.3(2)	O(12)-V(1)-O(11)-V(6)	-156.2(4)
O(9)#1-V(5)-O(4)-K(3)	-43.9(3)	O(8)-V(1)-O(11)-V(6)	-78.8(9)
O(9)-V(5)-O(4)-K(3)	43.9(2)	O(1P)#1-V(1)-O(11)-V(6)	-95.4(5)
V(4)#5-V(5)-O(4)-K(3)	180.000(2)	V(3)-V(1)-O(11)-V(6)	-134.5(2)
V(2)-V(5)-O(4)-K(3)	89.0(3)	K(2)-V(1)-O(11)-V(6)	107.6(4)
V(2)#1-V(5)-O(4)-K(3)	-89.0(3)	K(1)#2-V(1)-O(11)-V(6)	40.4(4)
V(7)-V(5)-O(4)-K(3)	0.000(3)	O(1)-V(1)-O(11)-K(2)	-6.5(4)
O(8)-V(7)-O(5)-K(1)	-136.8(2)	O(10)-V(1)-O(11)-K(2)	-106.3(4)
O(8)#1-V(7)-O(5)-K(1)	136.8(2)	O(12)-V(1)-O(11)-K(2)	96.2(4)
O(9)-V(7)-O(5)-K(1)	-40.3(2)	O(8)-V(1)-O(11)-K(2)	173.6(7)
O(9)#1-V(7)-O(5)-K(1)	40.3(2)	O(1P)#1-V(1)-O(11)-K(2)	157.0(4)
V(3)-V(7)-O(5)-K(1)	180.000(1)	V(6)-V(1)-O(11)-K(2)	-107.6(4)
V(5)-V(7)-O(5)-K(1)	0.000(1)	V(3)-V(1)-O(11)-K(2)	117.9(3)
O(10)-V(2)-O(6)-K(1)#2	4.3(4)	K(1)#2-V(1)-O(11)-K(2)	-67.2(3)
O(11)#3-V(2)-O(6)-K(1)#2	91.6(3)	O(4)-V(5)-O(13)-V(4)#5	108.9(4)
O(9)-V(2)-O(6)-K(1)#2	-93.1(3)	O(13)#1-V(5)-O(13)-V(4)#5	-0.1(5)
O(13)-V(2)-O(6)-K(1)#2	-175.3(3)	O(9)#1-V(5)-O(13)-V(4)#5	-75.3(5)
V(6)-V(2)-O(6)-K(1)#2	48.3(3)	O(9)-V(5)-O(13)-V(4)#5	-141.4(4)
V(5)-V(2)-O(6)-K(1)#2	-134.88(18)	V(2)-V(5)-O(13)-V(4)#5	-138.2(5)
K(2)#4-V(2)-O(6)-K(1)#2	98.2(3)	V(2)#1-V(5)-O(13)-V(4)#5	-29.9(4)
O(11)#3-V(6)-O(7)-K(1)#2	-86.5(2)	V(7)-V(5)-O(13)-V(4)#5	-113.4(2)
O(11)-V(6)-O(7)-K(1)#2	93.5(2)	O(4)-V(5)-O(13)-V(2)	-112.9(5)
O(10)-V(6)-O(7)-K(1)#2	3.6(2)	O(13)#1-V(5)-O(13)-V(2)	138.05(17)
O(10)#3-V(6)-O(7)-K(1)#2	-176.4(2)	O(9)#1-V(5)-O(13)-V(2)	62.9(6)
V(1)-V(6)-O(7)-K(1)#2	48.79(10)	O(9)-V(5)-O(13)-V(2)	-3.2(4)
V(1)#3-V(6)-O(7)-K(1)#2	-131.21(10)	V(4)#5-V(5)-O(13)-V(2)	138.2(5)
V(2)#3-V(6)-O(7)-K(1)#2	139.30(10)	V(2)#1-V(5)-O(13)-V(2)	108.3(3)
V(2)-V(6)-O(7)-K(1)#2	-40.70(10)	V(7)-V(5)-O(13)-V(2)	24.8(4)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 x,-y+1,z #2 -x+3/2,-y+1/2,-z+1/2 #3 -x+1,y,-z+1 #4 -x+1,-y,-z+1 #5 -x+1,-y+1,-z+1
#6 x-1/2,y-1/2,z+1/2 #7 x-1,y,z #8 -x+1/2,-y+1/2,-z+1/2 #9 -x+3/2,-y+3/2,-z+1/2
#10 -x+3/2,y-1/2,-z+1/2 #11 x,-y,z #12 x+1,y+1,z #13 x+1,-y,z
#14 -x+2,-y+1,-z+1 #15 -x+3/2,y+1/2,-z+1/2 #16 x+1/2,y+1/2,z-1/2 #17 x+1,y,z