

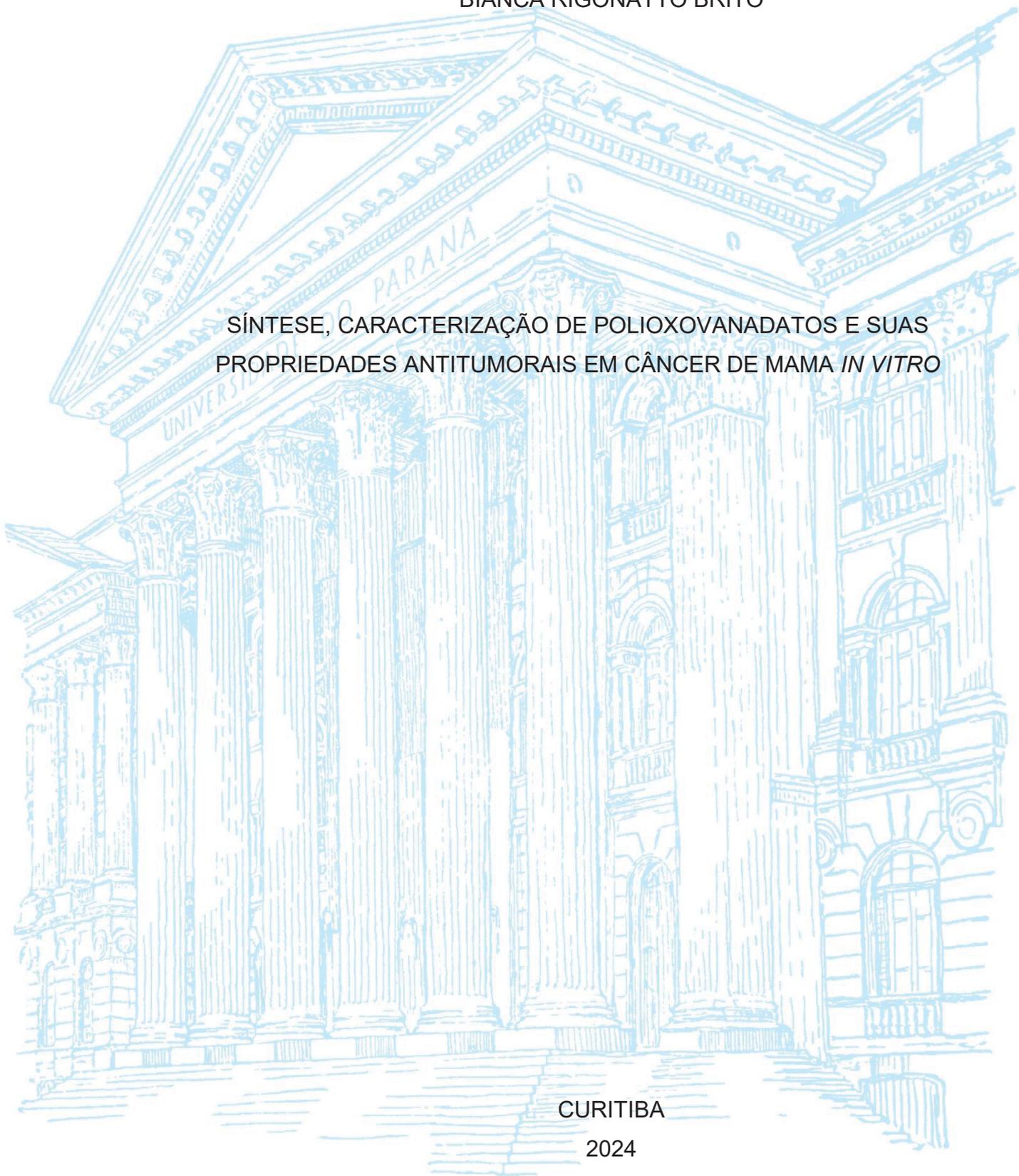
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA RIGONATTO BRITO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE POLIOXOVANADATOS E SUAS  
PROPRIEDADES ANTITUMORAIS EM CÂNCER DE MAMA *IN VITRO*

CURITIBA

2024



BIANCA RIGONATTO BRITO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE POLIOXOVANADATOS E SUAS  
PROPRIEDADES ANTITUMORAIS EM CÂNCER DE MAMA *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Giovana Gioppo Nunes

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Giseli Klassen

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Brito, Bianca Rigonatto

Síntese, caracterização de polioxovanadatos e suas propriedades antitumorais em câncer de mama In Vitro / Bianca Rigonatto Brito. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Giovana Gioppo Nunes

Coorientador: Giseli Klassen

1. Neoplasias da Mama. 2. Células MDA-MB-231. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Nunes, Giovana Gioppo. IV. Klassen, Giseli. V. Título.



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 QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BIANCA RIGONATTO BRITO** intitulada: **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE POLIOXOVANADATOS E SUAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS EM CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***, 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 mestra 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, 29 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 14:23:28.0

GIOVANA GIOPPO NUNES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/03/2024 14:00:45.0

TATIANA RENATA GOMES SIMÕES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/03/2024 08:47:35.0

MANUEL AURELIANO PEREIRA MARTINS ALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ALGARVE)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

Agradeço à minha família, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando amor incondicional. Ao meu pai Jorge, minha mãe Maria Lúcia e minha irmã Júlia.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Giovana Gioppo Nunes, por me guiar e me inspirar em toda essa trajetória, pelos ensinamentos, dedicação e confiança, que me ajudam cada dia mais a crescer profissionalmente.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Giseli Klassen, do Departamento de Patologia da UFPR, pelos conselhos, ensinamentos e orientação em toda a parte biológica do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá e a Profa. Dra. Jaísa Fernandes Soares por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Silvio Marques Zanata, do Departamento de Patologia da UFPR, por nos ajudar a todo momento e disponibilizar seu laboratório sempre que necessário.

Ao Me. Gabriel Barros Baptistella por sintetizar e caracterizar um dos compostos que reproduzi e apliquei nas células de câncer de mama, além de realizar análises de RPE, Difração de raios X de monocristal e por toda ajuda em todas as etapas do meu trabalho.

Agradeço à Karin Wurzer, pela realização e ajuda na interpretação dos resultados do ensaio de expressão gênica nas células de câncer de mama.

Ao mestre Anderson Fraga da Cruz por me auxiliar na análise e interpretação das imagens de microscopia eletrônica de varredura das células.

Agradeço à Dra. Kahoana Postal por toda a ajuda na aquisição e interpretação dos dados, principalmente com o **Bu<sup>†</sup>@V<sub>18</sub>**.

Aos professores doutores Manuel Aureliano Pereira Martins Alves (Departamento de Bioquímica - UAlg – Portugal) e Tatiana Renata Gomes Simões (PPGQ – UFPR) pelo aceite do convite para participar da banca de avaliação desta dissertação.

Ao professor Dr. Fábio Souza Nunes por avaliar o meu projeto de mestrado e o meu relatório anual.

À professora Dra. Tatiana Renata Gomes Simões e à Professora Dra. Carolina Camargo de Oliveira por se disponibilizarem a participar da minha banca de qualificação e por todas as contribuições.

Aos meus parceiros do laboratório, à Bianca Akemi, Heloísa de Souza Camilo, ao Gabriel Barros Baptistella, à Lorena Moreira Braga, ao Lucas Gian Fachini, à Francine Bertella, à Juliana Moraes Missina, Rúbia Camila Ronqui Bottini, à Karin Wurzer, Débora Radulski e ao João Vitor Bariani. Obrigada por toda a ajuda na minha pesquisa, pelo companheirismo e amizade.

Aos parceiros do grupo do Laboratório de Bioinorgânica, ao José, Eduardo, Sarita, Francielli, Renaldo e Everton. Obrigada por todo o apoio durante a minha trajetória.

Agradeço às técnicas Ma. Grazieli da Rocha e Franciane S. B. de Castro pelo treinamento nos espectrofotômetros na região do infravermelho e de espectroscopia eletrônica na região do UV-vis.

Aos alunos do grupo de Química de Materiais da UFPR, pelo treinamento no difratômetro de raios-X de pó.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela realização das análises de MEV e EDS.

Aos técnicos do Departamento de Química da UFPR, por todas as análises realizadas durante este trabalho, em especial à Ana Caroline Q. Marques pelas análises de  $^{51}\text{V}$  RMN.

Ao professor Dr. Ronny Rocha Ribeiro por realizar análises de RPE e me auxiliar sempre que necessário.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Química da UFPR pelas contribuições na minha formação acadêmica em Química.

Agradeço à UFPR por toda a infraestrutura e equipamentos disponibilizados que possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço ao Marcelino Câmara e à Fernanda Pinheiro por toda a ajuda e apoio em solucionar as dúvidas e me indicar o que precisava ser feito.

Agradeço aos órgãos de fomento que me proporcionaram realizar essa pesquisa, em especial à CAPES, pela bolsa de pesquisa, ao CNPq (Processos: 406946/2021- 3 e 309691/2021-4), à Fundação Araucária e ao demais órgãos de fomento à pesquisa pelos recursos necessários para a realização desse trabalho.

A todos os meus tios e tias, às minhas primas, aos meus padrinhos Elisabete e José Edinaldo.

Aos que se foram deste plano, mas que nunca sairão dos meus pensamentos e do meu coração. Aos meus avós paternos Francisca e José; aos meus avós maternos Amélia e João; ao meu tio Donizete; à minha tia Neide, que faleceu de câncer de mama, e foi um grande incentivo e motivação para eu continuar com este trabalho.

Agradeço às minhas amigas, que sempre estiveram comigo nos melhores e nos piores momentos, Andressa, Bruna, Isabela, Maritza, Caroline, Rebecca e Júlia.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes nesta etapa da minha vida, e me ajudaram a chegar até aqui.

Muito Obrigada!

“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as ideias”

(Marie Curie)

## RESUMO

Em 2022, o câncer de mama foi o mais diagnosticado e de maior mortalidade nas mulheres em todo o mundo. Os principais subtipos de câncer de mama invasivos são denominados Luminal A e B, HER2 positivo e triplo negativo. Os polioxovanadatos (POVs) são agregados poliatômicos carregados negativamente baseados em íons oxidovanádio(III), (IV), (V) ou de valência mista. Os estudos da atividade de POVs em câncer de mama ainda são escassos, no entanto, eles se mostraram muito promissores. Neste trabalho, foram sintetizados e avaliados em sua citotoxicidade frente a células de câncer de mama e normal os POVs de valência mista  $(\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18})$  e  $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$  ( $\text{MeCl}@V_{15}$ ), um hexavanadato(V) funcionalizado com álcool tripédico  $\text{H}_3\text{L}^{\text{Et}} = 1,1,1$ -tris(hidroxiometil)propano,  $(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N})_2[\text{V}_6\text{O}_{13}\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_2\text{CH}_3\}_2]$  ( $V_6\text{L}^{\text{Et}}$ ) e o ânion decavanadato,  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  ( $V_{10}$ ). Os POVs  $\text{MeCl}@V_{15}$  e  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  foram caracterizados por IR, análise elementar e DRX (de pó e monocristal). O  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$  foi obtido em 36% de rendimento e foi caracterizado por DRX de pó e por espectroscopias de IR, Raman, RMN de  $^{51}\text{V}$ , RPE, UV/Vis/NIR, MEV, EDS e análise elementar. A estrutura proposta consiste em um agregado pseudoesférico contendo 10  $\text{V}^{\text{IV}}$ : 8 $\text{V}^{\text{V}}$ , e pode ser visto como uma nova variante  $\{\text{V}_{18}\text{O}_{42}\}^{x-}$  descrito por Muller. O  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$  foi utilizado para preparar filmes homogêneos formados por partículas microesféricas de diâmetro inferior a 3  $\mu\text{m}$ . Todos os POVs foram caracterizados em solução (água ou acetona) e no meio de cultura RPMI por espectroscopias de RMN de  $^{51}\text{V}$  e RPE. Os POVs  $V_{10}$ ,  $\text{MeCl}@V_{15}$  e  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$  sofreram hidrólise parcial em RPMI, mesmo nos tempos iniciais, para formar oligovanadatos de menor nuclearidade ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  e  $\text{HVPO}_7^{3-}$  em equilíbrio ( $V_1+\text{PV}$ ),  $[\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7]^{3-}$  ( $V_2$ ),  $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$  ( $V_4$ ) and  $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$  ( $V_5$ )) após 72 h, enquanto que o  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  foi estável em solução recém preparada. A atividade citotóxica foi avaliada para a linhagem celular de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 e para a linhagem de células de tecido mamário normal HB4a, empregando o método MTT. Para as células de câncer, os valores de  $\text{IC}_{50}$  para os POVs  $V_{10}$ ,  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ ,  $\text{MeCl}@V_{15}$  e  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$ , nesta ordem, foram 2,53, 9,89, 17,2 e 17,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , já para as células normais foram de 0,966, 11,0, 1,02 e 9,77  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O ensaio *Wound Healing* para MDA-MB-231 foi realizado para  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  e  $V_{10}$ , por até 48h, nas concentrações de 4,50 e 8,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , para o primeiro POV, e de 0,450 e 0,900  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o segundo POV. Apenas o  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  foi capaz de diminuir a migração celular, apresentando na maior concentração uma maior área de lacuna (87,6% em 24h e 79,8% em 48h) quando comparado ao controle (66,9% em 24h e 48,8% em 48h). As imagens registradas por MEV mostram o aparecimento de vesículas nas células tratadas com os dois compostos nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio *Wound Healing*; no entanto, apenas o  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  causou mudança de morfologia da linhagem de câncer de fusiforme para ameboide. Os ensaios de expressão gênica como o  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  (17,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) nas células MDA-MB-231 resultou no aumento da expressão de um único gene, o RIPK3 em 15 vezes, sugerindo um mecanismo de necroptose na presença do POV. Visando futuros estudos *in vivo*, a citotoxicidade em células de câncer de mama murino (4T1) foi avaliada, obtendo um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 2,97  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os POVs mostraram-se promissores no tratamento de câncer de mama, destacando-se o  $V_6\text{L}^{\text{Et}}$  e o  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ , que terão seus estudos aprofundados.

Palavras-chave: Câncer de mama; POVs; estabilidade; citotoxicidade; MDA-MB-231; HB4a.

## ABSTRACT

In 2022, breast cancer was the most diagnosed and had the highest mortality rate in women worldwide. The main molecular subtypes of invasive breast cancer are Luminal A and B, HER2 positive and triple negative. Polyoxovanadates (POVs) are polyatomic aggregates negatively charged based on oxidovanadium(III), (IV), (V) or mixed valence ions. Although studies of POVs in breast cancer remain scarce, they have shown promising results. Herein, the mixed valence POVS  $(\text{Bu}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]$  (**Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>**) and  $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$  (**MeCl@V<sub>15</sub>**), the novel hexavanadate(V) and functionalized with the tripodal alcohol  $\text{H}_3\text{L}^{\text{Et}} = 1,1,1\text{-tris}(\text{hydroxymethyl})\text{propane}$ ,  $(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N})_2[\text{V}_6\text{O}_{13}\{\text{OCH}_2\}_3\text{CCH}_2\text{CH}_3\}_2]$  (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**) and the decavanadate anion,  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  (**V<sub>10</sub>**), were synthesized and evaluated in their cytotoxicity towards breast and normal cancer cell lines. The **MeCl@V<sub>15</sub>** and **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** POVs were characterized by IR, elemental analysis and XRD (powder and single crystal). **Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>** was obtained in 36% of yield and was characterized by powder XRD and by IR, Raman, <sup>51</sup>V NMR, EPR, UV/Vis/NIR, SEM, EDS and elemental analysis spectroscopy. The proposed structure consists of a pseudospherical aggregate containing  $10\text{V}^{\text{IV}}: 8\text{V}^{\text{V}}$  and can be seen as a new variant of the  $\{\text{V}_{18}\text{O}_{42}\}^{x-}$  framework described by Muller. The **Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>** was used to prepare homogeneous films formed from microsphere particles of less than 3 μm. All POVs were characterized in solution (water or acetone) and in RPMI medium by <sup>51</sup>V NMR and EPR spectroscopies. The POVs **V<sub>10</sub>**, **MeCl@V<sub>15</sub>** and **Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>** suffer partial hydrolysis in RPMI medium even at the initial time to form small oligovanadates ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  and  $\text{HVPO}_7^{3-}$  in equilibrium ( $\text{V}_1+\text{PV}$ ),  $[\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7]^{3-}$  (**V<sub>2</sub>**),  $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$  (**V<sub>4</sub>**) and  $\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$  (**V<sub>5</sub>**)) after 72 h, while **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** proved to be stable in the freshly prepared solution. The cytotoxicity activity against the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 and towards the normal breast tissue HB4a cell line was assessed by MTT. For cancer cells, the IC<sub>50</sub> values for POVs **V<sub>10</sub>**, **Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>**, **MeCl@V<sub>15</sub>** and **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**, in this order, were 2.53, 9.89, 17.2 and 17.6 μmol L<sup>-1</sup>, as for normal cells were 0.966, 11.0, 1.02 and 9.77 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. The Wound Healing assay for MDA-MB-231 was performed only for **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** and **V<sub>10</sub>**, for up to 48 h, at concentrations of 4.50 and 8.50 μmol L<sup>-1</sup> for the first POV, and 0.450 and 0.900 μmol L<sup>-1</sup> for the second POV. Only **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** was able to reduce cell migration, presenting a higher concentration of a larger gap area (87.6% in 24 h and 79.8% in 48 h) when compared to the control (66.9% in 24 h and 48.8% in 48 h). SEM images show the appearance of vesicles in cells treated with both compounds with the same concentrations used in the Wound Healing assay; however, only **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** caused a change in the morphology of the cancer cells, changing from fusiform to amoeboid form. Furthermore, the gene expression assay with **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** (17.6 μmol L<sup>-1</sup>) in the MDA-MB-231 cell line resulted in an increased expression only of the RIPK3 gene in 15 times, suggesting the mechanism of necroptosis in the presence of the POV. Aiming for future in vivo studies, cytotoxicity in murine breast cancer cells (4T1) was evaluated, obtaining an IC<sub>50</sub> value of 2.97 μmol L<sup>-1</sup>. POVs have shown promise in the treatment of breast cancer, with emphasis on **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** and **Bu<sup>+</sup>@V<sub>18</sub>**, which will be further studied.

Keywords: Breast cancer; POVs; stability; cytotoxicity; MDA-MB-231; HB4a.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – a) Estrutura do *bis*(maltolato)oxidovanádio(IV)<sup>24</sup> e do bis(etilmaltolato)oxidovanádio(IV)<sup>25</sup> que atuam como insulino-miméticos; (b) Estrutura do bis(ciclopentadienil)diclorovanádio(IV)<sup>25</sup>; (c) Estrutura do bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sulfato-oxidovanádio(IV)<sup>33</sup> (Metvan) anticancerígeno multi-segmentar promissor com atividade indutora de apoptose. ....25
- FIGURA 2 – (a) Estrutura de Keggin do heteropolioxometalato  $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ , onde M = Mo<sup>VI</sup> e X = P (b) estrutura de Lindqvist do isopolioxometalato  $[M_6O_{19}]^{n-}$ , onde M = Mo<sup>VI</sup>.<sup>40-42</sup> Código de cores: azul = Mo, vermelho = O, verde = P. ....26
- FIGURA 3 – Representação poliédrica de alguns POVs em diferentes geometrias e graus de nuclearidade das entidades  $\{VO_x\}$ , onde x = 4 a 6. Nesta representação, o vanádio ocupa o centro dos poliedros amarelos e o oxigênio, esferas vermelhas, ocupam os vértices. FONTE: Adaptado de Yu et.al. (2015).<sup>54</sup>.....27
- FIGURA 4 – Estruturas de hexavanadatos do tipo Lindqvist.<sup>62</sup> a) não funcionalizado  $[V_6O_{19}]^{2-}$ ,<sup>64</sup> (b) funcionalizado com dois ligantes trisalcóxido<sup>65</sup> e (c) POV mais complexo  $[V_6O_{13}((OCH_2)_3CCH_2OCH_2CCHN_3CH_2CO_2Et)_2]$  funcionalizado com ligantes trisalcóxidos conjugados a um éster com um derivado do triazol.<sup>62</sup> Código de cores: amarelo = V, azul = N, vermelho = O, cinza = C e branco = hidrogênio. ....29
- FIGURA 5 – Formação de polioxovanadatos na presença de ânions haleto  $[V_{15}O_{36}Cl]^{6-}$  (**V<sub>15</sub>**) e  $[V_{18}O_n(X)]^{n-}$ . FONTE: adaptado de Livage (2010).<sup>51</sup> .....30
- FIGURA 6 – (a) Representação estrutural das espécies mais comuns encontradas em soluções aquosas de decavanadato. Os centros de vanádio quimicamente equivalentes do V<sub>10</sub> são representados por V<sub>A</sub>, V<sub>B</sub> e V<sub>C</sub>. ....32
- FIGURA 7 - Gráfico relacionando à especiação e predominância das espécies de íons vanadato em duas concentrações e diferentes faixas de pH em meio aquoso com força iônica de 0,15 NaCl. FONTE: Petterson (1993), Crans (2005), Gumerova (2020) e Crans (2021).<sup>48,77-79</sup> .....33
- FIGURA 8– Equilíbrios gerados para os sistemas de **V<sub>14</sub>** e **V<sub>15</sub>** em solução aquosa 5,0 mmol L<sup>-1</sup> determinadas por RMN de <sup>51</sup>V e de RPE, com flecha indicando as espécies que tiveram a intensidade do seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.<sup>71,72</sup> .....34
- FIGURA 9 – Aplicações de POMs em 20 diferentes linhagens celulares tumorais (sublinhadas) e 3 não tumorais (não-sublinhadas) testadas no estudo de viabilidade

celular, relatadas até 2023. Os POVs estão representados em laranja. Onde, POMos = polioxomolibdatos, PoPds = polioxopaladatos, POTs= polioxotungstatos. Fonte: Aureliano (2023), uso livre para trabalhos científicos conforme disposto na licença CC BY 4.0 no sítio <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> . <sup>5</sup> .....	35
FIGURA 10 – Subtipos moleculares do câncer de mama. ....	37
FIGURA 11 – Polioxovanadatos estudados pelo grupo de pesquisa ao longo dos anos e suas aplicações relacionadas ao câncer. ....	41
FIGURA 12 – Conversão de MTT em um sal de formazan por meio da enzima oxidorreductase de células viáveis (reação química e placa de 96 poços).....	53
FIGURA 13 – Esquema da contagem de células na câmara de Neubauer. As células são contadas em um dos quadrantes circulados em azul, e o resultado é multiplicado por 10 <sup>4</sup> (quantidade de células em 1,00 mL). ....	54
FIGURA 14 – Esquema do plaqueamento das amostras na placa de 96 poços nas linhagens celulares MDA-MB-231, HB4a e 4T1 para <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> em (a), e nas linhagens MDA-MB-231 e HB4a para (b) <b>MeCl@V<sub>15</sub></b> , (c) <b>V<sub>10</sub></b> e (d) <b>Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub></b> . ....	55
FIGURA 15 – Esquema do ensaio de migração celular (Wound Healing). ....	58
FIGURA 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho registrado para o produto <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> e do pré-ligante <b>H<sub>3</sub>L<sup>Et</sup></b> .....	64
FIGURA 17 – Representação do ânion de (C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> N) <sub>2</sub> [V <sub>6</sub> O <sub>13</sub> {(OCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> } <sub>2</sub> ] ( <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> ) (a) modelo de bolas e bastão e (b) modelo de poliedros. (c) Empacotamento cristalino de <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> segundo os eixos. As linhas pontilhadas azuis representam as ligações de hidrogênio. ....	65
FIGURA 18 – (a) Difratoograma de raios X de pó registrado para <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> (linha laranja) e o simulado a partir do cristal de <b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b> (linha preta).....	66
FIGURA 19 – Espectro de absorção na região do infravermelho registrado para o produto <b>MeCl@V<sub>15</sub></b> .....	68
FIGURA 20 – Representação do ânion [V <sub>15</sub> O <sub>36</sub> (Cl)] <sup>6-</sup> em (a) bolas e bastão e (b) poliedros. Legenda: amarelo = vanádio, vermelho = oxigênio e verde = cloreto. (c) Difratoogramas de raio X de pó registrados para <b>MeCl@V<sub>15</sub></b> (linha verde) e o simulado a partir do cristal de (Me <sub>4</sub> N) <sub>6</sub> [V <sup>IV</sup> <sub>8</sub> V <sup>V</sup> <sub>7</sub> O <sub>36</sub> Cl] (linha preta). <sup>71</sup> .....	69
FIGURA 21 – Em (a) sólido preto obtido ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> V <sub>3</sub> O <sub>8</sub> ). Filmes em superfície de vidro (b) e de plástico (c) pela reação entre NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> , manitol e (Bu <sup>t</sup> ) <sub>4</sub> NI, obtidos pela evaporação lenta da solução mãe.....	70

FIGURA 22 – Difractogramas de raio X de pó registrados para $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$ (linha vermelha) e $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ (linha preta). Os (*) informam os picos de difração esperados para $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$ segundo a carta JCPDS n° 51-1733, principais picos do difratograma em $2\theta$ (°): 15,94; 20,00; 22,38; 25,64; 27,58; 32,14; 35,76; 39,46 e 45,84. ....	71
FIGURA 23 – Imagens de MEV para o sólido pulverizado do composto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ em aproximações de 3000x, 10000x e 50000x em (a) e para o composto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ na forma de filme não homogêneo (b) e na forma de filme homogêneo (c) em aproximações de 1000x, 5000x, 10000x e, 50000x. ....	72
FIGURA 24 – Espectro de EDS para o sólido pulverizado do composto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ , identificando os elementos presentes na amostra, onde (%) é a porcentagem relativa de cada elemento e ( $\sigma$ ) é o desvio padrão. ....	73
FIGURA 25 – Estruturas de bolas e bastão e poliedros do ânion $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]^{7-}$ presente em $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}^{\text{IV}}_{12}\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{42}]\cdot\text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . <sup>88,89</sup> Código de cores: Amarelo = V, vermelho = O, verde = I. ....	75
FIGURA 26 – Espectro de absorção na região do infravermelho em (a) e Espectro Raman utilizando laser de $\text{Ar}^+$ (514 nm) em (b) registrados para o produto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ . ....	76
FIGURA 27 – Espectro de RPE registrado a 77 K do produto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ em (a) para o sólido pulverizado, e em (b) em acetona, nas concentrações de 0,10 a 10 mmol L <sup>-1</sup> . ....	77
FIGURA 28 – Espectro de UV-Vis-NIR da solução em acetona do produto $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ em concentração de 1,00 mmol L <sup>-1</sup> . ....	80
FIGURA 29 – Equilíbrios das espécies de vanádio(V) gerados para os sistemas de $V_{10}$ e $V_6L^{\text{Et}}$ na concentração de 1,00 mmol L <sup>-1</sup> determinadas por RMN de <sup>51</sup> V em: (a) solução aquosa e (b) meio celular RPMI. Onde $V_1' = \text{HVO}_4^{2-}$ , $V_1 = \text{H}_2\text{VO}_4^-$ , $V_2 = \text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$ , $V_4 = \text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ , $V_5 = \text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$ e $V_{10} = [\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$ . Na figura estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de <sup>51</sup> V, segundo a literatura. <sup>48</sup> ....	82
FIGURA 30 – Espectro de RMN de <sup>51</sup> V de $V_{10}$ em D <sub>2</sub> O na concentração de 1,00 mmol L <sup>-1</sup> e pH inicial igual a 4 (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de 1,00 mmol L <sup>-1</sup> e pH inicial de 7,4 (direita). ....	83
FIGURA 31 – Espectro de RMN de <sup>51</sup> V de $V_6L^{\text{Et}}$ em D <sub>2</sub> O na concentração de 1,00 mmol L <sup>-1</sup> (esquerda). Espectro de RMN de <sup>51</sup> V de $V_6L^{\text{Et}}$ em meio celular RPMI na	

concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> (direita). Onde  $V_6 = [V_6O_{13}L^{Et}]^{2-}$ ,  $V_1' = HVO_4^{2-}$ ,  $V_1 = H_2VO_4^-$ ,  $V_1+PV = (H_2VO_4^- + HVPO_7^{3-})$ ,  $V_3 = HV_3O_{10}^{4-}$ ,  $V_4 = V_4O_{12}^{4-}$  e  $V_5 = V_5O_{15}^{5-}$ .. 84

FIGURA 32 – Equilíbrios das espécies de vanádio(V) gerados para os sistemas de **MeCl@V<sub>15</sub>** e **Butl@V<sub>18</sub>** determinadas por RMN de <sup>51</sup>V na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup>: (a) em solução aquosa ou dmso; (b) em meio celular RPMI. Onde  $V_1 = H_2VO_4^-$ ,  $V_{10} = [V_{10}O_{28}]^{6-}$ ,  $V_1+PV = (H_2VO_4^- + HVPO_7^{3-})$ ,  $V_2 = H_2V_2O_7^{2-}$ ,  $V_4 = V_4O_{12}^{4-}$  e  $V_5 = V_5O_{15}^{5-}$ . Na figura estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de <sup>51</sup>V, segundo a literatura.<sup>48</sup> ..... 85

FIGURA 33 – Espectro de RMN de <sup>51</sup>V de **MeCl@V<sub>15</sub>** em D<sub>2</sub>O na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> e pH inicial igual a 6,4 (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> (direita). Onde  $V_1 = H_2VO_4^-$ ,  $V_A, V_B$  e  $V_C = [H_2V_{10}O_{28}]^{4-}$ ,  $V_1+PV = (H_2VO_4^- + HVPO_7^{3-})$ ,  $V_2 = H_2V_2O_7^{2-}$ ,  $V_4 = V_4O_{12}^{4-}$  e  $V_5 = V_5O_{15}^{5-}$ ..... 86

FIGURA 34 – Espectro de RMN de <sup>51</sup>V de **Bu<sup>t</sup>l@V<sub>18</sub>** em dmso deuterado na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (direita). ..... 88

FIGURA 35 – Espectros de RPE registrados a 77 K do produto **MeCl@V<sub>15</sub>** em água (esquerda)<sup>151</sup> e em meio celular RPMI (direita) na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup>. 89

FIGURA 36 – Esquema dos POVs e linhagens celulares utilizados nos ensaios biológicos. .... 89

FIGURA 37 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações do POV em 24, em (a) para  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**) e (b) para  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$  (**V<sub>10</sub>**). Curva de IC<sub>50</sub> em (c) para **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e (d) para **V<sub>10</sub>**. As curvas de Tempo para **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e **V<sub>10</sub>** são apresentadas em (e) e (f), respectivamente. .... 92

FIGURA 38 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem HB4a em diferentes concentrações do POV em 24 h, em (a) para  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**) e (b) para  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$  (**V<sub>10</sub>**). Curva de IC<sub>50</sub> em (c) para **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e (d) para **V<sub>10</sub>**..... 93

FIGURA 39 – (a) Avaliação do efeito citotóxico do  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**) na linhagem 4T1 (em roxo). (b) Curva de IC<sub>50</sub>. .... 94

FIGURA 40 – Ensaio de Migração Celular Wound Healing na linhagem MDA-MB-231 controles e tratadas com **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** por 0, 24 e 48 h. Em (a) fotos dos cultivos celulares durante o experimento e em (b) gráfico gerado a partir da área das feridas, com o auxílio do software ImageJ (em porcentagem). .... 96

FIGURA 41 – Ensaio de Migração Celular Wound Healing na linhagem MDA-MB-231 controles e tratadas com **V<sub>10</sub>** por 0, 24 e 48h. Em (a) fotos dos cultivos celulares

durante o experimento e em (b) gráfico gerado a partir da área das feridas, com o auxílio do software ImageJ (demonstrado em porcentagem). .....	97
FIGURA 42 – Imagens de MEV para o produto $V_6L^{Et}$ , na linhagem celular MDA-MB-231 em aproximações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x, em (a) para os controles, (b) na concentração de $4,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) na concentração de $8,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	99
FIGURA 43 – Imagens de MEV para o produto $V_6L^{Et}$ , para a linhagem celular HB4a em aproximações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x, em (a) para os controles, (b) na concentração de $4,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) na concentração de $8,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	100
FIGURA 44 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o produto $V_{10}$ na linhagem celular MDA-MB-231, nas aproximações de 500x, 2500x e 5000x, em (a) para o controle, (b) na concentração de $0,450 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) na concentração de $0,900 \mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	101
FIGURA 45 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o produto $V_{10}$ na linhagem celular HB4a, nas aproximações de 500x, 2500x e 5000x, em (a) para o controle, (b) na concentração de $0,450 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) na concentração de $0,900 \mu\text{mol L}^{-1}$ . .....	102
FIGURA 46 – Mecanismos clássicos de morte celular. ....	103
FIGURA 47 – Avaliação da expressão relativa dos genes na linhagem MDA-MB-231 tratada com $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ do composto $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$ ( $V_6L^{Et}$ ). Em (a) gráfico da expressão relativa com todos os genes testados, e em (b) triplicata com o gene que apresentou superexpressão, RIPK3. ....	104
FIGURA 48 – Avaliação do efeito citotóxico do $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$ ( $V_6L^{Et}$ ) na linhagem MDA-MB-231(em vermelho), utilizando o valor de $IC_{50}$ de $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , nos tempos de 1, 2, 3 e 24 h em comparação com os respectivos controles. ....	106
FIGURA 49 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações do POV em 24 h, em (a) para $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ ( $MeCl@V_{15}$ ) e (b) para $(Bu_4N)_5[V_{18}O_{42}]$ ( $Bu^tI@V_{18}$ ). Curva de $IC_{50}$ em (c) para $MeCl@V_{15}$ e (d) para $Bu^tI@V_{18}$ . As curvas de Tempo para $MeCl@V_{15}^t$ e $Bu^tI@V_{18}$ são apresentadas em (e) e (f), respectivamente. ....	108
FIGURA 50 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem HB4a em diferentes concentrações do POV em 24 h, em (a) para $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$ ( $MeCl@V_{15}$ ) e (b) para $(Bu_4N)_5[V_{18}O_{42}]$ ( $Bu^tI@V_{18}$ ). Curva de $IC_{50}$ em (c) para $MeCl@V_{15}$ e (d) para $Bu^tI@V_{18}$ . ....	109

FIGURA 51 – Esquema dos POVs sintetizados ou reproduzidos neste trabalho e seus respectivos estudos biológicos. Legenda: amarelo = vanádio, vermelho = oxigênio, cinza = carbono, branco = hidrogênio, verde claro = cloreto e verde escuro = iodeto.

..... 112

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) em horas atribuídos ao ânion decavanadato ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em diferentes meios biológicos, temperaturas e pHs.....	33
TABELA 2 – Lista de reagentes e solventes utilizados em todas as etapas deste trabalho e especificações do fabricante .....	46
TABELA 3 – Componentes do meio de cultura RPMI de acordo com o fabricante, para 1,00 L de meio líquido.....	50
TABELA 4 – Iniciadores utilizados na quantificação gênica para a espécie Homo Sapiens.....	60
TABELA 5 – Atribuições tentativas das bandas de absorção registradas na região do infravermelho para o produto $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$ e do pré-ligante $\text{H}_3\text{L}^{\text{Et}}$ .....	63
TABELA 6 – Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV do produto $\text{MeCl@V}_{15}$ .....	68
TABELA 7 – Resultados da dosagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e vanádio para o produto $\text{Bu}^{\text{t}}\text{l@V}_{18}$ .....	74
TABELA 8 – Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV e Raman do produto $\text{Bu}^{\text{t}}\text{l@V}_{18}$ .....	76
TABELA 9 – Valores de $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) determinados para alguns polioxovanadatos nas linhagens celulares MDA-MB-231 e HB4a em 24h de incubação .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

POM	- Polioxometalato
POV	- Polioxovanadato
POV-VM	- Polioxovanadato de valência mista
V <sub>10</sub>	- Decavanadato
Des	- Dietilsulfato
DO	- Densidade óptica
IV	- Infravermelho
UV-Vis	- Ultravioleta e visível
DRX	- Difração de raios X
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	- Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RPE	- Ressonância paramagnética eletrônica
RPMI	- Meio celular (do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
IC <sub>50</sub>	- Concentração para reduzir o número de células viáveis para 50%
MDA-MB-231	- Linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário
Hb4a	- Linhagem celular luminal de epitélio mamário normal
4T1	- Linhagem tumoral de mama de camundongos BALB/cfCRH

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\nu$  – Estiramento vibracional

$\delta$  – Deformação vibracional

$\tau$  – Parâmetro tau

$\delta$  – Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
2.1	O VANÁDIO NA QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL E SEU POTENCIAL ANTICÂNCER.....	23
2.2	A DIVERSIDADE ESTRUTURAL DOS POLIOXOVANADATOS .....	25
2.3	QUÍMICA DE POLIOXOVANADATOS EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM MEIOS DE CULTURA .....	31
2.4	POLIOXOVANADATOS COMO POTENCIAIS AGENTES NA TERAPIA DO CÂNCER.....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	DESCRIÇÃO DA APARELHAGEM E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS .....	43
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
4.1.2	Espectroscopia por Dispersão de elétrons (EDS).....	43
4.1.3	Análise Elementar .....	43
4.1.4	Análise Termogravimétrica .....	44
4.1.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	44
4.1.6	Espectroscopia de espalhamento Raman .....	44
4.1.7	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível e infravermelho próximo (UV/Vis/NIR).....	44
4.1.8	Difração de raios X de pó (DRX de pó).....	45
4.1.9	Difração de raios X de monocristal (DRX-monocristal) .....	45
4.1.10	Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) .....	45
4.1.11	Ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>51</sup> V).....	46
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	46

4.3	SÍNTESES.....	47
4.3.1	Preparação do hexavanadato ( $V_6L^{Et}$ ) .....	47
4.3.2	Preparação dos polioxovanadatos de valência mista .....	48
4.3.3	Preparação do POV-VM contendo cloreto encapsulado ( $MeCl@V_{15}$ ).....	48
4.3.4	Preparação do POV-VM contendo iodeto encapsulado ( $Bu^I@V_{18}$ ).....	48
4.4	ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO: AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS EM CONDIÇÕES QUE SIMULAM OS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	49
4.5	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA .....	49
4.5.1	Preparo do material para ensaios biológicos .....	49
4.5.2	Preparo das soluções estoque para os ensaios biológicos.....	51
4.5.2.1	Solução do decavanadato ( $V_{10}$ ).....	51
4.5.2.2	Solução do hexavanadato ( $V_6L^{Et}$ ).....	51
4.5.2.3	Solução do pentadecavanadato ( $MeCl@V_{15}$ ) .....	51
4.5.2.4	Solução do octadecavanadato ( $Bu^I@V_{18}$ ) .....	52
4.5.3	Linhagens celulares empregadas .....	52
4.5.4	Ensaio de viabilidade mitocondrial.....	52
4.5.5	Determinação da curva de tempo na concentração de $IC_{50}$ .....	57
4.6	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – WOUND HEALING .....	57
4.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM CELULAR MDA-MB-231.....	58
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS LINHAGENS CELULARES MDA-MB-231 E HB4A.....	61
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1	PREPARAÇÃO DO HEXAVANADATO $V_6L^{Et}$ .....	63
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIOXOVANADATOS DE VALÊNCIA MISTA .....	67
5.2.1	Preparação do pentadecavanadato $MeCl@V_{15}$ .....	67

5.2.2	Preparação do POV-VM contendo iodeto encapsulado e tetrabutylamônio como contraíon .....	69
5.2.2.1	Difração de raios X de pó (PDRX) .....	70
5.2.2.2	Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	71
5.2.2.3	Caracterização por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) .....	73
5.2.2.4	Determinação quantitativa dos teores de C, H, N e V .....	74
5.2.2.5	Caracterização por espectroscopias vibracionais de infravermelho (IV) e Raman .....	75
5.2.2.6	Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) .....	77
5.2.2.7	Caracterização de <b>Bu<sup>4</sup>@V<sub>18</sub></b> em solução por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>51</sup> V) .....	78
5.2.2.8	Caracterização de <b>Bu<sup>4</sup>@V<sub>18</sub></b> por espectroscopia eletrônica (UV-vis-NIR) ...	79
5.3	ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO E NO MEIO DE CULTURA RPMI .....	81
5.3.1	Polioxovanadatos (POVs) de vanádio(V).....	81
5.3.2	Polioxovanadatos de valência mista (POVs-VM).....	85
5.4	ENSAIOS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA .....	89
5.4.1	Polioxovanadatos (POVs) de vanádio(V).....	90
5.4.1.1	Ensaio de citotoxicidade .....	90
5.4.1.2	Ensaio de migração celular (Wound Healing) .....	94
5.4.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura das células .....	98
5.4.1.4	Avaliação da expressão gênica na linhagem celular MDA-MB-231 .....	102
5.4.1.5	Ensaio de citotoxicidade com variação de tempo de incubação.....	106
5.4.2	Polioxovanadatos de Valência Mista (POVs-VM) .....	107
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>
	<b>ANEXO 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES .....</b>	<b>131</b>
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>132</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dados recentes mostram que o câncer está entre as três principais causas de morte em seres humanos na faixa de 30 a 69 anos, o que faz com que ele seja um problema de importância mundial.<sup>1</sup> Impactos como exposição a poluentes, hábitos de vida e consumo de comidas industrializadas, tornam o câncer uma das doenças com maior incidência e mortalidade.<sup>2</sup>

Em 2022, o número de novos casos de câncer no mundo foi de 18,7 milhões, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, entre os quais o câncer de mama foi o mais diagnosticado e o mais mortal entre as mulheres.<sup>1</sup> No Brasil, estima-se que ocorrerão 704 mil novos casos de câncer para o triênio de 2023 a 2025, dentre eles, o câncer de mama é o de maior incidência, seguido por câncer de próstata, cólon e reto, pulmão e estômago.<sup>2</sup>

O câncer de mama é uma doença heterogênea com grande variação em suas características morfológicas e em sua resposta clínica.<sup>2</sup> Ele é subdividido em quatro subtipos: Luminal A e Luminal B, que são menos agressivos (tratados por terapia hormonal), HER2 positivo (tratado com anticorpo trastuzumab) e triplo negativo, o mais agressivo (tratado com quimioterápicos).<sup>3,4</sup>

Muitos estudos têm sido desenvolvidos com diversos compostos no intuito de desenvolver quimioterápicos mais eficientes, com menos efeitos colaterais e que possam diminuir a resistência às múltiplas drogas. Uma classe de compostos que vem ganhando destaque nas últimas duas décadas nas áreas biomédicas são os polioxometalatos (POMs). Os polioxovanadatos (POVs) são polioxometalatos baseados em vanádio, que em geral, apresentam um melhor efeito inibitório sobre células de câncer humanas do que outros POMs. No entanto, a maioria absoluta dos estudos foram realizados com o ânion decavanadato, permanecendo os outros membros desta classe praticamente inexplorados.<sup>5</sup>

Neste trabalho, foi avaliada a atividade anticâncer de mama *in vitro* de um hexavanadato de vanádio(V), do decavanadato de sódio e de dois polioxovanadatos de valência mista (POVs-VM). O V<sub>10</sub> foi utilizado para comparação por ser o POV mais estudado em suas atividades biológicas, mas que permanece pouco explorado como quimioterápico contra o câncer de mama na sua forma mais agressiva, o subtipo triplo negativo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O VANÁDIO NA QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL E SEU POTENCIAL ANTICÂNCER

O vanádio participa da composição de mais de 60 minerais, é o quinto metal de transição mais abundante na crosta terrestre e pode ser encontrado em corpos aquáticos, com destaque para os altos níveis do elemento em alguns depósitos de água doce.<sup>6</sup> O elemento está presente no sítio ativo de algumas enzimas, e pode ser encontrado em seres vivos como algas, bactérias diazotróficas, fungos do gênero *Amanita*, vermes marinhos *polychaeta* e em *ascídias* e *tunicatos*.<sup>7</sup>

Quimicamente, o vanádio exibe uma extensa faixa de estados de oxidação, de +5 a -3, que são facilmente interconvertidos entre si, visto que nos maiores estados de oxidação ele é um excelente ácido de Lewis. Os múltiplos estados de oxidação do vanádio, seu caráter de ácido de Lewis, boa oxofilicidade e susceptibilidade a sofrer reações de hidrólise, o tornam altamente versátil e aplicável em catálise, química de materiais e biologia.<sup>8</sup>

O vanádio está disponível para organismos vivos na forma do par redox  $H_2VO_4^- / VO_2^+$  ( $[VO(OH)_2]^{2+}$ ), na presença de agentes redutores.<sup>7,9,10</sup> Ele é capaz de interagir com as membranas biológicas e de interferir em vários processos enzimáticos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.<sup>11</sup> Devido à similaridade entre os ânions ortovanadato ( $VO_4^{3-}$ ) e fosfato ( $PO_4^{3-}$ ),<sup>8</sup> o ortovanadato é interiorizado nas células por meio do sistema de transporte de fosfato, e acaba participando em processos metabólicos do corpo através da formação de complexos com macromoléculas. Exemplos incluem a ligação de vanadatos a diversas proteínas tirosinas fosfatases, lisozimas da clara de ovo de galinha e a formação de complexos adenosina divanadatos.<sup>12</sup>

Sua essencialidade ainda não foi comprovada em organismos superiores, mesmo que seja encontrado em quantidades apreciáveis. A literatura relaciona a deficiência de vanádio a problemas funcionais em alguns organismos, como aves, roedores, peixes e animais inferiores, mesmo que ainda não tenha sido identificado um papel biológico específico para o elemento.<sup>13</sup> Atualmente sabe-se que a quantidade presente do vanádio em um ser humano adulto é cerca de 1,0 mg, portanto seus efeitos biológicos e fisiológicos são bastante estudados.<sup>14</sup>

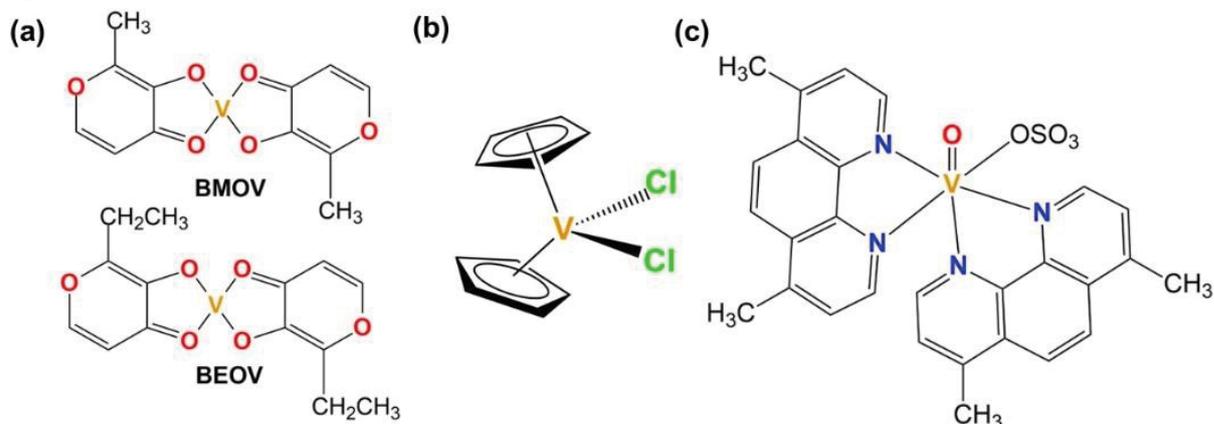
Em pequenas quantidades o vanádio é bem aceito pelos organismos, contudo, quando há excesso do metal no corpo, ele pode se tornar tóxico.<sup>15</sup> Concentrações consideradas seguras devem ser menores que  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , enquanto concentrações acima de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  são consideradas tóxicas para uso a longo prazo. Ainda existe muita controvérsia na literatura, pois a toxicidade de um determinado composto de vanádio é influenciada pela estrutura química do composto, estados de oxidação, além da via de administração, tempo de exposição, dosagem e tipo do organismo estudado.<sup>15</sup>

O interesse na química medicinal do vanádio surgiu em 1939 e cresceu lentamente até 1970, no entanto este quadro mudou rapidamente neste século.<sup>8</sup> Só nos últimos 3 anos, a média do número de artigos científicos publicados (~200 por ano) foi aproximadamente 5 vezes maior do que em 2000 (48 artigos), considerando os termos de busca “*vanadium and medicine*” no sítio *Web of Science*.<sup>16</sup>

Ao longo do desenvolvimento da química medicinal do vanádio, os estudos das ações farmacológicas têm sido descritos em conjunto com a avaliação da toxicidade, que é altamente dependente das características físico-químicas, estruturais e de reatividade dos compostos.<sup>17</sup> Entre elas, a descoberta da ação insulinomimética,<sup>18</sup> antitumoral,<sup>19</sup> anti-hiperlipidêmica,<sup>20</sup> antibacteriana,<sup>21</sup> anti-hipertensiva<sup>22</sup> e antiobesidade,<sup>23</sup> tem estimulado a pesquisa da química de coordenação do elemento.<sup>8</sup> Bons exemplos são os complexos que atuam como insulinomiméticos, como o *bis*(maltolato)oxidovanádio(IV)<sup>24</sup>, o *bis*(etil maltolato)-oxidovanádio(IV)<sup>25</sup> (FIGURA 1a) e os peróxido-vanadatos. Estes compostos estimulam a metabolização da glicose nas células e a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos), reduzindo os níveis de glicose no sangue.<sup>24</sup>

Os efeitos antitumorais do vanádio têm sido estudados *in vitro* usando células tumorais, como as células de hepatocarcinoma, osteossarcoma, carcinoma testicular, mama, ovário, renal, pulmonar, entre outras.<sup>26-29</sup> Entre os sais inorgânicos, o sulfato de oxidovanádio(IV) tem sido considerado um agente de baixa toxicidade eficaz para a quimioprevenção de câncer de mama em ratos.<sup>30</sup> Em estudos *in vivo*, esses compostos abrangem complexos de vanádio contendo ligantes orgânicos, que são ativos contra tumores animais, como certos tipos de leucemia, com atividade comparável à da cisplatina.<sup>31,32</sup>

FIGURA 1 – a) Estrutura do *bis*(maltolato)oxidovanádio(IV)<sup>24</sup> e do *bis*(etilmaltolato)oxidovanádio(IV)<sup>25</sup> que atuam como insulínomiméticos; (b) Estrutura do *bis*(ciclopentadienil)diclorovanádio(IV)<sup>25</sup>; (c) Estrutura do *bis*(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sulfato-oxidovanádio(IV)<sup>33</sup> (Metvan) anticancerígeno multi-segmentar promissor com atividade indutora de apoptose.



Os compostos de maior destaque na ação antitumoral são os vanadocenos (FIGURA 1b),<sup>25</sup> peroxidovanadatos, oxidovanadatos(IV) como o Metvan (FIGURA 1c)<sup>33</sup> vanádio-peróxido-betaínas<sup>34</sup> e polioxovanadatos<sup>35</sup>. Estes compostos têm apresentado atividade de redução dos tumores *in vivo* e *in vitro*, em várias linhagens celulares tumorais destacando-se a inibição da proliferação celular e a indução de apoptose em uma grande gama de concentrações testadas.<sup>25,33–35</sup> Por exemplo, o Metvan apresenta atividade citotóxica e indutora de apoptose contra 25 linhagens de câncer humano, como a leucemia, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, tumores sólidos derivados de câncer de mama, ovário, próstata e testículos.<sup>33</sup>

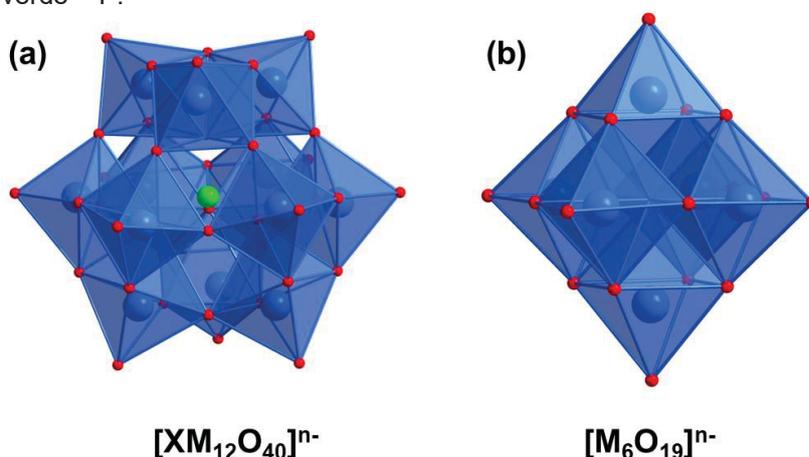
O efeito anticarcinogênico do vanádio foi ainda estudado por Ray *et al.*<sup>36</sup> na carcinogênese mamária de ratos, demonstrando efeitos como a supressão da proliferação celular, a indução de apoptose e a redução de ligações cruzadas de proteínas de DNA, sugerindo uma possível reparação rápida do DNA. Na detecção do câncer de mama por fluorescência de raios X, o vanádio se acumula em maior extensão no tecido mamário canceroso do que no tecido normal, o que faz com que compostos desse metal possam ser utilizados como possíveis agentes de imagem tumoral.<sup>37</sup>

## 2.2 A DIVERSIDADE ESTRUTURAL DOS POLIOXOVANADATOS

Polioxometalatos (POMs) são agregados poliatômicos carregados negativamente em que os cátions (geralmente V<sup>IV</sup>, V<sup>V</sup>, Nb<sup>V</sup>, Ta<sup>V</sup>, Mo<sup>VI</sup>, Mo<sup>V</sup> ou W<sup>VI</sup>)

estão comumente em estados de oxidação elevado, com configurações eletrônicas  $d^0$  ou  $d^1$ , e são ligados por átomos de oxigênio via pontes óxido ( $O^{2-}$ ) e ocasionalmente por pontes hidróxido ( $OH^-$ ).<sup>38,39</sup> Eles são divididos em heteropolioxometalatos (fórmula geral  $[X_xM_mO_y]^{n-}$ , onde X é o heteroátomo), apresentando um ou mais heteroátomos (como P, Cu, Si, Ge, As, etc.), e isopolioxometalatos (fórmula geral  $[M_mO_y]^{n-}$ ), que não apresentam heteroátomos (FIGURA 2).<sup>38-40</sup>

FIGURA 2 – (a) Estrutura de Keggin do heteropolioxometalato  $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ , onde  $M = Mo^{VI}$  e  $X = P$  (b) estrutura de Lindqvist do isopolioxometalato  $[M_6O_{19}]^{n-}$ , onde  $M = Mo^{VI}$ .<sup>40-42</sup> Código de cores: azul = Mo, vermelho = O, verde = P.



Esses agregados poliatômicos podem ter sua polaridade, potencial redox e estabilidade sob condições fisiológicas, moduladas de acordo com a composição, escolha do metal e arranjo estrutural. Esses aspectos os tornam aptos a serem utilizados em diversas aplicações, especialmente como candidatos a medicamentos farmacêuticos de baixo custo, com destaque para as atividades antivirais e antitumorais.<sup>38</sup> A importância biomédica dessa classe de compostos, baseia-se principalmente na sua interação com enzimas como a fosfatase alcalina, fatores de crescimento e constituintes celulares.<sup>43-45</sup>

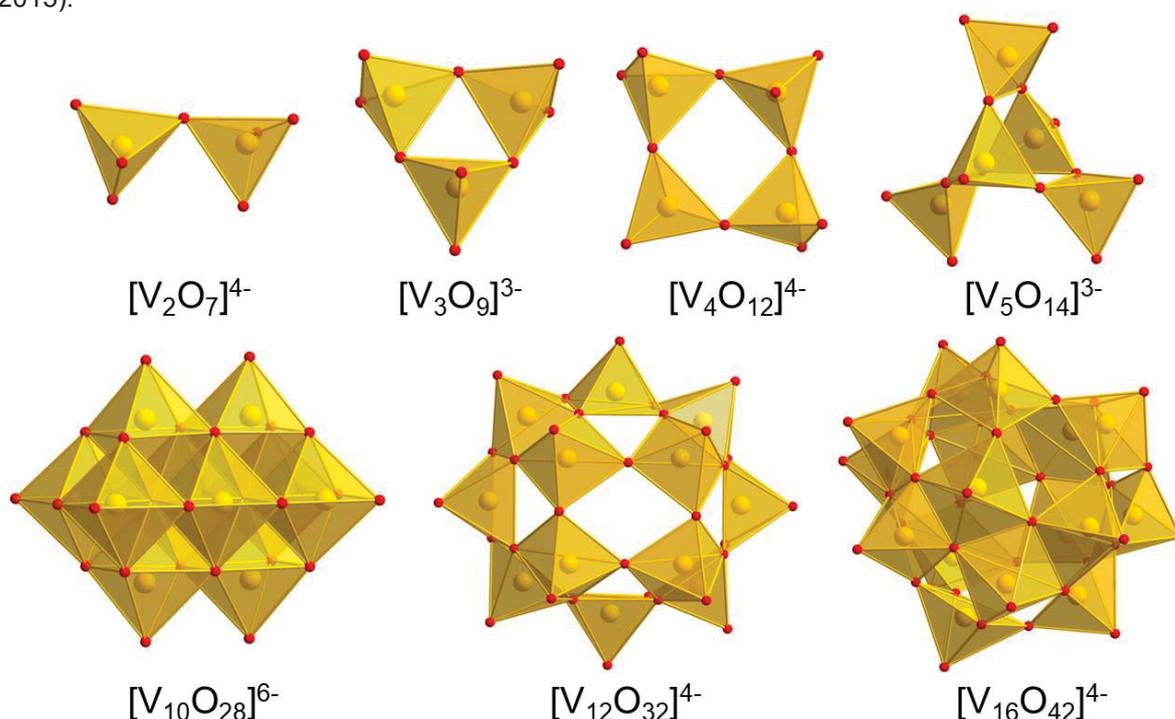
Os POMs são geralmente caracterizados no estado sólido por difração de raios X de monocristal, gerando informações estruturais que são utilizadas como base para a elucidação da estrutura em solução. A forma do POM determinada na estrutura cristalina nem sempre é a mais abundante em solução, pois os agregados podem ser protonados, participar de equilíbrios de especiação ou sofrer processos redox.<sup>46-48</sup> O número crescente de aplicações de POMs em solução, justifica a necessidade de analisar a relação entre o comportamento estrutural do agregado no estado sólido e

em solução.<sup>48</sup> Algumas análises espectroscópicas (eletrônica, vibracional, absorção de raios-X, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa, eletroquímica) permitem identificar e quantificar essas espécies presentes em solução.<sup>48</sup>

Os Polioxovanadatos (POVs) são polioxometalatos baseados em íons de vanádio(III), (IV), (V) ou ainda podem apresentar valência mista entre os diferentes estados de oxidação. Eles são caracterizados pela diversidade estrutural, pois apresentam grupos oxidovanádio terminais (V=O) e oxido em ponte (V–O–V), com centros de vanádio, que combinam esferas de coordenação tetraédricas (VO<sub>4</sub>), piramidais de base quadrada (VO<sub>5</sub>) e octaédricas (VO<sub>6</sub>).<sup>49</sup>

Estes compostos possuem alta versatilidade estrutural devido ao número de geometrias que podem ser adotadas pelo vanádio, formando diversas estruturas com múltiplas aplicações, como na catálise, na química ambiental, em ciência dos materiais, bioquímica, biologia, farmacologia e na química medicinal.<sup>50–52</sup> Na FIGURA 3, têm-se a representação poliédrica de polioxovanadatos totalmente oxidados em diferentes modos de coordenação.<sup>53</sup>

FIGURA 3 – Representação poliédrica de alguns POVs em diferentes geometrias e graus de nuclearidade das entidades {VO<sub>x</sub>}, onde x = 4 a 6. Nesta representação, o vanádio ocupa o centro dos poliedros amarelos e o oxigênio, esferas vermelhas, ocupam os vértices. FONTE: Adaptado de Yu et.al. (2015).<sup>54</sup>



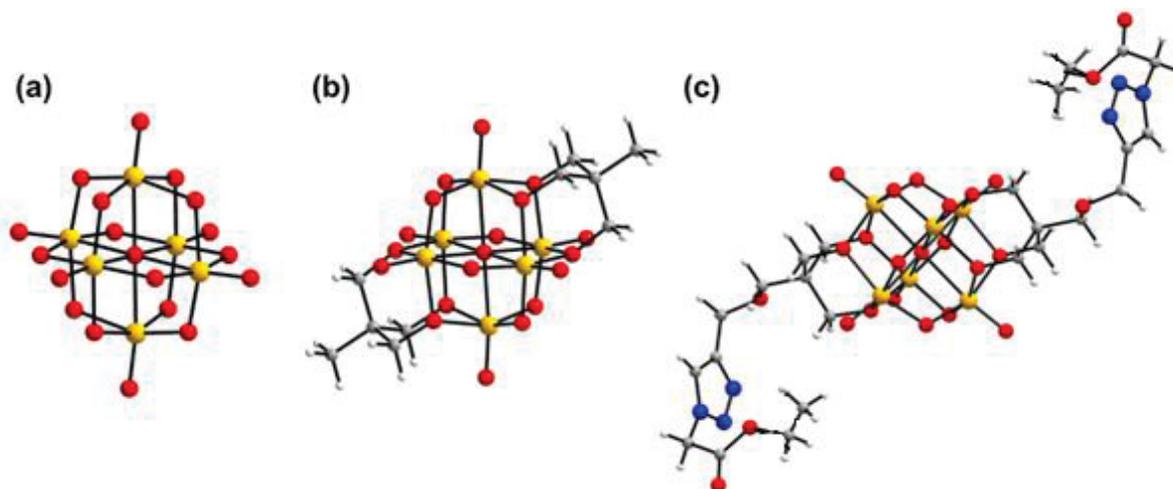
Os POVs geralmente são produzidos pela automontagem por meio de protonações consecutivas de vanadatos menores ou de reações de condensação em meio ácido em condições hidrotérmicas.<sup>51,55</sup> Dentre os polioxidoânions conhecidos o mais estável e mais estudado em termos de reatividade, especiação e interações com meio biológico é o ânion decavanadato,  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ ,  $V_{10}$ , apresentado na FIGURA 3. O  $V_{10}$  tem demonstrado atividades antidiabética, antibacteriana, antitumorais<sup>56</sup> e em estudos de cristalografia de proteínas, proporcionando compostos modelos para o entendimento das interações entre os POMs e proteínas.<sup>57,58</sup>

O  $V_{10}$  é um ácido poliprótico, melhor descrito como  $[H_xV_{10}O_{28}]^{6-x}$ , que varia seu grau de protonação de 0 a 6 em função do pH do meio e dos seus contraíons, podendo existir com uma carga de  $-6$  a  $-3$  em meio aquoso.<sup>59</sup> Sua estrutura é composta por 10 átomos de vanádio e 28 átomos de oxigênio, que são arranjados em unidades  $VO_6$  em geometria octaédrica distorcida pela presença dos grupos oxido ( $O^{2-}$ ) terminais, em ponte dupla, tripla ou sêxtupla. O  $V_{10}$  é o maior POV contendo apenas ligações aresta-aresta entre as 10 unidades octaédricas  $\{VO_6\}$ .<sup>51,60</sup> O arranjo cristalino e a reatividade do  $V_{10}$  são influenciados pelo grau de protonação e pela posição dos hidrogênios.<sup>61</sup>

O  $V_{10}$  ocupa um lugar de destaque entre os POVs por ser o agregado de vanádio(V) mais comum e estável em meio ácido. Os diferentes modos de interação do  $V_{10}$  são determinados pelo caráter hidrofílico ou lipofílico do contra íon, que pode ainda modular a interação com membranas celulares.<sup>59</sup>

Os hexavanadatos,  $[V_6O_{19}]^{2-}$ ,  $V_6$ , FIGURA 4a, podem ser vistos como uma estrutura compacta composta por seis grupos oxidovanádio(V) em geometria octaédrica, unidos por grupos óxido em ponte. Os  $V_6$  possuem alta estabilidade termodinâmica e redox, além de serem facilmente funcionalizados e derivatizados em solução pela substituição dos grupos oxido em ponte dupla.<sup>62</sup> A funcionalização dos  $V_6$  com ligantes trisalcóxidos (FIGURA 4b), gera agregados mais lipossolúveis, que dependendo da função do grupo terminal, ainda podem ser modificados com outras moléculas orgânicas, como exemplificado na FIGURA 4c.<sup>62,63</sup>

FIGURA 4 – Estruturas de hexavanadatos do tipo Lindqvist.<sup>62</sup> a) não funcionalizado  $[V_6O_{19}]^{2-}$ ,<sup>64</sup>(b) funcionalizado com dois ligantes trisalcóxido<sup>65</sup> e (c) POV mais complexo  $[V_6O_{13}((OCH_2)_3CCH_2OCH_2CCHN_3CH_2CO_2Et)_2]$  funcionalizado com ligantes trisalcóxidos conjugados a um éster com um derivado do triazol.<sup>62</sup> Código de cores: amarelo = V, azul = N, vermelho = O, cinza = C e branco = hidrogênio.

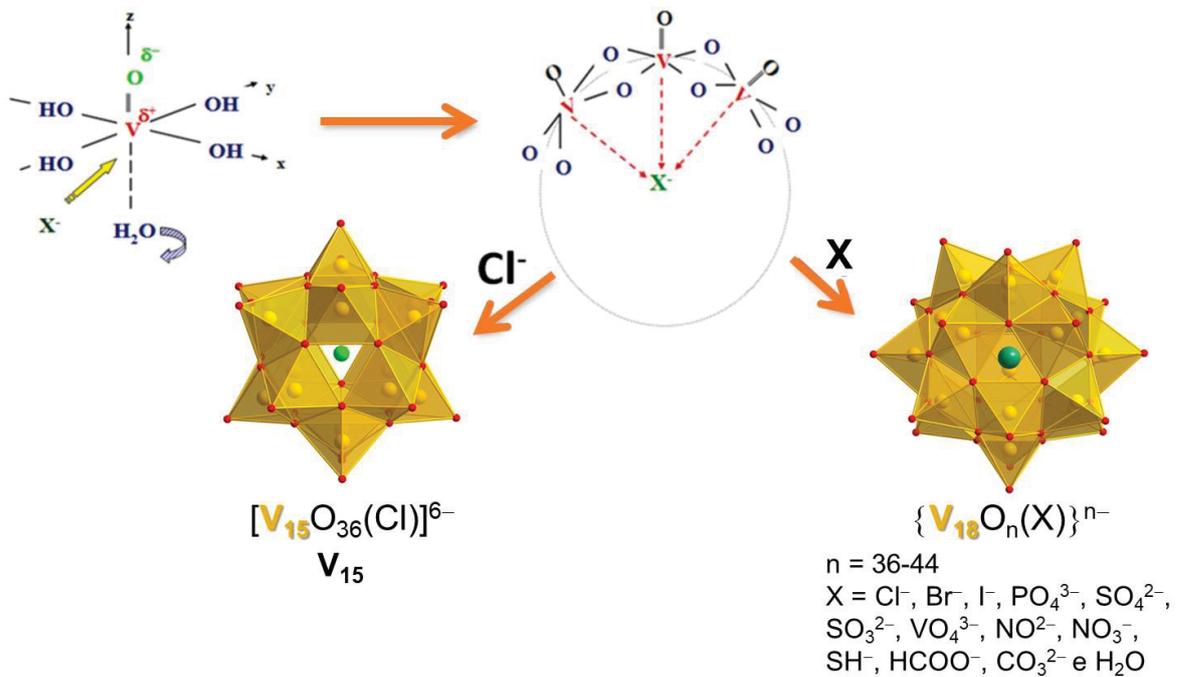


Quando a condensação de vários oxidovanadatos ocorre em torno de um haleto, por exemplo, há a formação de um POV pseudoesférico contendo o haleto encapsulado que funciona como grupo direcionador da estrutura.<sup>66–68</sup> Na FIGURA 5 há a formação de dois POVs contendo 15 e 18 centros metálicos.<sup>51</sup> Os POVs pseudoesféricos possuem alta versatilidade devido ao efeito templatado que é gerado pela interação eletrostática entre o ânion ou molécula hóspede e os cátions de oxidovanádio(IV) ou oxidovanádio(V) que formam as unidades  $\{(V=O)-\mu-O\}^{n+}$ .<sup>49,69</sup> As interações eletrostáticas entre a espécie química encapsulada e os centros de vanádio estabilizam a estrutura polinuclear fechada. Como consequência, ocorre uma polarização no agregado, em que a densidade negativa é distribuída predominantemente na região periférica, favorecendo a ocorrência de interações eletrostáticas com espécies catiônicas em solução.<sup>51</sup>

Uma característica recorrente dos polioxovanadatos de valência mista (POVs-VM) é a presença do vanádio em número de coordenação 5 (FIGURA 5). Compostos estruturalmente equivalentes a  $X@V_{18}O_n$  (onde  $n = 36-44$ ; X = espécies encapsuladas como  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $VO_4^{3-}$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SH^-$ ,  $HCOO^-$ ,  $CO_3^{2-}$  e  $H_2O$ ) mostram uma relação hospedeiro-hóspede mais variada em comparação com aqueles contendo todos os metais no mesmo estado de oxidação. Além disso, agregados de alta nuclearidade como  $X@V_{18}O_{42}$  apresentam diferentes relações  $V^{IV}:V^V$ . Esta variabilidade permite correlacionar propriedades estruturais,

eletrônicas, espectroscópicas e magnéticas, e mais recentemente explorar as aplicações catalíticas e medicinais além do emprego dos agregados como supercapacitores.<sup>70</sup>

FIGURA 5 – Formação de polioxovanadatos na presença de ânions haleto  $[V_{15}O_{36}Cl]^{6-}$  ( $V_{15}$ ) e  $[V_{18}O_n(X)]^{n-}$ . FONTE: adaptado de Livage (2010).<sup>51</sup>



A potencial ação medicinal dos POVs-VM só passou a ser investigada nos últimos 15 anos a partir de estudos pioneiros desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. Dentre eles, o mais estudado é o  $[V^{IV}_8V^V_7O_{36}Cl]^{6-}$  ( $V_{15}$ ), apresentado na FIGURA 5. Este composto contém em sua estrutura oito centros de vanádio(IV) e sete centros de vanádio(V) ligados por 36 grupos oxido em ponte e 5 oxigênios terminais, formando um cluster contendo um cloreto encapsulado. O  $V_{15}$  mostrou capacidade quimioprotetora do DNA plasmidial, minimizando a ação de agentes potencialmente carcinogênicos como o agente alquilante dietilsulfato, com resultados de quimioproteção de até 70%.<sup>71,72</sup> Mais recentemente, a atividade quimioprotetora do  $V_{15}$ ,  $[H_6V^{IV}_2V^V_{12}O_{38}(PO_4)]^{5-}$  ( $V_{14}$ ),<sup>72</sup>  $[V^{IV}_{12}V^V_6O_{42}I]^{7-}$  ( $V_{18}I$ ) e  $\{[K_6(OH_2)_{12}V^{IV}_{11}V^V_7O_{41}(PO_4) \cdot 4H_2O]_n\}$  ( $V_{18}P$ ),<sup>73</sup> foi avaliada empregando culturas de *E. coli* como um modelo biológico e dietilsulfato como agente alquilante, onde o  $V_{15}$  e o  $V_{18}I$  levaram a um aumento na viabilidade celular de até 40%, quando comparado com o controle, enquanto que o  $V_{14}$  e o  $V_{18}P$  potencializaram a atividade do agente alquilante.

O **V<sub>15</sub>** também demonstrou efeitos inibitórios de crescimento em microorganismos, incluindo *Mycobacterium smegmatis*.<sup>74</sup> Além disso, o **V<sub>15</sub>** apresentou maiores respostas celulares na avaliação da interação com a interface lipídica da membrana celular das células CHO (células de ovário de hamster chinês) quando comparado com o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG), usado como referência.<sup>75</sup> Apesar dos efeitos biológicos promissores descritos para o **V<sub>15</sub>** *in vitro*, este POV-VM ainda não foi avaliado contra nenhuma linhagem de célula cancerosa.

Recentemente, foi realizada a primeira avaliação de toxicidade para o **V<sub>15</sub>**, utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMC), larvas de *Artemia salina* além de doses orais agudas e repetidas *in vivo* de 28 dias em camundongos. O valor de LC<sub>50</sub> (concentração do composto que leva à morte de 50% das células ou larvas) para as Células PBMC foi de  $17,5 \pm 5,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , e para *A. salina* foi de  $17,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , indicando alta citotoxicidade do **V<sub>15</sub>**.<sup>76</sup>

Já quando administrado em camundongos, o **V<sub>15</sub>** não apresentou toxicidade após exposição aguda em dose única, todavia, a administração oral repetida do POV durante 28 dias demonstrou alta toxicidade usando doses de  $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ . Ademais, durante o período do estudo observou-se alterações significativas dos parâmetros metabólicos relacionados ao rim e ao fígado, sugerindo toxicidade moderada a alta.<sup>76</sup> Destes resultados emerge a necessidade de encontrar formas de diminuir a toxidade do **V<sub>15</sub>** para os organismos, e de aumentar o número de POVs estudados visando correlacionar propriedades químicas e de reatividade com a atividade biológica.

### 2.3 QUÍMICA DE POLIOXOVANADATOS EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM MEIOS DE CULTURA

Assim como nos POMs, as informações estruturais obtidas no estado sólido para os POVs, nem sempre se refletem em solução.<sup>48</sup> Nesse sentido, o uso desta classe de compostos para aplicações em solução é um desafio, pois eles tendem a formar espécies que podem sofrer hidrólise gerando estruturas de menor nuclearidade, ser protonadas e sofrer reações redox.<sup>48</sup>

A natureza e a concentração das espécies de vanádio formadas a partir da dissolução de um POV em um solvente ou meio celular são diretamente influenciadas

pelo pH, força iônica, temperatura e concentrações de vanádio. Para identificar e caracterizar as diferentes espécies de POVs formadas tanto em meio aquoso, quanto em diferentes solventes e meios celulares, uma diversidade de técnicas pode ser utilizada, como por exemplo, a potenciometria, espectrometria de massas, espalhamento de raios X a baixo ângulo, além de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^{51}\text{V}$ ) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Essas duas últimas técnicas são específicas para identificação de espécies químicas contendo vanádio(V) e vanádio(IV), respectivamente.<sup>48</sup>

O modelo de especiação dos POVs mais aceito e utilizado foi desenvolvido a partir de estudos por RMN de  $^{51}\text{V}$  em conjunto com estudos de titulação potenciométrica de soluções aquosas do ortovanadato (FIGURA 6 e 7), variando-se a concentração, pH e força iônica do meio.<sup>77,78</sup> Em soluções aquosas básicas ou neutras, são formadas espécies contendo um até cinco centros de oxidovanádio(V), que podem estar ou não protonadas, tais como  $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$  ( $\text{V}_1$ ),  $[\text{V}_2\text{O}_7]^{2-}$  ( $\text{V}_2$ ),  $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^{4-}$  ( $\text{V}_4$ ) e  $[\text{V}_5\text{O}_{15}]^{5-}$  ( $\text{V}_5$ ). Já em meio ácido, são identificadas em solução duas espécies principais, o ânion decavanadato ( $\text{V}_{10}$ ) e uma espécie mononuclear de oxidovanádio(V),  $[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$  ( $\text{VO}_2^+$ ).<sup>48</sup>

FIGURA 6 – (a) Representação estrutural das espécies mais comuns encontradas em soluções aquosas de decavanadato. Os centros de vanádio quimicamente equivalentes do  $\text{V}_{10}$  são representados por  $\text{V}_A$ ,  $\text{V}_B$  e  $\text{V}_C$ .

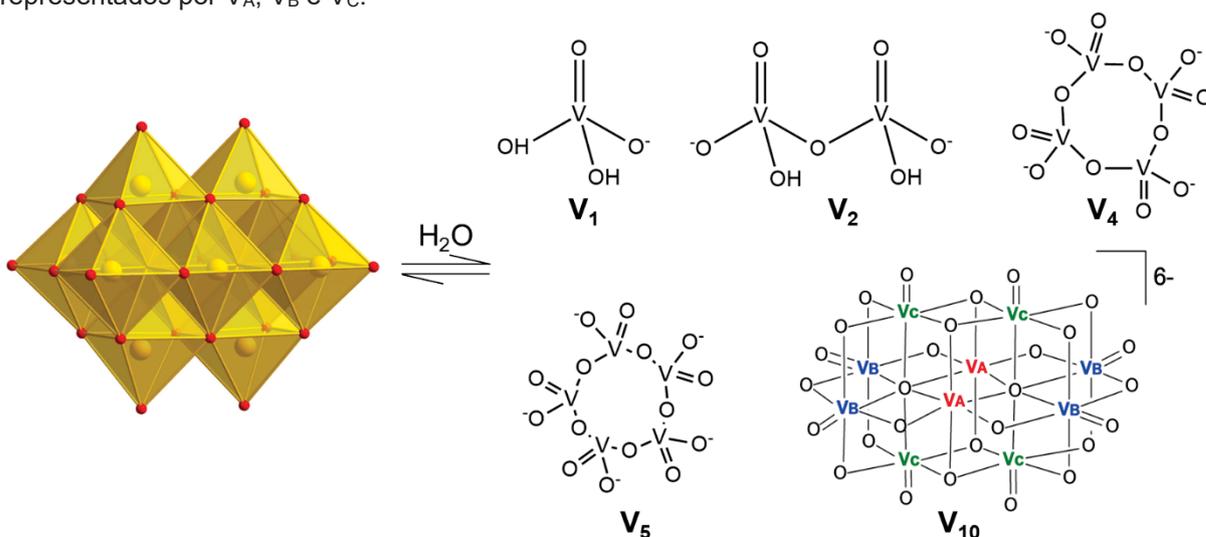
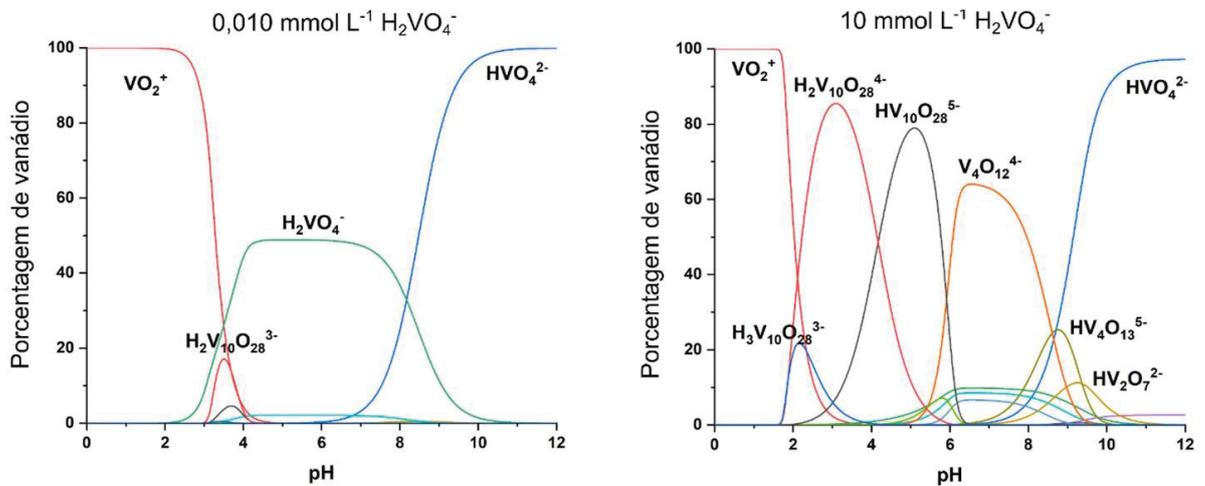


FIGURA 7 - Gráfico relacionando à especiação e predominância das espécies de íons vanadato em duas concentrações e diferentes faixas de pH em meio aquoso com força iônica de 0,15 NaCl. FONTE: Petterson (1993), Crans (2005), Gumerova (2020) e Crans (2021).<sup>48,77-79</sup>



A especiação química do  $V_{10}$  tem sido objeto de estudo em diferentes meios de cultura, nos quais as principais espécies identificadas são  $H_x[VVO_4]^{(3-x)-}$ ,  $H_m[V_2O_7]^{(4-m)-}$  e  $[V_2O_4]^{4-}$ .<sup>48</sup> Entretanto, os tempos de meia vida ( $\tau_{1/2}$ ) variam em função dos componentes do meio e da temperatura em que o estudo foi realizado (TABELA 1). O  $V_{10}$ , por exemplo, pode ser estabilizado em meio biológico por meio de interações de ligação de hidrogênio com moléculas vizinhas,<sup>80</sup> como proteínas ou ligantes macrocíclicos.<sup>81</sup>

Quando o  $V_{10}$  é incubado com proteínas e/ou exposto a culturas de células durante longos períodos de tempo (até 72 h) e temperatura fisiológica (37 °C) em ambientes aquosos ou semi-aquosos, sua estabilidade é afetada gerando um equilíbrio complexo entre o  $V_{10}$  e outros oligovanadatos (FIGURA 6).<sup>50</sup>

Estudos mostraram que o  $V_{10}$  possui uma meia vida no meio celular com soro fetal bovino de 15 h à temperatura ambiente,<sup>82</sup> como visto na TABELA 1, além de ser a principal espécie ligada a proteínas<sup>57</sup> e conhecido por interagir com várias enzimas como quinases, actina e ATPase.<sup>58,83-86</sup>

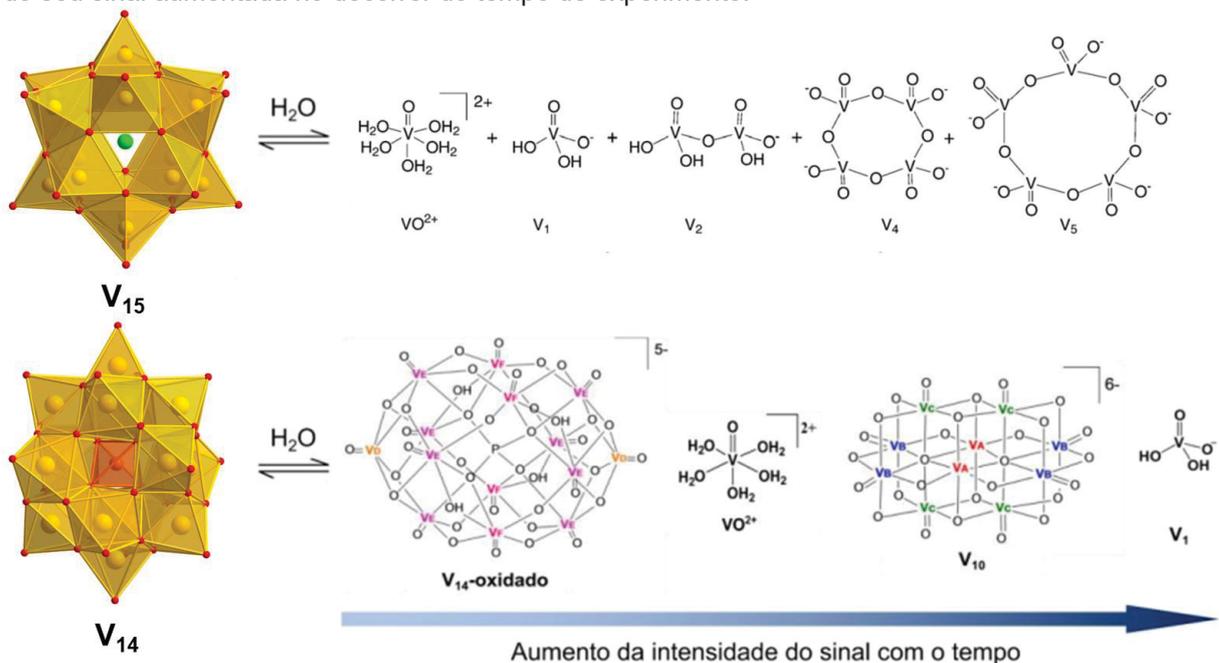
TABELA 1 – Tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) em horas atribuídos ao ânion decavanadato (5,0 mmol L<sup>-1</sup>) em diferentes meios biológicos, temperaturas e pHs

Meio de cultura	37 °C	25 °C	80 °C	2 °C	Ref
DEMEM, pH 7,0	2	-	-	-	87
Soro fisiológico, pH 7,0 NaCl 0,9%	-	12	-	-	88
Soro Fetal Bovino	-	15	-	-	82
BHI, pH 7,2	-	1	-	-	89
MRB, pH 7,4	3	4,5	-	101,9	90
Tris-HCl, pH 7,5	1	-	-	-	58
AP, pH 7,8	-	-	6	-	89

DMEM = meio de Eagle modificado por Dulbecco; BHI = infusão cérebro coração; MRB = tampão de respiração mitocondrial; Imi = tampão imidazol; Tris-HCl = tampão tris(hidroximetil)aminometano-HCl; AP = tampão fosfatase alcalina. (-) = não determinado.

A especiação em solução aquosa e em meios de cultura de outros POVs têm sido bastante estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, por meio de técnicas como RMN de  $^{51}\text{V}$  para espécies de vanádio(V) e de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para espécies de vanádio(IV) e de valência mista ( $\text{V}^{\text{IV}}/\text{V}^{\text{V}}$ ). Em meio aquoso as espécies presentes na solução de  $\text{V}_{14}$  e  $\text{V}_{15}$  (Figura 8) dependem da concentração do POV-VM, do pH e da presença ou não de espécies que estabilizem oxidovanadatos mais complexos. O  $\text{V}_{14}$  apresentou maior toxicidade a culturas da bactéria *Escherichia coli* do que o  $\text{V}_{15}$ , provavelmente devido à formação do análogo totalmente oxidado ( $\text{V}_{14}$ -oxidado) e do  $\text{V}_{10}$ , que possui ação antibacteriana.<sup>72,91</sup>

FIGURA 8– Equilíbrios gerados para os sistemas de  $\text{V}_{14}$  e  $\text{V}_{15}$  em solução aquosa  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  determinadas por RMN de  $^{51}\text{V}$  e de RPE, com flecha indicando as espécies que tiveram a intensidade de seu sinal aumentada no decorrer do tempo de experimento.<sup>71,72</sup>

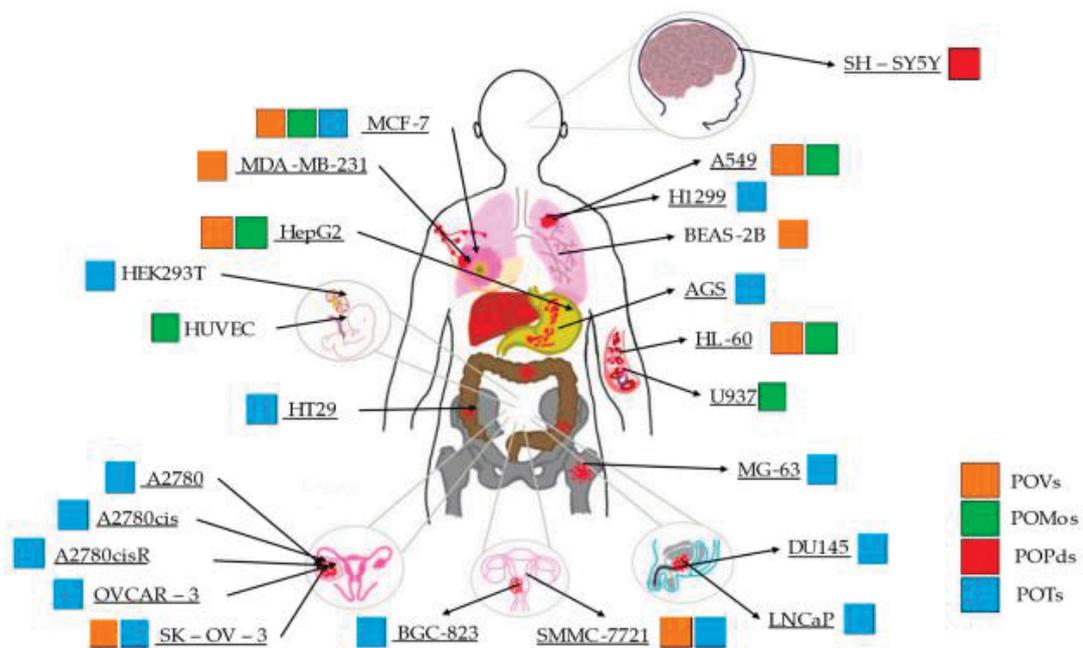


A extensão dos estudos de estabilidade em solução aquosa e no meio de cultura LB (Luria Bertani) para  $\text{V}_{18}\text{I}$  e  $\text{V}_{18}\text{P}$ , evidenciaram que os POVs-VM contendo haletos encapsulados foram mais estáveis do que os que continham fosfato. A ordem de estabilidade encontrada foi  $\text{V}_{18}\text{I} > \text{V}_{15} > \text{V}_{18}\text{P} > \text{V}_{14}$ , resultado que é diretamente proporcional a atividade de quimioproteção contra os agentes alquilantes.

## 2.4 POLIOXOVANADATOS COMO POTENCIAIS AGENTES NA TERAPIA DO CÂNCER

Nas últimas duas décadas os POVs passaram a ser avaliados em seu potencial como medicamentos inorgânicos, tendo atividade insulino-mimética,<sup>92</sup> antitumoral,<sup>93</sup> antiviral,<sup>94</sup> anti-HIV,<sup>95</sup> antiparasitária<sup>96</sup> e antibacteriana.<sup>97</sup> O efeito inibitório *in vitro* dos POVs sobre células tumorais humanas é maior quando comparado aos outros POMs. Os estudos já relatados da ação anticâncer dos POVs em diferentes linhagens tumorais foi recentemente revisado por Aureliano (2023).<sup>5</sup> A FIGURA 9 ressalta que estes ainda permanecem bem menos explorados que outros POMs, apresentando resultados em linhagens de câncer de pulmão, mama, fígado, ovário e leucemia, principalmente com o V<sub>10</sub>, e mais raramente com octadecavanadatos.

FIGURA 9 – Aplicações de POMs em 20 diferentes linhagens celulares tumorais (sublinhadas) e 3 não tumorais (não-sublinhadas) testadas no estudo de viabilidade celular, relatadas até 2023. Os POVs estão representados em laranja. Onde, POMos = polioxomolibdatos, PoPdS = polioxopaladatos, POTs = polioxotungstatos. Fonte: Aureliano (2023), uso livre para trabalhos científicos conforme disposto na licença CC BY 4.0 no sítio <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.<sup>5</sup>



O câncer é um problema mundial de saúde pública, econômico e social, ocupando o terceiro lugar nas principais causas de morte na faixa de 30 a 69 anos em 177 de 183 países.<sup>1</sup> Dentre os dez principais tipos de câncer, o de mama foi o mais

comumente diagnosticado em 2022 entre a população feminina, equivalendo a 23,8% do total de casos, além de ser o tipo de câncer que mais mata mulheres no mundo, com 15,4% do total de casos.<sup>1</sup> No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), O número estimado de casos novos de câncer de mama, para o triênio de 2023 a 2025, é de 73.610 casos, correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres.<sup>2,98</sup> Sabe-se que 90% dos casos de mortes ocasionados por esta doença são decorrentes das metástases.<sup>99</sup>

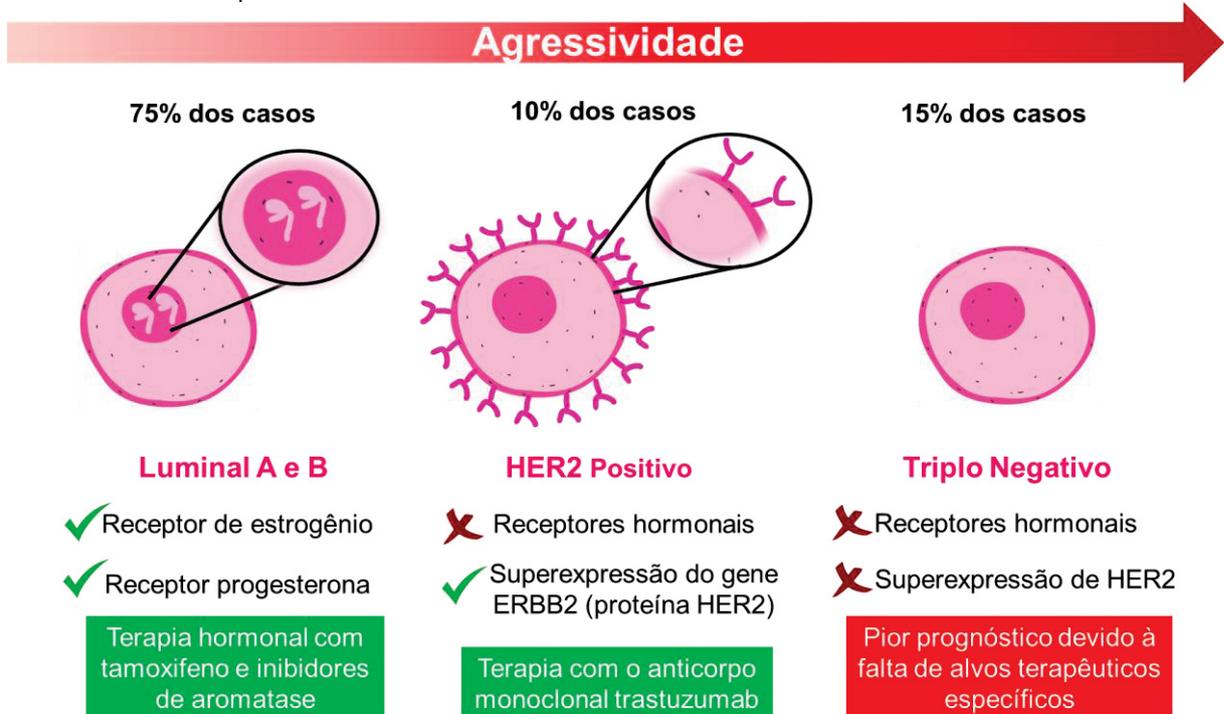
O câncer de mama tem diagnóstico e prognóstico a partir do perfil de expressão de algumas proteínas e podem ser de quatro subtipos: *a*) luminal A, com expressão dos receptores hormonais estrógeno (RE) e progesterona (RP) e expressão basal do fator de crescimento humano epidermal (HER2); *b*) luminal B, com expressão de RE e RP e superexpressão ou não de HER2 e alto Ki67.<sup>4</sup> Pacientes com tumores luminais representam 75% do total, estes podem fazer uso da terapia hormonal com tamoxifeno e inibidores de aromatase;<sup>4</sup> *c*) subtipo HER2, que tem superexpressão do gene *ERBB2* (10%) e a terapia pode ser feita com o anticorpo monoclonal trastuzumab; *d*) subtipo basal que clinicamente é referido dentro do grupo triplo negativo, que compreende cerca de 15% dos casos, não expressa os receptores hormonais e nem super-expressa HER2, conferindo um pior prognóstico devido à falta de alvos terapêuticos específicos (FIGURA 10).<sup>4</sup>

Em qualquer subtipo existe a possibilidade de recidiva, resistência a terapia e metástases, mas os tumores do subtipo triplo negativo possuem a pior taxa de sobrevivência global devido à resistência a quimioterapia e metástases (< 30% sobrevivem 5 anos após o diagnóstico).<sup>3</sup> Além disso, os medicamentos utilizados para o tratamento de câncer atualmente têm grandes desvantagens, como efeitos colaterais graves devido à falta de seletividade, baixa eficiência contra alguns tipos de câncer e baixa biodisponibilidade. Desta forma, é necessário o estudo de drogas alternativas que incapacitam seletivamente as células cancerosas sem danificar gravemente as células normais.<sup>40</sup>

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece para o tratamento de câncer de mama, cirurgias, como mastectomias e de reconstrução mamária, além de tratamentos como radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e tratamento com anticorpos. Segundo a Lei nº 12.732/2012, o paciente com neoplasia maligna tem direito de se submeter ao primeiro tratamento no SUS, em até 60 dias a partir do diagnóstico em laudo patológico ou em prazo menor, dependendo da necessidade

terapêutica do caso.<sup>100</sup>

FIGURA 10 – Subtipos moleculares do câncer de mama.



O procedimento de reconstrução mamária é oferecido apenas para mulheres com câncer que tiveram que retirar parte expressiva das mamas, assim como os procedimentos de implante de prótese pós-mastectomia, de modo que a cirurgia de reconstrução deve ser preferencialmente realizada na retirada do tumor, conforme previsto na Lei nº 12.802.<sup>100</sup>

O vanádio tem demonstrado potencial para atuar em diferentes etapas do processo de carcinogênese, incluindo a prevenção, terapia e diagnóstico precoce.<sup>93</sup> No que diz respeito ao potencial dos POVs como agentes antitumorais, o ânion  $V_{10}$  mostrou atividade contra várias linhagens de células cancerosas, dentre elas SMMC-7721 (câncer de fígado), SK-OV-3 (câncer de ovário), B16 (melanoma murino) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano).<sup>101</sup>

Ainda, a combinação do  $V_{10}$  com moléculas ou íons orgânicos tem gerado resultados promissores no que diz respeito à modulação da atividade e da citotoxicidade dos POV. Por exemplo, o  $V_{10}$  com trietanolamina mostrou-se mais estável no meio de cultura e apresentou atividade antitumoral contra linhagens celulares MDA-MB-231, de carcinoma de laringe humano (HEp-2) e carcinoma de fígado hepatocelular (HepG2). Este sal do  $V_{10}$  apresentou atividade até 10 vezes mais

alta do que a descrita para a droga quimioterápica 5-fluorouracil.<sup>102</sup> De forma similar, atribui-se à estabilidade do agregado a atividade dez vezes mais alta do  $V_{10}$  com carnitina, comparada com a do ortovanadato, para linhagens de células tumorais de melanoma de camundongo, adenocarcinoma mamário de camundongo e humano (MDA-MB-231) e pulmão (A549).<sup>93,103</sup> Além disso, o complexo  $V_{10}$ -carnitina exibe atividade antitumoral contra várias células cancerosas com baixa citotoxicidade as células normais, como por exemplo a atividade observada na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, que é 400 vezes mais eficaz quando comparado à cisplatina.<sup>103,104</sup>

Os hexavanadatos funcionalizados têm sido aplicados principalmente no campo da catálise,<sup>105,106</sup> mas permanecem praticamente inexplorados em suas atividades biológicas. Entre os poucos estudos, foi identificada a atividade inibitória das  $Na^+/K^+$ -ATPase do córtex cerebral suíno como mecanismo antitumoral.<sup>84</sup> Recentemente, o hexavanadato funcionalizado com o éster da glicina,  $(Bu_4N)_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3C_{10}H_{14}O_5\}_2]$  mostrou uma melhor atividade inibitória na proliferação em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG 2), rabdomioma (RD) e linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7) quando comparado à droga comercial 5-fluorouracil (5-FU).<sup>107,108</sup>

Devido à sua elevada variabilidade estrutural e composicional, POVs-VM constituem uma forma interessante de avaliar o efeito dos diferentes ânions encapsulados e o efeito dos estados de oxidação do metal na atividade biológica estudada. Os primeiros estudos da atividade biológica dessa classe foram reportados para  $[NiV_{13}O_{38}]$  e sugerem um potencial como um agente antitumoral de largo espectro. Os resultados incluem ação citotóxica contra células de carcinoma de boca humano (KB), câncer de cólon humano (HTC) e melanoma murino B16.<sup>101</sup>

Recentemente, a atividade antitumoral de dois octadecavanadatos (FIGURA 5) também foi reportada, mostrando a capacidade do agregado  $[V_{18}O_{42}(H_2O)]^{12-}$  como agente antiproliferativo em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7)<sup>109</sup> e do  $[V_{18}O_{44}(N_3)]^{10-}$  em células de mama, melanoma humano, pulmão e câncer cervical.<sup>110</sup>

É provável, porém, que a atividade observada para os POV 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<sup>V</sup>/V<sup>V</sup>, levando à apoptose, e a interação com mitocôndrias, prejudicando a síntese de ATP, 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 tumorais.<sup>111</sup>

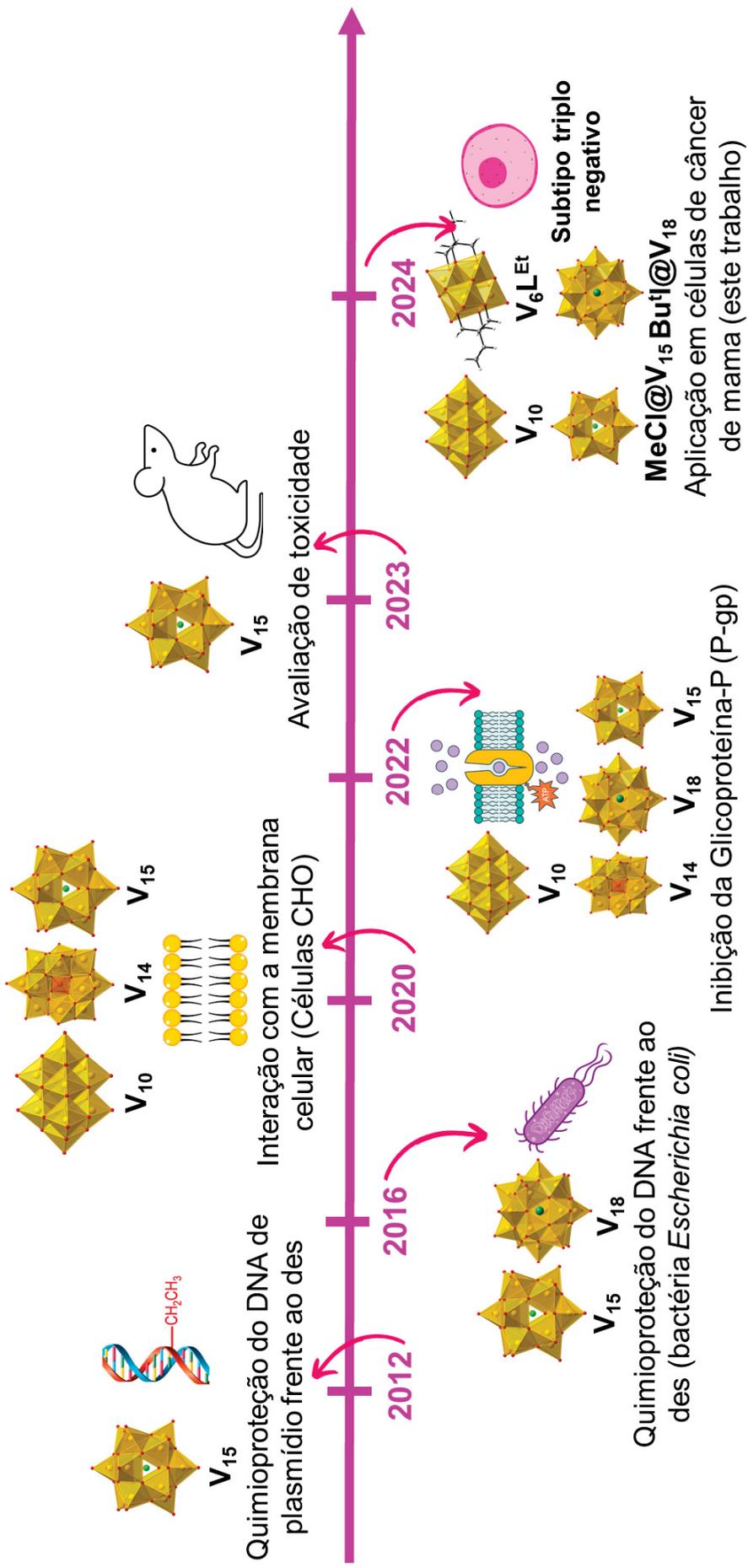
Diferentes POMs podem parar o ciclo celular em diversas fases. A maioria dos POMs estudados até hoje para aplicação antitumoral interromperam o ciclo celular na fase S, que é durante a síntese do DNA; seguidos por POM que bloquearam a fase G2/M, que é quando a transição da interfase ocorre até o início da mitose; e por último, POM que bloquearam a fase G1, característica da maturação na síntese de proteínas e RNA (ácido ribonucléico).<sup>5</sup> Para [V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>12-</sup>, o mecanismo de ação proposto em células MCF-7 é baseado na inibição da fase G2/M, levando à indução de apoptose e necrose.<sup>109</sup> Apesar da disponibilidade destes dados, é patente que a classe dos POVs-VM ainda é a menos explorada em sua ação antitumoral.

Um grande obstáculo no tratamento de alguns tipos de neoplasias é a resistência à múltiplas drogas, por parte das células tumorais. As proteínas transportadoras (proteínas ABC) são envolvidas no transporte unidirecional de uma variedade de moléculas através de membranas biológicas.<sup>112</sup> As proteínas ABC funcionam como bombas, expulsando substratos das células de câncer por meio da energia de ligação ATP.<sup>113</sup> O papel dessas proteínas é garantir a desintoxicação, entretanto, elas também acarretam em uma resistência a múltiplas drogas para células cancerígenas.<sup>114</sup> A falta de resposta ao tratamento por quimioterapia usando combinação de drogas pode ser intrínseca ou adquirida e é um problema clínico comum que chega a atingir cerca de 90% dos casos de câncer metastático.<sup>115</sup>

Uma estratégia interessante para solucionar esse problema é a utilização de inibidores dos transportadores de drogas ABC. O nosso grupo de pesquisa avaliou os POVs **V<sub>10</sub>**, **V<sub>14</sub>**, **V<sub>15</sub>** e **V<sub>18</sub>** como inibidores de três principais transportadores ABC: glicoproteína P (P-gp), ABCG2 e MRP1.<sup>114</sup> Todos os POVs inibiram seletivamente a P-gp, destacando-se o **V<sub>10</sub>** e o **V<sub>18</sub>** como os mais promissores, com valores IC<sub>50</sub> de inibição de transporte de 25,4 e 22,7 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos os compostos inibiram a atividade da P-gp ATPase, com o mesmo valor (IC<sub>50</sub> de 1,26 μmol L<sup>-1</sup>), já **V<sub>10</sub>** e **V<sub>18</sub>** se sobressaíram por também proporcionarem a alteração na conformação da proteína P-gp com inibição dependente do tempo. A natureza hidrofílica dos POVs pode indicar a teoria de que o alvo de ligação desses compostos não é o usual, o que torna esses POVs promissores moduladores de transportadores ABC.<sup>114</sup>

Contudo, para determinação das formas de ação e das espécies responsáveis pelos efeitos dos POVs nas células de câncer, são necessários estudos mais amplos, com uma maior variedade de polioxovanadatos, hóspedes e proporções de  $V^{IV}/V^V$ . Diante de tudo que foi exposto, este trabalho visa contribuir e ampliar os estudos do grupo de pesquisa para o conhecimento da atividade desses compostos contra o câncer de mama, em especial no tratamento do subtipo triplo-negativo que ainda não possui terapia específica (FIGURA 11).

FIGURA 11 – Polioxovanadatos estudados pelo grupo de pesquisa ao longo dos anos e suas aplicações relacionadas ao câncer.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o desenvolvimento da química de polioxovanadatos, ampliando o número de compostos disponíveis, elucidando os padrões estruturais no estado sólido e de reatividade em solução. Avaliar o papel que o vanádio desempenha *in vitro* e seu potencial como novo agente na terapia do câncer de mama no subtipo triplo negativo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Preparar polioxovanadatos de vanádio(V) e de valência mista ( $V^{IV}/V^V$ ) contendo iodeto ou cloreto encapsulados e em associação com cátions tetraalquilamônio;
- 3.2.2. Caracterizar os compostos obtidos no estado sólido e em solução por análise elementar, técnicas espectroscópicas (IV, Raman, espectroscopia eletrônica (UV-VIS-NIR), RPE e RMN de  $^{51}V$ ), difração de raios X de pó e monocristal, termogravimetria e microscopia eletrônica;
- 3.2.3. Avaliar o efeito dos diferentes POVs na modulação do crescimento tumoral em linhagens de câncer de mama do subtipo triplo negativo, como a MDA-MB-231, e em células normais HB4a, além de células de câncer de mama murino 4T1.
- 3.2.4. Avaliar a interferência dos POVs sobre a migração da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.
- 3.2.5. Avaliar a mudança ou não da morfologia celular após tratamento com os POVs nas linhagens celulares de câncer de mama humano MDA-MB-231, e na linhagem normal de mama humano HB4a.
- 3.2.6. Avaliar os padrões de reatividade dos POVs em meio biológico, buscando racionalizar as relações estrutura–atividade–reatividade através do uso de técnicas espectroscópicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DA APARELHAGEM E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

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

#### 4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), em um equipamento TESCAN VEGA3 LMU, com resolução de 3,0 nm, em magnificações que variaram de 1000x a 50000x. As amostras dos POVs pulverizadas foram preparadas depositando o pó sobre uma fita de carbono fixada ao suporte para realização da análise. Os filmes dos POVs foram obtidos mergulhando uma lâmina de vidro recoberta com óxido de estanho e índio (ITO) na solução da mistura de reação, permanecendo submersa por 1 dia. Após esse período, a lâmina foi retirada da solução e lavada exaustivamente com água deionizada, secada ao ar e guardada ao abrigo da luz até o momento da análise.

A preparação das amostras das linhagens celulares para o MEV foi realizada seguindo o protocolo de Gonçalves (2021)<sup>116</sup> e está descrita na seção 4.9.

#### 4.1.2 Espectroscopia por Dispersão de elétrons (EDS)

As análises de Espectroscopia por Dispersão de Elétrons (EDS) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), em um Sistema de análise química tipo EDS (Oxford) com software AZ Tech (Advanced) com detector tipo SDD, (*Silicon Drift* Detector) de 80 mm<sup>2</sup>. Para a realização da análise, foram utilizadas as mesmas amostras preparadas para o MEV, antes da metalização com ouro.

#### 4.1.3 Análise Elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio (C, H e N), foram determinados em duplicata por análises de combustão em um equipamento Perkin Elmer modelo 2400 series II na Central analítica da USP.

#### 4.1.4 Análise Termogravimétrica

As dosagens de vanádio foram realizadas por gravimetria a partir do tratamento térmico das amostras primeiramente a 200 °C por uma hora, seguido de um aumento de temperatura para 600 °C por duas horas. A formação de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foi confirmada por difração de raios X de pó.

#### 4.1.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> foram registrados em um instrumento Bruker Vertex 70 a partir de pastilhas de KBr, com 32 varreduras e uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. Para o preparo das pastilhas foram utilizadas aproximadamente 200 mg de KBr e 2,0 mg de amostra. A mistura foi macerada e prensada para a formação de uma pastilha translúcida que foi analisada.

#### 4.1.6 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 1,0 μm<sup>2</sup>. Os lasers utilizados foram tanto de Ar<sup>+</sup> (514 nm) quanto de He-Ne (632,8 nm), ambos na região de 200 a 2000 cm<sup>-1</sup> e com potência de 0,2 mW.

#### 4.1.7 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 6000-30000 nm em um espectrofotômetro PerkinElmer LAMBDA 1050 UV/Vis/NIR equipado com três detectores de PMT/InGaAs/PbS. A amostra foi analisada em solução de acetona na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.8 Difração de raios X de pó (DRX de pó)

Os difratogramas de raios X de pó foram obtidos em um equipamento Shimadzu XRD-6000, com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) empregando pó de silício como padrão interno. Os experimentos foram realizados com voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA e velocidades de varredura de  $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$  (em  $2\theta$ ). A identificação dos óxidos obtidos neste trabalho foi realizada por comparação com as fichas-padrão *JCPDF (Joint Committee on Powder Diffraction Standards)*.

#### 4.1.9 Difração de raios X de monocristal (DRX de monocristal)

A difração de raios X de monocristal foi realizada em um difratômetro Bruker modelo D8 Venture equipado com detector de área Photon 100, duas fontes de radiação monocromática de Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) e Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ) e dispositivo Kryoflex II para realização de coletas de dados a temperaturas de 100 K. A coleta de dados e integração realizadas utilizando o software APEX 2 da Brucker. O refinamento dos dados foi realizado nos softwares WinGX e SHELXS, utilizando todas as reflexões. O refinamento das estruturas foi realizado pelo Me. Gabriel Barros Baptistella e pelo Dr. David L. Hughes. As figuras foram geradas com uso do programa Diamond 4.

#### 4.1.10 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram registrados nas amostras sólidas pulverizadas, em solução aquosa, solução de dmsou ou em meio de cultura RPMI, a temperatura ambiente e a 77 K. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker ELEXSYS E-500 operando em banda X (9,5 GHz). Para o estudo de estabilidade em solução, foram utilizadas concentrações de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada POV em dmsou, água ou RPMI, verificando a estabilidade dos arcabouços nos tempos de 0, 3, 10, 24, 48 e 72 h.

#### 4.1.11 Ressonância magnética nuclear (RMN de $^{51}\text{V}$ )

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{51}\text{V}$  foram registrados em  $\text{D}_2\text{O}$  utilizando um equipamento Bruker Avance 400 MHz (9,4 T), equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta (5,0 mm). Os espectros foram adquiridos a 303 K com 500  $\mu\text{L}$  de cada solução amostra, utilizando pulsos de  $90^\circ$ . Os espectros foram registrados com 2048 varreduras, com um intervalo entre ciclos de 0,1 s e tempos de aquisição de 0,218 s, ao longo de uma janela espectral de 714 ppm com frequência de aquisição do núcleo de  $^{51}\text{V}$  de 105,25 MHz. Os espectros foram referenciados utilizando  $\text{VOCl}_3$  puro em capilar (referência externa) fixando-se o sinal em 0,00 ppm.

Assim como para a análise de EPR, o estudo de estabilidade em solução também foi realizado por RMN de  $^{51}\text{V}$ , utilizando concentrações de 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de cada POV em dmsO, água ou meio RPMI, para verificar a estabilidade do polioxovanadato em diferentes tempos (0, 3, 10, 24, 48 e 72 h).

## 4.2 REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes foram utilizados conforme recebido do fornecedor. A TABELA 2 lista a procedência e pureza dos reagentes.

TABELA 2 – Lista de reagentes e solventes utilizados em todas as etapas deste trabalho e especificações do fabricante

Nome	Fórmula	Grau de Pureza (%)	Fabricante
Metavanadato de amônio	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	99,0	Vetec
Metavanadato de sódio	$\text{NaVO}_3$	98,0	Aldrich
Cloreto de tetrametilamônio	$(\text{Me})_4\text{NCl}$	98,0	Aldrich
Iodeto de tetrametilamônio	$(\text{Bu})_4\text{NI}$	98,0	Merck
Brometo de tetrametilamônio	$(\text{Me})_4\text{NBr}$	98,0	Aldrich
Manitol	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	99,2	USB
Pentóxido de vanádio	$\text{V}_2\text{O}_5$	99,6	Aldrich
Ácido oxálico diidratado	$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,5	Aldrich
1,1,1-tris(hidroximetil)propano	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_3$	99,0	Aldrich
Trietilamina	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$	99,0	Aldrich
Ácido clorídrico	$\text{HCl}$	37,0	Êxodo
Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$	98,0	Êxodo
Dimetilsulfóxido	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	99,9	Êxodo
Acetona	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	99,5	Quimidrol
Sulfato ferroso amoniacal	$((\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O})$	99,0	Merck

Permanganato de Potássio	KMnO <sub>4</sub>	-	Merck
Acetilacetato de vanádio	[VO(acac) <sub>2</sub> ]	98,0	Merck
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	96,0	Applichem
Brometo de potássio	KBr	99,0	Neon
Água deuterada	D <sub>2</sub> O	99,9	Aldrich
Dimetilsulfóxido deuterado	C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> OS (dmsó-D6)	99,9	Aldrich
Acetona deuterada	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	99,9	Aldrich
Cloreto de sódio	NaCl	99,5	Cinética Química
Cloreto de potássio	KCl	99,5	Neon
Fosfato de sódio monobásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	98,0	Neon
Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99,2	J.T. Baker
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	99,7	Vetec
Ditiotreitol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	-	Qiagen
Cacodilato de sódio	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> Na·3H <sub>2</sub> O	100	Vetec
Gluteraldeído	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	50,0	Electron Microscopy Sciences
Tetróxido de ósmio	OsO <sub>4</sub>	99,9	SEM

### 4.3 SÍNTESES

As sínteses e operações experimentais foram conduzidas ao ar, empregando água deionizada (resistividade menor do que 3,50  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 25 °C), ou nos solventes dimetilsulfóxido (dmsó) e acetona, ambos com grau espectroscópico.

#### 4.3.1 Preparação do hexavanadato ( $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$ )

O código adotado para o hexavanadato lista o número de centros de vanádio, seguido da sigla L<sup>Et</sup>, referente ao ligante desprotonado 1,1,1-tris(hidroximetil)propano.

Esta reação inicialmente realizada pelo Me. Gabriel Barros Baptistella como parte de seu trabalho de doutorado, e a síntese foi reproduzida neste trabalho com pequenos ajustes.<sup>117</sup> Em um balão de fundo redondo contendo uma dispersão alaranjada de 0,400 g de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2,20 mmol) em 8,00 mL de água, foram adicionados 0,830 g de ácido oxálico dihidratado (6,60 mmol). A mistura foi aquecida a 60 °C e mantida sob agitação magnética. Após a adição do ácido, o sólido em dispersão foi totalmente consumido, gerando uma mistura homogênea azul-escura. Em seguida, foram adicionados 0,295 g do triol 1,1,1-tris(hidroximetil)propano (2,20 mmol) solubilizados em 10,0 mL de água. A solução resultante foi mantida a 60 °C. Após 2 h, foram adicionados 915  $\mu\text{L}$  de trietilamina (6,60 mmol) para desprotonação do triol, e a solução foi mantida sob refluxo por 2 h, formando uma solução verde escura. A solução então foi vertida em um béquer, e resfriada a temperatura ambiente. Após

uma semana, formaram-se cristais alaranjados em formato de paralelepípedo que foram lavados com etanol e secados ao ar (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**).

**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**: 51,5% (0,195 g) de rendimento com base na formulação C<sub>24</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>V<sub>6</sub>O<sub>19</sub>

Solubilidade: solúvel em água e parcialmente solúvel em solventes orgânicos.

#### 4.3.2 Preparação dos polioxovanadatos de valência mista

O sistema de código adotado para os polioxovanadatos de valência mista lista o grupo alquila dos cátions tetraalquilamônio (Me = tetrametil e Bu<sup>t</sup> = tetrabutil), seguida do haleto encapsulado (com a indicação do encapsulamento no polioxidoânion representada pelo sinal @), e por último o número de centros de vanádio, como subíndice do símbolo do elemento vanádio. Os compostos estudados neste trabalho são **MeCl@V<sub>15</sub>** que corresponde ao [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N]<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>(Cl)] descrito na introdução simplesmente como **V<sub>15</sub>** e **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** ainda não reportado na literatura na combinação do POV com o cátion.

#### 4.3.3 Preparação do POV-VM contendo cloreto encapsulado (**MeCl@V<sub>15</sub>**)

A reação para preparar o pentadecavanadato foi conduzida conforme descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa, fazendo-se pequenos ajustes.<sup>71</sup> Em um balão de 125 mL contendo 70,0 mL de água, adicionou-se 1,08 g (9,20 mmol) de NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, 0,950 g (5,30 mmol) de mannitol e 0,500 g (4,60 mmol) de (Me)<sub>4</sub>NCl. O sistema foi mantido em refluxo e agitação magnética por 72 h. Após alguns minutos sob agitação magnética, observou-se que a solução passou de amarelo para verde escura. Após este período, obteve-se uma suspensão preta, que foi imediatamente filtrada. A solução mãe foi mantida em repouso à temperatura ambiente por uma semana, onde foi observada a formação de cristais verde escuros que foram filtrados à vácuo, gerando 0,710 g de um sólido verde escuro (**MeCl@V<sub>15</sub>**).

**MeCl@V<sub>15</sub>**: 63,4% de rendimento com base na formulação C<sub>20</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl

Porcentagem de V= 43,0 %

Solubilidade: solúvel em água com aquecimento.

#### 4.3.4 Preparação do POV-VM contendo iodeto encapsulado (**Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>**)

Em um balão de fundo redondo contendo 70,0 mL de água, adicionou-se 1,13 g (9,66 mmol) de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , 0,950 g (5,21 mmol) de manitol e 0,920 g (2,49 mmol) de  $(\text{Bu}^t)_4\text{NI}$ , estequiometria (aproximadamente 1:2:4). O sistema foi mantido em refluxo sob agitação magnética por 24 h. Após alguns minutos, observou-se que a solução passou de amarelo, para amarelo esverdeado e então para verde escura. Após este período, obteve-se uma suspensão preta, que foi imediatamente filtrada e secada, gerando 0,620 g de um sólido preto, caracterizado como  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$  por DRX de pó e FTIR.<sup>80</sup> A solução mãe foi mantida em repouso à temperatura ambiente por uma semana, onde foi observada a formação de um filme verde aderido nas paredes do béquer. A solução mãe foi removida e o filme foi retirado do béquer com o auxílio de uma espátula, gerando 0,570 g de um sólido verde escuro (Produto **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**).

Sólido preto: 61% de rendimento com base na formulação  $\text{N}_2\text{H}_8\text{V}_3\text{O}_8$ . DRX de pó em  $2\theta$  ( $^\circ$ ) = 15,94; 20,00; 22,38; 25,64; 27,58; 32,14; 35,76; 39,46 e 45,84. IV em  $\text{cm}^{-1}$ : 997, 804, 723 2928, 3235 e 1418.

Produto **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**: 36% de rendimento com base na formulação  $\text{C}_{80}\text{H}_{180}\text{N}_5\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{I}$ .

Solubilidade de **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**: insolúvel em água, solúvel em acetona, dmsO e solventes orgânicos polares.

#### 4.4 ESTUDOS DE ESPECIAÇÃO: AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS EM CONDIÇÕES QUE SIMULAM OS ENSAIOS BIOLÓGICOS

A especiação química dos produtos **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**, **V<sub>10</sub>** e **MeCl@V<sub>15</sub>** foi avaliada em  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (10%) e do **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** foi avaliada em acetona- $\text{D}_6$  e em dmsO- $\text{D}_6$  pela técnica de RMN de  $^{51}\text{V}$  e nos mesmos solventes não deuterados pela técnica de RPE. Estudos de reatividade foram realizados para todos os compostos em meio RPMI sem adição de soro fetal bovino. As soluções empregadas foram recém preparadas sempre na concentração final de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e os estudos foram realizados nos tempos de 0, 3, 10, 24, 48 e 72 h.

#### 4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

##### 4.5.1 Preparo do material para ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados em câmaras de fluxo laminar Airstream® ESCO Class 2 BSC. Todos os materiais, soluções e meios de cultura empregados nos ensaios biológicos foram esterilizados por filtração em sistema com membrana de 0,22 µm (cultivo celular) ou em autoclave modelo AV-BIO, BIOEX. As culturas bacterianas foram incubadas em estufa de cultura ESCO CelCulture CO<sub>2</sub> INCUBATOR, a 37 °C e centrifugadas em centrífuga LUCADAMA LS-4.

### Preparo do tampão fosfato

O tampão fosfato salino (PBS 1X) foi preparado diluindo 100 mL da solução estoque em 900 mL de água (137 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 2,70 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 10,0 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 1,80 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### Meio de Cultura empregado no cultivo celular

O Meio de cultura utilizado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640,<sup>118</sup> Gibco). A composição do meio é apresentada na TABELA 3. O meio é composto por glutatona, biotina, vitamina B<sub>12</sub>, ácido para aminobenzóico e altas concentrações das vitaminas inositol e colina.

TABELA 3 – Componentes do meio de cultura RPMI de acordo com o fabricante, para 1,00 L de meio líquido.

Componentes	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
Aminoácidos*	971
Vitaminas**	43,7
Glicose	2,00
Fenolsulfonftaleína	5,00
Nitrato de cálcio tetrahidratado	100
Fosfato dissódico heptahidratado	1,51
Sulfato de magnésio heptahidratado	100
Cloreto de potássio	400
Bicarbonato de sódio	2,00
Cloreto de sódio	6,00

\* Arginina, asparagina, ácido aspártico, Cistina, ácido glutâmico, glutamina, glutatona reduzida, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, cloridrato de lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

\*\* Ácido para-aminobenzóico, biotina, pantotenato de cálcio, cloreto de colina, cianocobalamina, ácido fólico, inositol, nicotinamida, cloridrato de piridoxina, riboflavina e cloridrato de tiamina.

Primeiramente, o meio de cultura foi dissolvido em água destilada, e em seguida foram adicionados 2,00 g de bicarbonato de sódio. Após a solubilização, o pH é ajustado entre 7,00 e 7,40. O bicarbonato de sódio foi utilizado com o intuito de

realizar a manutenção do pH fisiológico em um ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Como o RPMI 1640 não contém proteínas, lipídios ou fatores de crescimento, ele é suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Também foram adicionados ao meio os antibióticos para evitar contaminações, anfotericina 2,50 µg mL<sup>-1</sup>, ciprofloxacino 5,00 µg mL<sup>-1</sup>, insulina 5,00 µg mL<sup>-1</sup> e hidrocortisona 5,00 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.5.2 Preparo das soluções estoque para os ensaios biológicos

##### 4.5.2.1 Solução do decavanadato (**V<sub>10</sub>**)

Foram dissolvidos 10,0 mmol (0,024 g) de metavanadato de sódio (NaVO<sub>3</sub>) em 15,0 mL de água deionizada com aquecimento. Após total dissolução, o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 4,00, e o volume foi completado com água deionizada com o intuito de obter uma solução de 20,0 mL do ânion decavanadato na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup>. Essa solução foi mantida à 4 °C por no máximo 7 dias e diluída quando necessário.

##### 4.5.2.2 Solução do hexavanadato (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**)

Foram dissolvidos 1,00 mmol (0,002 g) de V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup> em 2,00 mL de água deionizada ou meio RPMI, para estudos de estabilidade em solução. Obteve-se uma solução límpida após aquecimento brando por 5 minutos ou até completa dissolução, formando uma solução mãe de concentração 1,00 mmol L<sup>-1</sup>. Todos os experimentos foram realizados empregando soluções recém preparadas que foram diluídas para a concentração desejada.

##### 4.5.2.3 Solução do pentadecavanadato (**MeCl@V<sub>15</sub>**)

Foram adicionados 2,00 mL de água deionizada a 1,00 mmol (0,004 g) de **MeCl@V<sub>15</sub>**, o sistema foi aquecido a 100 °C, com agitação magnética, formando uma solução estoque de concentração 1,00 mmol L<sup>-1</sup>, que foi imediatamente utilizada nos ensaios. Os estudos de estabilidade foram realizados com a mesma concentração de **MeCl@V<sub>15</sub>** em meio RPMI, com aquecimento brando e agitação magnética.

#### 4.5.2.4 Solução do octadecavanadato ( $\text{Bu}^{\text{t}}\text{I@V}_{18}$ )

O composto foi solúvel apenas em dmsO e acetona. Portanto, foi preparada uma solução estoque adicionando 0,015 g de  $\text{Bu}^{\text{t}}\text{I@V}_{18}$  ( $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em  $500 \mu\text{L}$  de dmsO, que foi imediatamente diluída em dmsO ( $1,00$  e  $0,100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ou no meio de cultura, conforme as tabelas de diluição constantes no ANEXO 1.

#### 4.5.3 Linhagens celulares empregadas

A MDA-MB-231, fornecida pela ATCC (American Type Culture Collection), é uma linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário, extraída de uma paciente caucasiana de 51 anos de idade em metástase e que sofreu derrame pleural.<sup>119</sup> A HB4a foi adquirida do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre O Câncer, e é uma linhagem celular luminal de epitélio mamário normal imortalizada por vírus símio 40 (SV-40).<sup>120</sup> A linhagem 4T1 (fornecida pela ATCC) é uma linhagem tumoral de mama de camundongos BALB/cfCRH, muito utilizada como modelo animal para humanos em estágio IV de câncer de mama.<sup>121</sup>

As células foram estocadas por meio do congelamento a  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em tubos criogênicos de  $2,00 \text{ mL}$ , contendo  $10^6$  células, em 70% de meio celular RPMI, 10% de dmsO e 20% de soro fetal bovino. Para iniciar o cultivo celular, foi necessário realizar o descongelamento das células, que é feito colocando os tubos criogênicos no banho maria a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 5 min, para em seguida realizar a centrifugação do conteúdo do tubo, e então descartar o sobrenadante. As células foram ressuspendidas no meio celular, transferido para uma garrafa com área de  $25 \text{ cm}^2$  e incubado na estufa a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

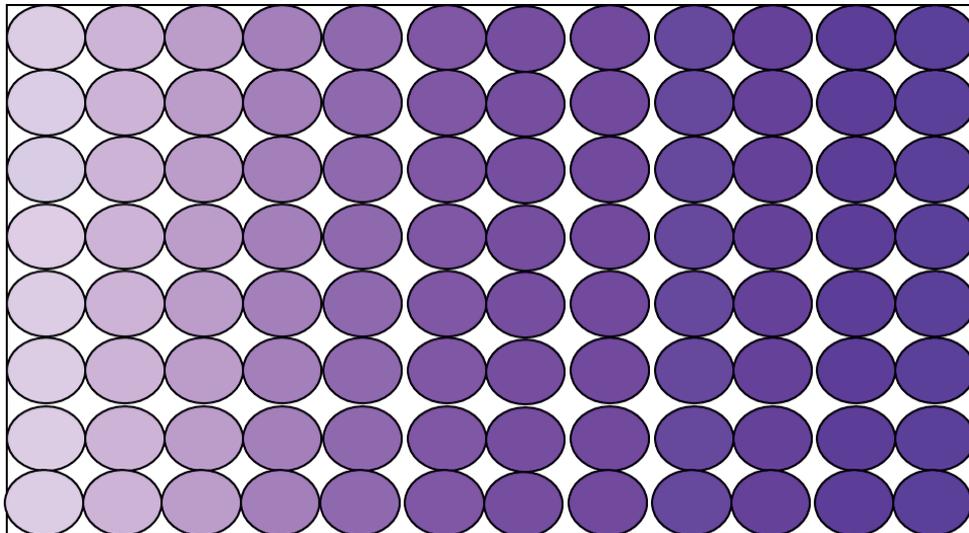
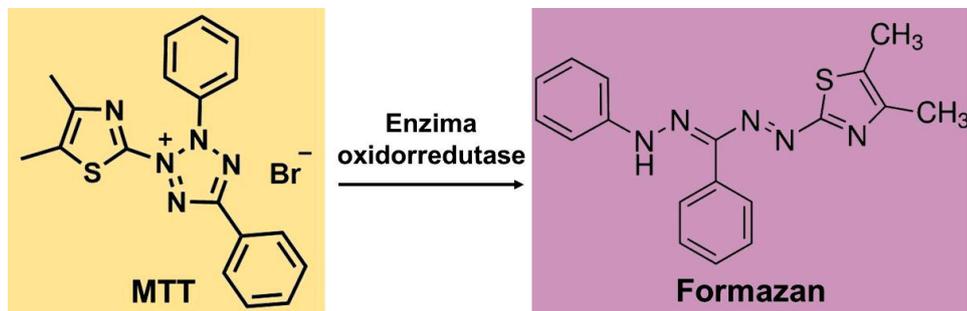
#### 4.5.4 Ensaio de viabilidade mitocondrial

O ensaio de viabilidade mitocondrial é usado para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade, proliferação celular e citotoxicidade. É um ensaio colorimétrico que consiste na redução de um sal amarelo, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), para cristais roxos (formazan) pelas mitocôndrias de células viáveis, que apresentam enzimas

oxidorredutases dependentes de NADPH que reduzem o MTT em formazan (FIGURA 12).<sup>122-125</sup>

Os cristais de formazan formados são dissolvidos usando dmso e a solução roxa resultante é quantificada através da medida de sua absorbância em 540 nm usando um espectrofotômetro para placas de multipoços. A intensidade da cor da solução é proporcional ao número de células viáveis (quanto mais escura, maior o número de células viáveis).

FIGURA 12 – Conversão de MTT em um sal de formazan por meio da enzima oxidorredutase de células viáveis (reação química e placa de 96 poços).

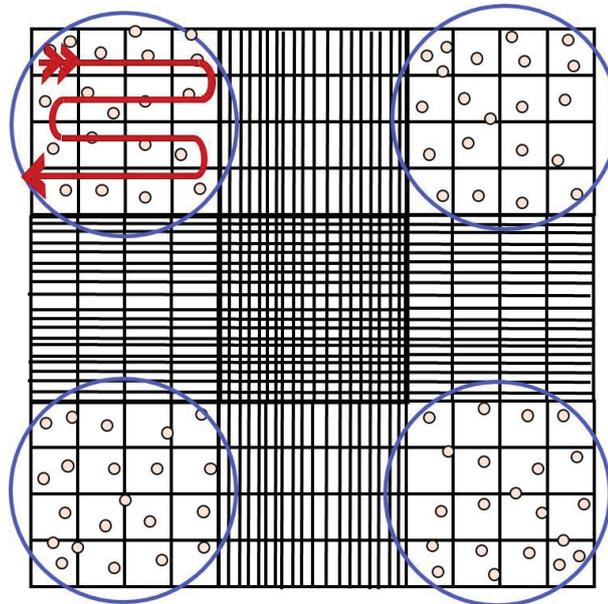


O cultivo das células MDA-MB-231 e HB4a foi realizado em meio RPMI e cultivado como já descrito. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços contendo 5000 células/poço avaliando o efeito sobre a proliferação celular após incubação por 24 h, como descrito a seguir.

### **Etapa 1:**

As células da linhagem previamente cultivadas MDA-MB-231 foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS 1X), e em seguida, foi adicionado 1,00 mL de tripsina com EDTA (Gibco) e incubadas a 37 °C por 5 min, com o intuito de descolar as células da garrafa. Após esse período, a tripsina foi neutralizada com 1,00 mL de RPMI, e a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 4 min. O sobrenadante então foi descartado, e as células foram ressuspensas em 1,00 mL de RPMI, retirando uma alíquota de 10,0  $\mu\text{L}$  e depositando na câmara de Neubauer para contagem das células (FIGURA 13).

FIGURA 13 – Esquema da contagem de células na câmara de Neubauer. As células são contadas em um dos quadrantes circulado em azul, e o resultado é multiplicado por  $10^4$  (quantidade de células em 1,00 mL).



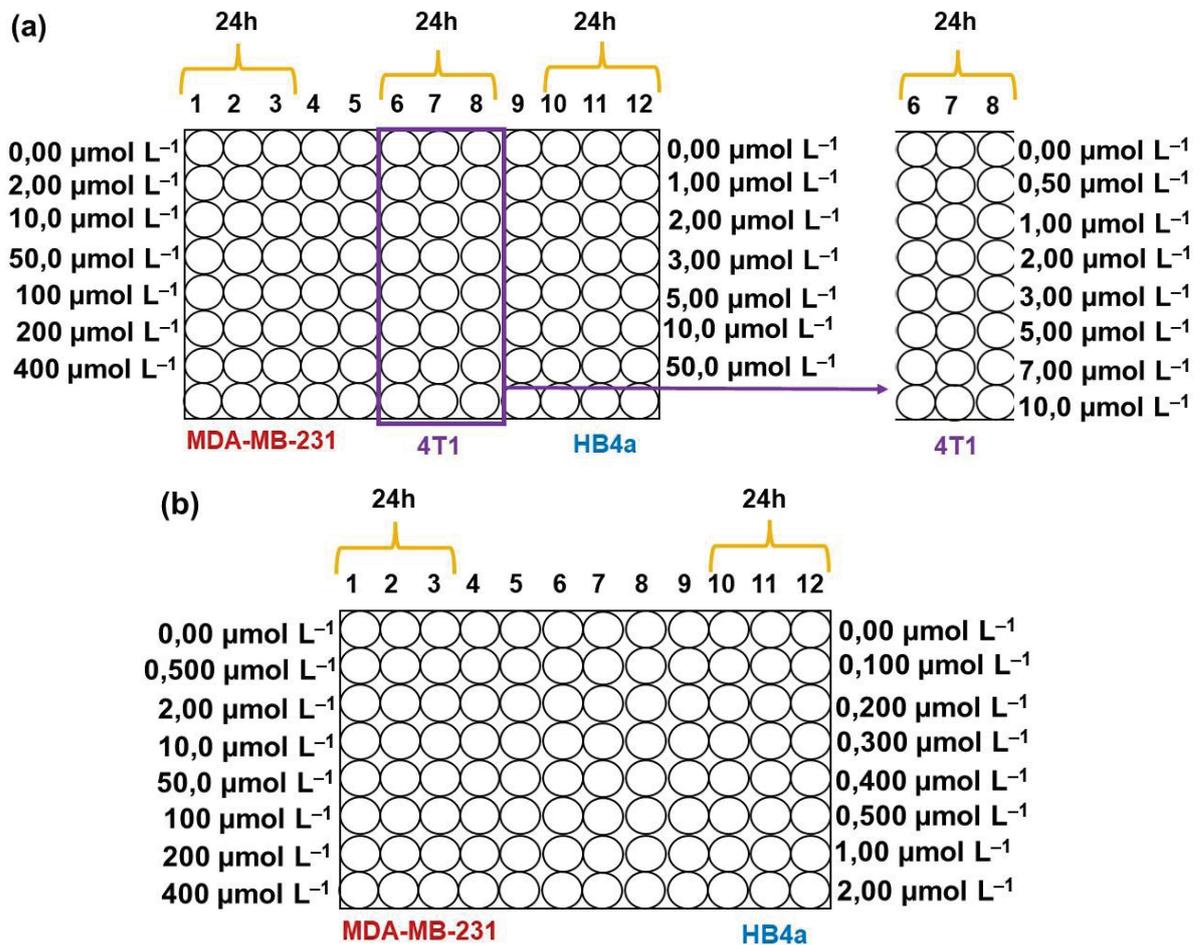
Para cada experimento foram necessárias 5 mil células por poço, e após a contagem de células, foi realizada uma diluição em meio RPMI, para obter o número de células necessário para o experimento. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  das células foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços, e o sistema foi incubado a 37 °C por 2 h, a fim de permitir a adesão celular.

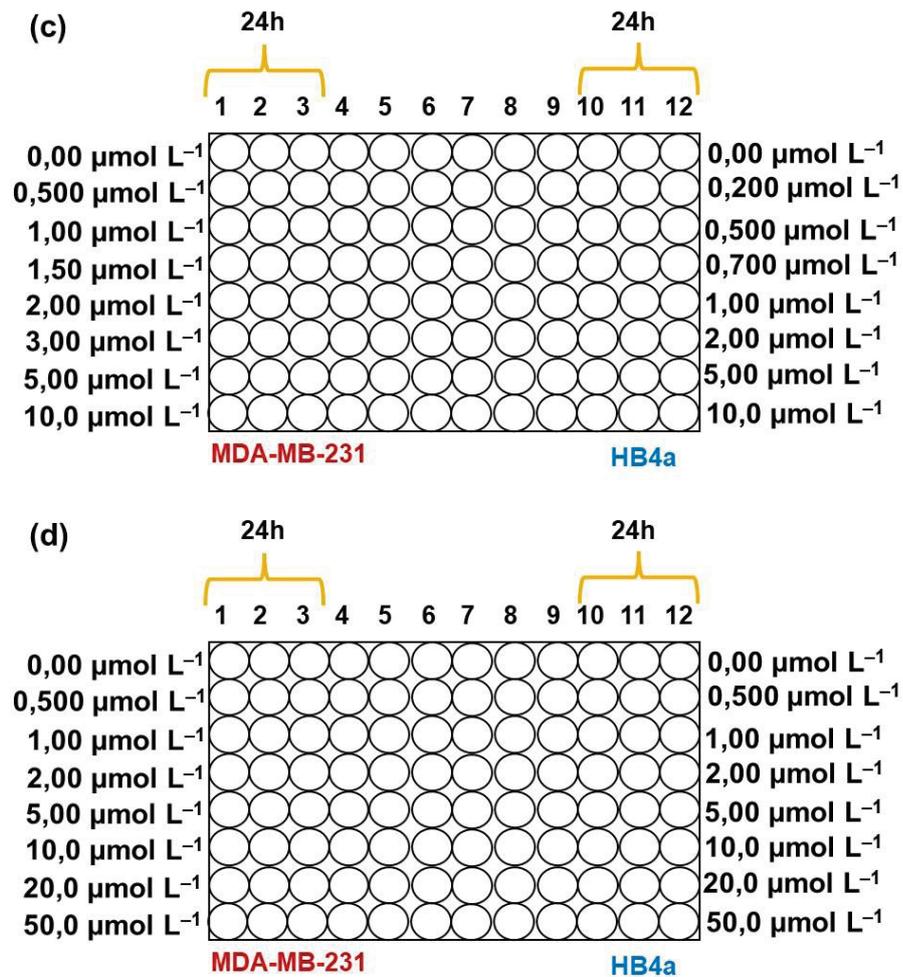
### **Etapa 2:**

Os POVs **MeCl@V<sub>15</sub>**, **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e **V<sub>10</sub>** foram dissolvidos em água, utilizando soluções mãe em concentrações de 10,0, 100 e 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e o **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** foi dissolvido em dmsO, empregando soluções mãe de concentrações de 100, 1000 e

10000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Essas soluções foram esterilizadas utilizando filtros para seringa membrana 0,20  $\mu\text{m}$  estéril, prosseguindo com diluições em meio RPMI mostradas na TABELA A1 (para dissolução em água) e na TABELA A2 (para dmsO) no ANEXO 1. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração em cada poço da placa de 96 poços, realizando o procedimento em triplicata para cada concentração. No controle, foi adicionado apenas 100  $\mu\text{L}$  de RPMI (zero), como ilustrado na FIGURA 14, e o sistema foi incubado a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

FIGURA 14 – Esquema do plaqueamento das amostras na placa de 96 poços nas linhagens celulares MDA-MB-231, HB4a e 4T1 para  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  em (a), e nas linhagens MDA-MB-231 e HB4a para (b)  $\text{MeCl}@V_{15}$ , (c)  $V_{10}$  e (d)  $\text{Bu}^{\text{I}}@V_{18}$ .





### Etapa 3:

Na última etapa, o meio de cultura foi aspirado, lavado com PBS 1X e 100  $\mu\text{L}$  de MTT (5,00 mg/mL) foram adicionados em cada poço, seguido de incubação por 3 h. Após esse tempo, com o auxílio do microscópio, observou-se a formação de cristais roxos em algumas concentrações (formazan), o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de dms, para dissolver o formazan. A placa foi então levada para leitura em espectrofotômetro de multiplaca MULTISKAN SkyHigh no comprimento de onda de 540 nm.

### Estatística:

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração no meio de cultura necessária para reduzir o número de células viáveis (viabilidade mitocondrial) para 50%) foram calculados com o Software GraphPad Prism 8.4.2. para Windows. GraphPad Software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

Os valores de viabilidade celular foram expressos como médias aritméticas, com desvio padrão calculado para três experimentos independentes. As diferenças entre os múltiplos grupos e os controles, 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.

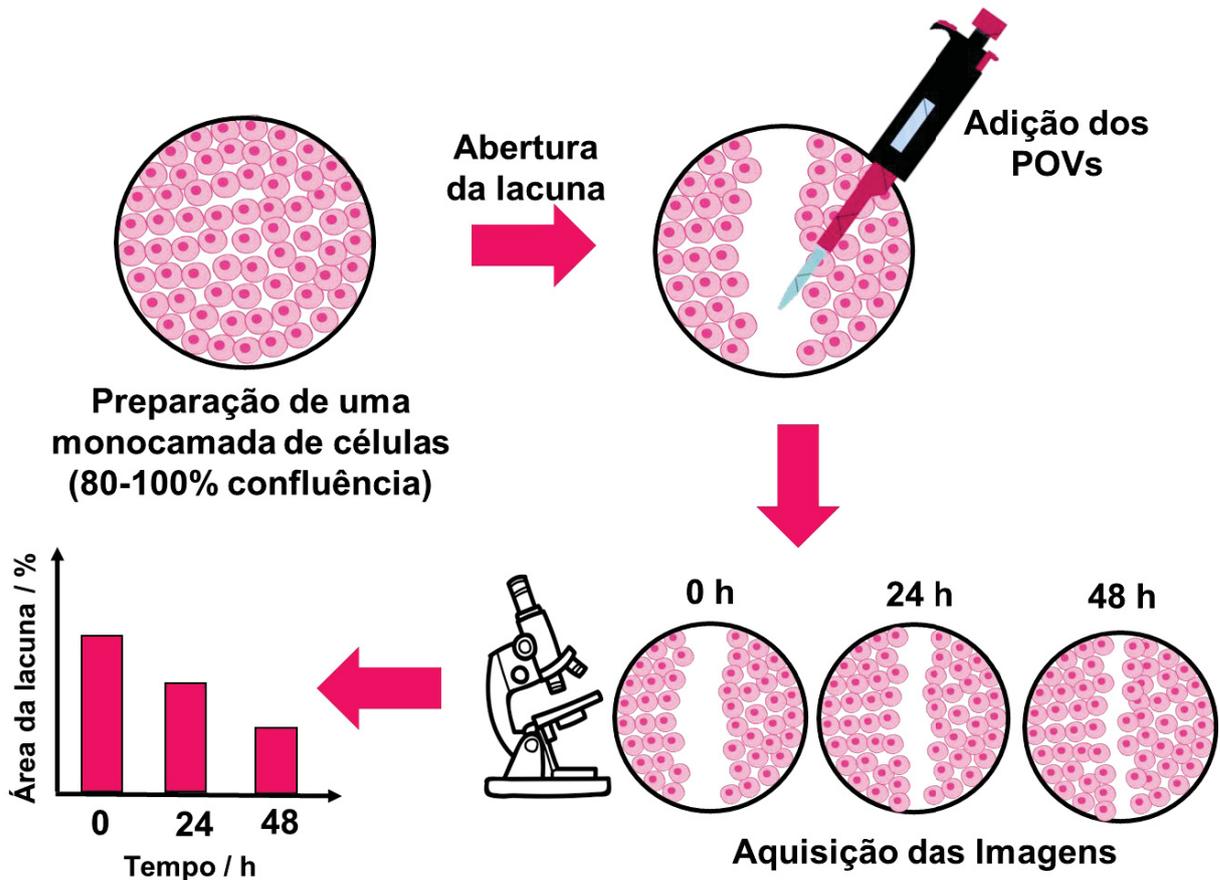
#### 4.5.5 Determinação da curva de tempo na concentração de $IC_{50}$

A partir dos resultados do ensaio de viabilidade mitocondrial, foi realizada uma curva de tempo para a linhagem celular MDA-MB-231 com  $V_6L^{Et}$ ,  $MeCl@V_{15}$  e  $V_{10}$ , utilizando o valor de concentração encontrado como  $IC_{50}$ , e os tempos de incubação de 24, 48 e 72 h, com o intuito de estudar o efeito inibitório de crescimento celular dos POVs ao longo do tempo.

#### 4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – WOUND HEALING

A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em placas de 6 poços, com a adição de 600 mil células por poço, de modo a atingir de 90 a 100% de confluência. Após adesão celular, o soro fetal bovino (SFB) foi depletado do meio de cultivo por 4 h e uma abertura, em linha reta, através da monocamada celular foi feita com uma ponteira de 200  $\mu$ L. Adicionou-se então  $V_6L^{Et}$  (4,50 e 8,50  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ),  $V_{10}$  (0,450 e 0,900  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ) e  $MeCl@V_{15}$  (0,500 e 0,100  $\mu$ mol  $L^{-1}$ ) e após os tratamentos, as culturas foram incubadas a 37 °C e 5% de  $CO_2$ , com meio RPMI com 1% de soro fetal bovino. A área da abertura foi fotografada e mensurada utilizando o software ImageJ® nos tempos 0, 24 e 48 h, para análise da migração celular (FIGURA 15).<sup>126</sup>

FIGURA 15 – Esquema do ensaio de migração celular (Wound Healing).



#### 4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM CELULAR MDA-MB-231

A linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB231, foi cultivada em meio RPMI1640 (Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultlab), 5,00 mg/mL de ciprofloxacino e 250 mg/mL de Anfotericina B. As células foram mantidas em uma incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. A linhagem celular foi cultivada em 9 placas de cultivo P100, com a adição de 710 mil células em cada placa, seguido da adição de 13,0 mL de meio de cultivo, totalizando aproximadamente 6 milhões de células, para que após o tratamento com V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup> na concentração obtida de IC<sub>50</sub>, ainda restassem cerca de 3 milhões de células, quantidade suficiente para realizar a extração de RNA.

## Tratamento

As células cultivadas nas placas de cultivo P100 foram mantidas incubadas por 2 h antes do tratamento, a fim de permitir a adesão celular. Após esse período, a concentração obtida para a IC<sub>50</sub> do composto **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** (17,6 μmol L<sup>-1</sup>) foi adicionada em cada placa, e o sistema foi mantido em incubação por 24 h à 37 °C.

## Extração de RNA

Para extração do RNA da linhagem MDA-MB-231 tratada e controle, foi utilizado o kit All prep DNA/RNA (Qiagen), conforme especificações do fabricante.

Primeiramente, o tampão RLT plus foi preparado, utilizando 1,00 mL de tampão RLT e 10,0 μL de beta-mercaptoetanol. A composição exata do tampão RLT é confidencial pela (Qiagen), mas ele possui alta concentração de isotiocianato de guanidina, que suporta a ligação do RNA à membrana de sílica.

As culturas de células da linhagem MDA-MB-231, tratada e controle, foram soltas das placas com o auxílio de Tripsina (Gibco) e centrifugadas afim de conseguir um pellet de células. Ao pellet, foi adicionado 600 μL do tampão RLT plus e transferido para um tubo de 2,00 mL, adicionando-se 50,0 μL de proteinase K e 200 μL de etanol, misturado e incubado por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se mais 400 μL de etanol, que foram então transferidos para coluna rosa do kit (RNeasy) contendo um tubo coletor. Esse sistema foi centrifugado por 15 s à 20.000 rpm, o filtrado foi descartado e a coluna recolocada no tubo coletor. Em seguida, 500 μL de RPE foram adicionados na coluna, e novamente centrifugados por 15 s, descartando-se o filtrado.

Após esse processo, foi preparada uma solução em um tubo de 1,50 mL com 70,0 μL do buffer RDD e 10,0 μL de DNase e misturado por inversão. A mistura DNase + RDD foi transferida para coluna rosa e incubada por 15 min à temperatura ambiente, adicionando-se 500 μL do buffer FRN à coluna, seguido de centrifugação por 15 s e 15.000 rpm.

A coluna foi transferida para um outro tubo coletor, e recolheu-se o que passou na etapa anterior e foi colocado novamente na coluna. Seguindo-se com a centrifugação por 15 s à 20.000 rpm, e descartando-se o filtrado. Então, 500 μL do

buffer RPE foram adicionados à coluna e centrifugados por 15 s à 20.000 rpm, descartando-se o filtrado.

Adicionou-se 500 µL de etanol à coluna, seguido de centrifugação por 2 min. A coluna foi transferida para um outro tubo coletor e centrifugada por 2 min, e então transferida novamente para um tubo de 1,50 mL identificado, adicionando-se 30,0 µL de água livre de RNase, seguido de incubação por 1 min e centrifugação por 1 min à 10.000 rpm. Esse último processo foi repetido e o eluente da coluna reinserido e centrifugado.

### Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando o kit de síntese SuperScript IV (Invitrogen). A concentração do RNA extraído da amostra tratada foi de 1523 ng/µL e da amostra controle foi de 508 ng/µL. Para a síntese foram utilizados 2000 ng/µL de RNA, 2,00 mmol L<sup>-1</sup> de dNTP, 0,400 mmol L<sup>-1</sup> de oligodT e Randon primer e água DEPC para completar 13,5 µL, e o sistema foi aquecido a 65°C por 5 min. Após esse período, os tubos foram colocados em gelo por 1 min, sendo adicionados a eles 4,00 µL de PBS 5X, 0,200 mmol L<sup>-1</sup> de ditioneitol (DTT), 20 U de inibidor de ribonuclease, e 100 U de Superscript IV, e o sistema foi então incubado em termociclador a 50 °C por 10 min e 80 °C por 10 min.

### Quantificação gênica

Foram quantificados os seguintes genes: VEGF, BCL2, TP53, RIPK3, CASP8, PIK3 e BAX. A quantificação desses genes foi feita utilizando 1,00 µL de cDNA na diluição 1:5 dos oligonucleotídeos na concentração de 60 nmol L<sup>-1</sup>, 3,00 µL SYBR Green Power Master mix (Applied Biosystems) água DEPC suficiente para 6,00 µL e colocado para amplificar no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems). Os valores de ciclo threshold (Ct) foram submetidos a análise de 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Livak and Schmittgen 2001) utilizando o gene *GAPDH* como normalizador. Os iniciadores utilizados nestas reações estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 – Iniciadores utilizados na quantificação gênica para a espécie *Homo Sapiens*

Gene	Sequência de iniciadores Universais e Reversos (5' - 3')
VEGF	U:ACTGGACCCTGGCTTTACTGCT e R: TGATCCGCATGATCTGCATGGTG
BCL2	U:CACTTGCCACTGTAGAGA R: GCTTCACTGCCTCCTT

---

TP53	U: AGCTACGGTTTCCGTCTGGG R: CTTGTTGAGGGCAGGGGAGT
RIPK3	U:CCAGAGGCCACTTGTGTAGCG e R: CGCTTTAGAAGCCTTCAGGTTGAC
CASP8	U: ATGGCTACGGTGAAGAAGTGGC R: ATCAAGAGCGGTCAGTCCTAC
BAX	U: GCCTCCTCCTACTTC R: CCTCAGCCCATCTTCTT
GAPDH	U:GGTGAAGCAGGCATCT e R: TGTTGAAGTCGCAGGAG

---

#### 4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS LINHAGENS CELULARES MDA-MB-231 E HB4A

Em uma placa de 24 poços, foram acondicionadas lamínulas circulares de 0,130 mm de diâmetro, já limpas e esterilizadas. Em seguida, foram adicionadas 30 mil células por poço, e incubadas por 2h a 37 °C. Após esse período, foram adicionadas diferentes concentrações de  $V_6L^{Et}$  (4,50 e 8,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $V_{10}$  (0,450 e 0,900  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), além do controle sem tratamento, e o sistema foi incubado por 24 h a 37 °C.

##### **Fixação Celular**

As células foram então lavadas com cacodilato de sódio 0,100 mol  $L^{-1}$  e fixadas com glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,100 mol  $L^{-1}$ , em pH 7,20, e mantidas por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com cacodilato de sódio 0,100 mol  $L^{-1}$  com um intervalo de 10 min entre cada lavagem, e fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,100 mol  $L^{-1}$  e pH 7,20 por 30 min na ausência de luz. Novamente foram lavadas 2x com cacodilato de sódio 0,100 mol  $L^{-1}$  com um intervalo de 10 min entre as lavagens.

##### **Desidratação**

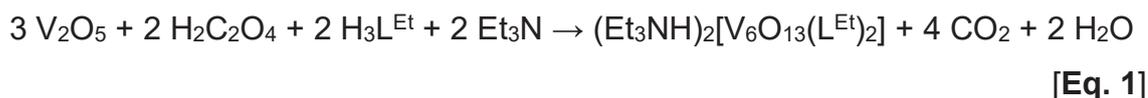
Na etapa de desidratação, as células são lavadas com álcool em diferentes concentrações (de 50% a 100%) com um intervalo entre as lavagens de 10 min. As lavagens com as concentrações a partir de 70% foram realizadas no dia da realização do ponto crítico pelo Centro de Microscopia Eletrônica, e a lavagem com álcool 100% foi realizada duas vezes. Após a realização do ponto crítico, as amostras foram

metalizadas com ouro e as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARAÇÃO DO HEXAVANADATO $V_6L^{Et}$

A reação de  $V_2O_5$  com ácido oxálico, seguida da adição de 1,1,1-tris(hidroximetil)propano ( $L^{Et}$ ) e trietilamina (Equação 1) produziu um sólido cristalino no formato de paralelepípedos alaranjados, que foi caracterizado por difração de raios X de monocristal e de pó, análise elemental e espectroscopia na região do infravermelho como  $(C_8H_{20}N)_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ). A rota de síntese que leva a obtenção de  $V_6L^{Et}$  puro e em bom rendimento foi desenvolvida pelo Dr. Gabriel Barros Baptistella e foi descrita em detalhes em sua tese concluída em março de 2024 <sup>117</sup>.



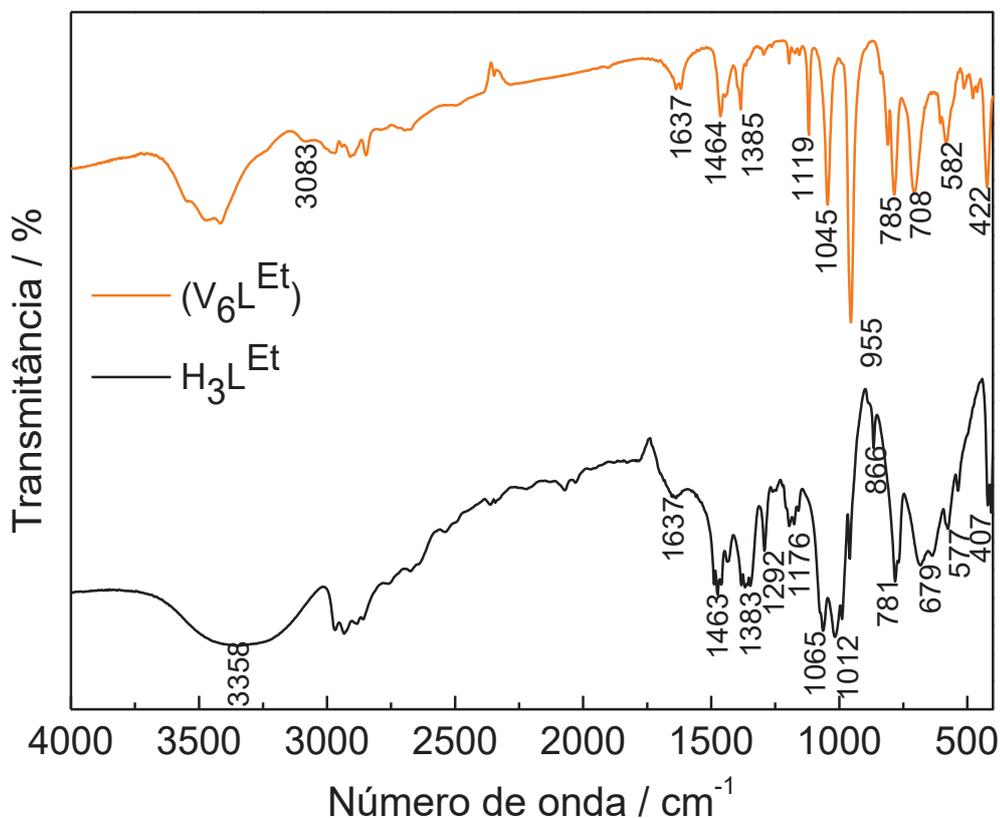
O espectro de IV registrado para  $V_6L^{Et}$  está apresentado na FIGURA 16 e as principais bandas de absorção e as atribuições tentativas estão listadas na TABELA 5. Os modos vibracionais característicos de polioxovanadatos  $\nu(V=O)$  e  $\nu(V-O-V)$  foram observados em  $955\text{ cm}^{-1}$  e em  $785$  e  $708\text{ cm}^{-1}$ , enquanto as bandas em  $582$  e  $422\text{ cm}^{-1}$  são referentes a  $\nu(V-O)$  e  $\delta(V-O)$ , respectivamente. As bandas em  $1385\text{ cm}^{-1}$  para  $\delta(CH_3)$  e em  $1637$  e  $1464\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a  $\nu(CO)$  e  $\nu(CC)$  do esqueleto carbônico dos grupamentos  $(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}^{3-}$ ,  $(L^{Et})^{3-}$ . <sup>127,128</sup>

TABELA 5 – Atribuições tentativas das bandas de absorção registradas na região do infravermelho para o produto  $V_6L^{Et}$  e do pré-ligante  $H_3L^{Et}$ .

Atribuição Tentativa	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	$V_6L^{Et}$	$H_3L^{Et}$
$\nu(O-H)$	-	3358
$\nu(N-H)$	3083	-
$\nu(CO)$ e $\nu(CC)$	1637 e 1464	1637 e 1463
$\delta(CH_3)$	1385	1383
$\nu(CO)$	1045	1065 e 1012
$\nu(V=O)$	955	-
$\nu(V-O-V)$	785 e 708	-
$\nu(V-O)$ e $\delta(V-O)$	582 e 422	-

$\nu$  = estiramentos simétricos e antissimétricos;  $\delta$  = deformação angular.

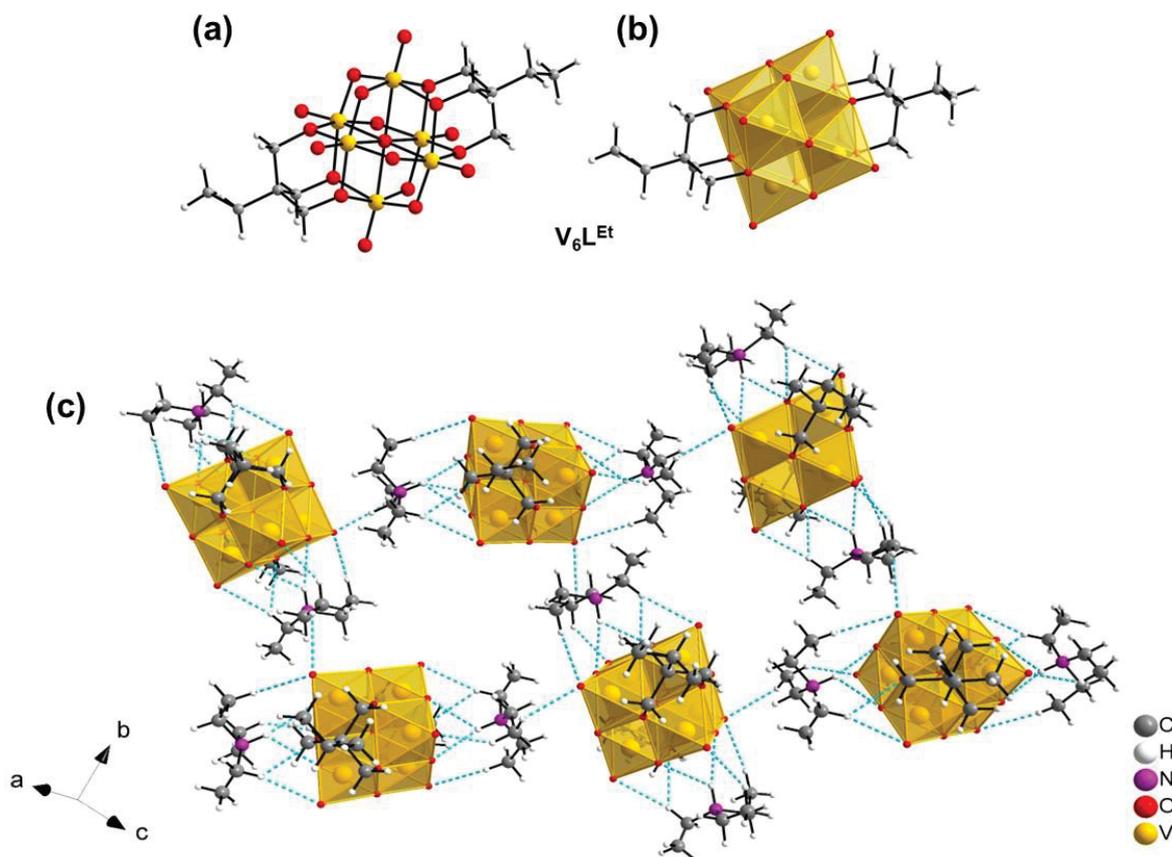
FIGURA 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho registrado para o produto  $V_6L^{Et}$  e do pré-ligante  $H_3L^{Et}$ .



A determinação dos parâmetros de célula unitária dos cristais preparados no desenvolvimento deste trabalho ( $a = 12,0400 \text{ \AA}$ ,  $b = 12,633 \text{ \AA}$  e  $c = 12,0834 \text{ \AA}$ , e ângulos  $\alpha = \gamma = 90^\circ$  e  $\beta = 100,95^\circ$ ) confirmou a obtenção do produto desejado.<sup>117</sup> Os cristais de  $V_6L^{Et}$  cristalizam no sistema monoclinico,  $P2_1/n$  e a estrutura é compreendida por um ânion hexavanadato funcionalizado com dois ligantes trisalcóxido ( $L^{Et}{}^{3-}$  e dois contraíons tetraetilamônio ( $Et_4N^+$ ) (FIGURA 17). Os seis grupos oxidovanádio(V) do polioxiânion possuem uma geometria octaédrica distorcida, unidos por seis ligantes óxidos em ponte dupla ( $\mu_2\text{-O}$ ) e por um ligante óxido central em ponte sêxtupla ( $\mu_6\text{-O}$ ), que se encontra localizado no centro de inversão do agregado.

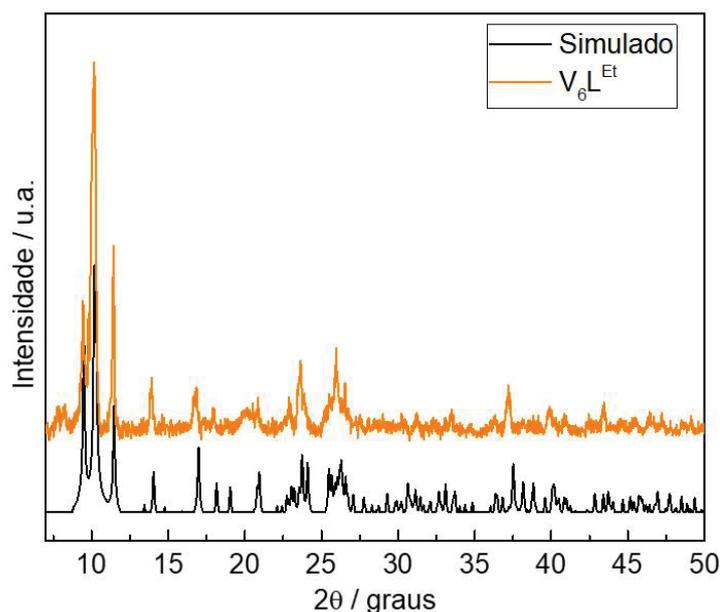
No empacotamento cristalino do  $V_6L^{Et}$  não ocorre interação direta entre os ânions hexavanadatos. Os cátions trietilamônio e os oxigênios  $\mu_2\text{-O}$  do POV interagem por intermédio de uma ligação de hidrogênio forte do tipo  $N\text{-H}\cdots\text{O}$  e estão envolvidos em uma extensa rede de interações intermoleculares fracas a moderadas do tipo  $C\text{-H}\cdots\text{O}$  (FIGURA 17).

FIGURA 17 – Representação do ânion de  $(C_8H_{20}N)_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ) (a) modelo de bolas e bastão e (b) modelo de poliedros. (c) Empacotamento cristalino de  $V_6L^{Et}$  segundo os eixos. As linhas pontilhadas azuis representam as ligações de hidrogênio.



O produto  $V_6L^{Et}$  foi caracterizado por análise elementar (Teores em % m/m: calculado com base na formulação  $C_{24}H_{54}N_2V_6O_{19}$ , onde C, 29,41; H, 5,55; N, 2,86; V, 31,2 e obtido C, 29,34; H, 5,63; N, 2,91; V, 29,2) e por difração de raios X de pó (FIGURA 18). O difratograma de pó registrado para os cristais alaranjados apresenta boa correlação com o difratograma gerado a partir dos dados cristalográficos de  $(C_8H_{20}N)_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_2]$ , indicando a obtenção do produto com alto grau de pureza cristalina. Os principais picos de difração observados no difratograma de pó em  $2\theta$  ( $^\circ$ ) são: 9,42; 10,1; 11,4; 13,9; 16,8; 22,9; 23,6; 26,0 e 37,2.

FIGURA 18 – (a) Difratoograma de raios X de pó registrado para  $V_6L^{Et}$  (linha laranja) e o simulado a partir do cristal de  $V_6L^{Et}$  (linha preta).



Um dos primeiros estudos de funcionalização de POVs com ligantes trisalcóxidos foi descrito por Zubieta et. al. em 1992, obtendo-se quatro hexavanadatos do tipo Lindqvist funcionalizados.<sup>65</sup> O POV  $[(n-C_4H_9)_4N]_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_2]$  apresenta a mesma estrutura do POV em  $V_6L^{Et}$ , mas com o contraíon tertrabutílamônio.<sup>65</sup> Ao contrário de  $V_6L^{Et}$ , o POV com o cátion  $(n-C_4H_9)_4N^+$  não foi isolado na forma cristalina e a formulação publicada foi proposta por analogia com os outros hexavanadatos relatados no mesmo artigo.

A aplicação de hexavanadatos funcionalizados ainda é menos explorada do que outros POVs, devido à dificuldade de controlar as frequentes reações colaterais redox e baixos rendimentos.<sup>129</sup> Nos últimos anos, tem surgido novas metodologias mais brandas viabilizando a preparação de estruturas mais complexas. Especificamente com o ligante  $(L^{Et})^{3-}$ , outros exemplares desta subclasse foram descritos, no entanto estes possuem o vanádio no estado de oxidação +IV. Outros  $V_6$  foram obtidos por sínteses hidrotérmicas e apresentam diferentes proporções entre o arcabouço metálico e o ligante. Dentre eles, Khan et.al.<sup>130</sup> descreveu o  $Na_2[V_6O_7\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_4]$  de coloração azul, em que todos os grupos oxido em ponte dupla do  $V_6$  foram substituídos por 4 ligantes  $(L^{Et})^{3-}$ . A reação entre  $NH_4VO_3$ ,  $H_5C_2C(CH_2OH)_3$  e  $N_2H_4 \cdot H_2O$ , um reagente fortemente redutor, na proporção de 3: 1,5: 1, rendeu cristais azuis do arcabouço  $(NH_4)_2[V^{IV}_6O_7(OH)_3\{(OCH_2)_3CC_2H_5\}_3] \cdot 4H_2O$  contendo 3 ligantes  $(L^{Et})^{3-}$  por  $V_6$ .<sup>127</sup>

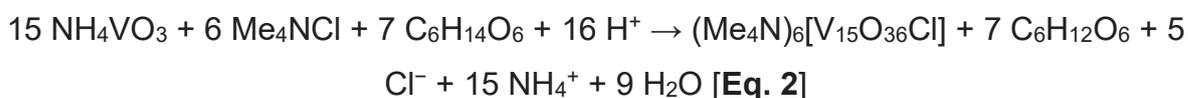
## 5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIOXOVANADATOS DE VALÊNCIA MISTA

Na última década, nosso grupo de pesquisa concentrou esforços para desenvolver POVs-VM em alto grau de pureza e bons rendimentos, que sejam obtidos por métodos de síntese brandos e empregando reagentes comercialmente disponíveis e de baixo custo. Exemplos de sucesso são o  $\text{K}(\text{NH}_4)_5[\text{H}_6\text{V}^{\text{IV}}_2\text{V}^{\text{V}}_{12}\text{O}_{38}(\text{PO}_4)] \cdot 11\text{H}_2\text{O}$  (**V<sub>14</sub>**)<sup>72</sup>,  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}^{\text{IV}}_8\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{36}\text{Cl}]$  (**V<sub>15</sub>**),<sup>71</sup>  $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}^{\text{IV}}_{12}\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{42}\text{I}] \cdot \text{Me}_4\text{NI} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ <sup>73</sup> (**V<sub>18I</sub>**) e  $[\{\text{K}_6(\text{OH}_2)_{12}\text{V}^{\text{IV}}_{11}\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{41}(\text{PO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}\}]_n$ <sup>73</sup> (**V<sub>18P</sub>**). Os estudos de estabilidade realizados em solução aquosa demonstraram que os POVs-VM contendo haletos encapsulados são mais estáveis do que aqueles contendo fosfatos. A estabilidade de **V<sub>14</sub>** e de **V<sub>18P</sub>** mostrou-se dependente da concentração de cada composto, no entanto, ambos são susceptíveis a oxidação do  $\text{V}^{\text{IV}}$  a  $\text{V}^{\text{V}}$  e sofrem especiação em solução formando outros POV-VM,  $\text{V}_{10}$  e/ou oligovanadatos de menor nuclearidade.

O  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}^{\text{IV}}_8\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{36}\text{Cl}]$  (**V<sub>15</sub>** ou **MeCl@V<sub>15</sub>** neste trabalho), foi inicialmente descrita por Muller<sup>131</sup> e mais recentemente nosso grupo de pesquisa publicou uma metodologia alternativa que utiliza reagentes comerciais de baixo custo e metodologia mais branda.<sup>71</sup> Visando ampliar o número de compostos disponíveis com os arcabouços mais estáveis, iniciou-se um estudo sistematizado para avaliar o efeito de variações dos contraíons alquilamônio. Para tal, foi preparado um novo composto, variando-se o cátion  $\text{Me}_4\text{N}^+$  de **MeI@V<sub>18</sub>** por  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ .

### 5.2.1 Preparação do pentadecavanadato **MeCl@V<sub>15</sub>**

O composto **MeCl@V<sub>15</sub>** foi obtido na forma de cristais verde-escuros (Equação 2) que foram caracterizados por DRX de pó e DRX de monocristal e por espectroscopia na região do infravermelho, como intuito de verificar se o produto estava contaminado com o  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$ , um óxido do tipo *fresnoite* que se forma como impureza quando a reação não é conduzida em condições otimizadas.<sup>71</sup>



O espectro de IV de **MeCl@V<sub>15</sub>** apresentou bandas correspondentes às vibrações características de POVs em 979 cm<sup>-1</sup> referente a  $\nu(\text{V}=\text{O})$  (FIGURA 19 e TABELA 6), além de bandas em 729 e 796 cm<sup>-1</sup> para  $\nu(\text{V}-\text{O}-\text{V})$ , 1483 e 1417 cm<sup>-1</sup> referentes a  $\delta(\text{CH}_3)$  e em 3032 e 2946 cm<sup>-1</sup> referentes a  $\nu_{\text{as}}$  e  $\nu_{\text{s}}$  (CH<sub>3</sub>).<sup>132</sup>

FIGURA 19 – Espectro de absorção na região do infravermelho registrado para o produto **MeCl@V<sub>15</sub>**.

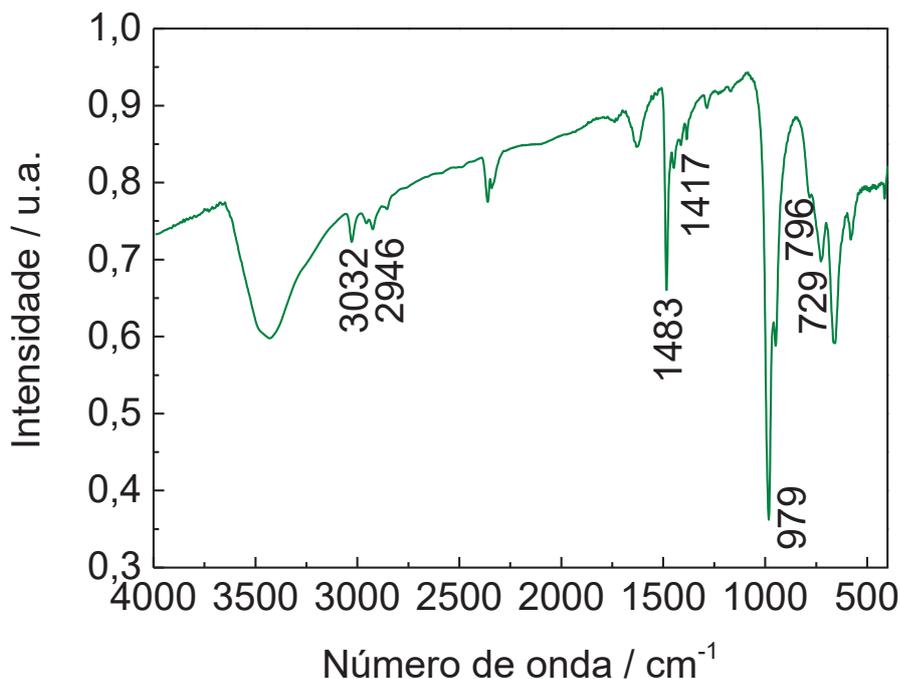


TABELA 6 – Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV do produto **MeCl@V<sub>15</sub>**

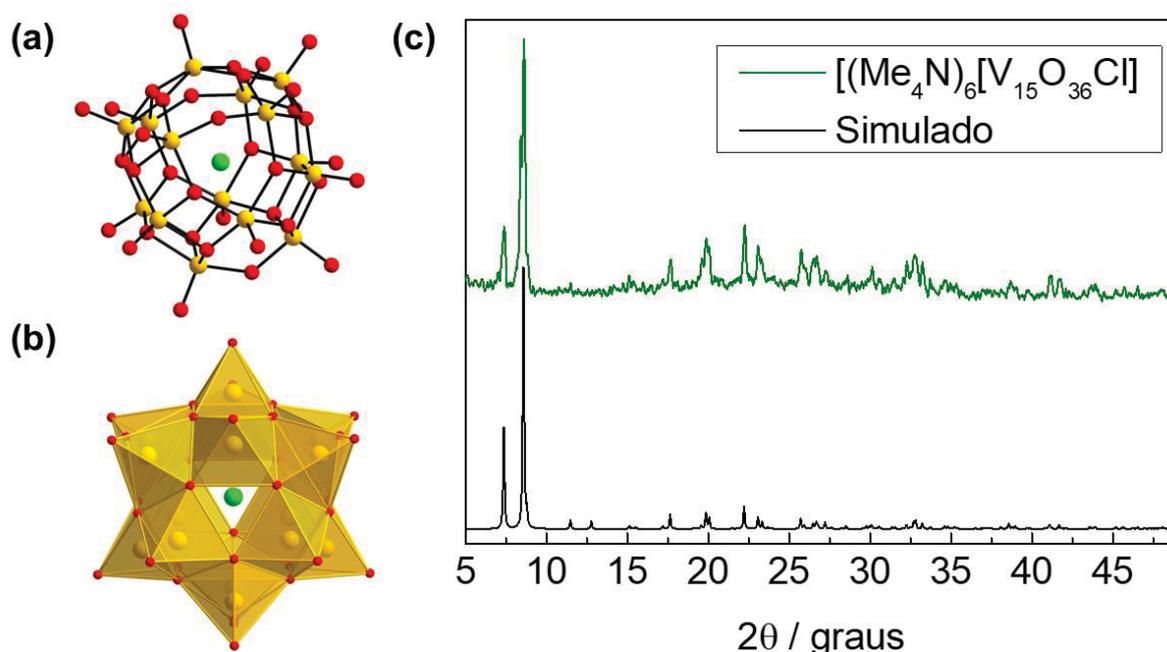
Atribuição Tentativa <sup>133,134</sup>	<b>MeCl@V<sub>15</sub></b> <sup>71</sup>
$\nu(\text{V}=\text{O})$	979
$\nu(\text{V}-\text{O}-\text{V})$	729 e 796
$\delta(\text{CH}_2-\text{CH}_3)$	-
$\delta(\text{CH}_3)$	1483 e 1417
$\nu_{\text{as}}$ e $\nu_{\text{s}}$ (CH <sub>3</sub> )	3032      946

$\nu$  = estiramentos simétricos e antissimétricos;  $\delta$  = deformação angular

Os cristais de **MeCl@V<sub>15</sub>** cristalizam no sistema Hexagonal, *P6<sub>3</sub>/mmc*, e apresentaram parâmetros de cela unitária:  $a = 13,8522 \text{ \AA}$ ,  $b = 13,8522 \text{ \AA}$ ,  $c = 20,0991 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$ . O **MeCl@V<sub>15</sub>** é um polioxovanadato pseudoesférico de valência mista contendo um cloreto encapsulado (FIGURA 20). O agregado apresenta 15 centros de vanádio (8 V<sup>IV</sup> e 7 V<sup>V</sup>) em geometria piramidal de base quadrada distorcida, com um grupo oxidovanádio terminal na posição apical de cada centro metálico.<sup>71</sup>

O DRX de pó registrado para **MeCl@V<sub>15</sub>** (FIGURA 20) apresenta boa correlação com os picos gerados a partir dos dados cristalográficos reportados para  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}^{\text{IV}}_8\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{36}\text{Cl}]$ .<sup>71</sup> As análises apresentadas confirmam que o POV-VM foi obtido em alto grau de pureza em todo o lote do material isolado. Os principais picos no difratograma em  $2\theta$  (°) são: 7,38; 8,60; 17,7; 19,9; 22,3; 23,1; 25,8; 26,7 e 32,8.

FIGURA 20 – Representação do ânion  $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]^{6-}$  em (a) bolas e bastão e (b) poliedros. Legenda: amarelo = vanádio, vermelho = oxigênio e verde = cloreto. (c) Difratogramas de raio X de pó registrados para **MeCl@V<sub>15</sub>** (linha verde) e o simulado a partir do cristal de  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}^{\text{IV}}_8\text{V}^{\text{V}}_7\text{O}_{36}\text{Cl}]$  (linha preta).<sup>71</sup>



### 5.2.2 Preparação do POV-VM contendo iodeto encapsulado e tetrabutilamônio como contraíon

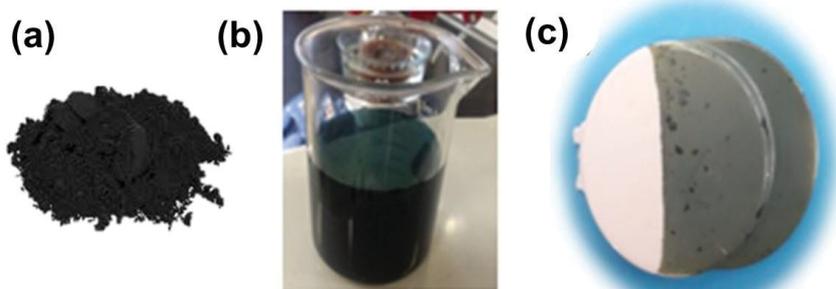
Iniciamos nossos estudos da influência de diferentes contraíons em POVS-VM pelo octadecavanadato contendo iodeto encapsulado. Para tal, foi realizada uma reação adaptando-se a rota que gerou  $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_5[\text{V}^{\text{IV}}_{12}\text{V}^{\text{V}}_6\text{O}_{42}]\cdot\text{Me}_4\text{NI}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (**V<sub>18</sub>I**),<sup>73</sup> substituindo-se o  $(\text{Me}_4\text{N})\text{I}$  por  $(\text{Bu}_4\text{N})\text{I}$  como fonte de iodeto. A reação entre  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , manitol e o sal de iodeto  $(\text{Bu}_4\text{N})\text{I}$  foi realizada na proporção de (1:2:4), em água sob refluxo e agitação magnética por 24 h. Neste sistema foi observada uma mudança na coloração da solução, passando de amarelo para amarelo esverdeado e em seguida para verde-escuro **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**. A mudança de coloração sugeriu a

ocorrência da redução, mesmo que parcial, dos centros de vanádio(V) para vanádio(IV).

Ao final da reação foi isolado um sólido preto que foi identificado como  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$  por DRX de pó, compatível com a carta da base de dados JCPDS (*International Centre for Diffraction Data*) nº 51-1733. Este produto já foi anteriormente descrito pelo grupo como insolúvel em água e solventes orgânicos polares e apolares.<sup>71</sup> Por não ser de interesse deste trabalho, as caracterizações realizadas para este produto só serão apresentadas quando necessárias para comparação.

A solução de reação verde-escura límpida obtida após a filtração foi deixada em repouso sob a bancada, rendendo um filme verde, sem rachaduras e translúcido, que foi lentamente depositando-se nas paredes do béquer à medida que o solvente foi evaporando (FIGURA 21). Após uma semana, o filme foi retirado do béquer por raspagem rendendo um sólido verde-escuro (**Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**), com rendimento de 36%. O produto **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** foi solúvel em solventes orgânicos polares, como acetona, dimetilformamida (dmf) e dimetilsulfóxido (dmsO), parcialmente solúvel em diclorometano e insolúvel em água, tetraidrofurano, acetonitrila, acetato de etila, isopropanol e etanol.

FIGURA 21 – Em (a) sólido preto obtido  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$ . Filmes em superfície de vidro (b) e de plástico (c) pela reação entre  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , manitol e  $(\text{Bu}^t)_4\text{NI}$ , obtidos pela evaporação lenta da solução mãe.



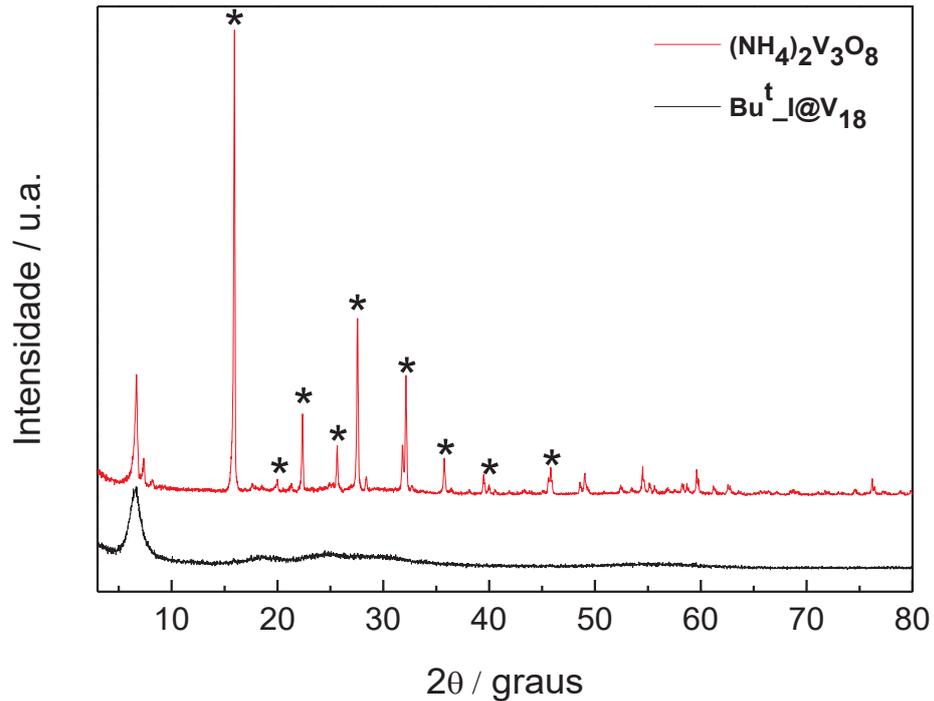
Para **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** foram realizadas análises espectroscópicas (IV, UV-vis NIR e Raman), DRX de pó, análise elementar, MEV, RMN de <sup>51</sup>V e RPE.

### 5.2.2.1 Difração de raios X de pó

Os difratogramas de pó de **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** e  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$  (FIGURA 22) são bastante distintos devido à elevada cristalinidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$ , que resulta em picos de

difração bem definidos, quando comparado a **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**, que possui cristalinidade baixa. As tentativas de recristalização de **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** renderam novos filmes ou levaram a decomposição do produto.

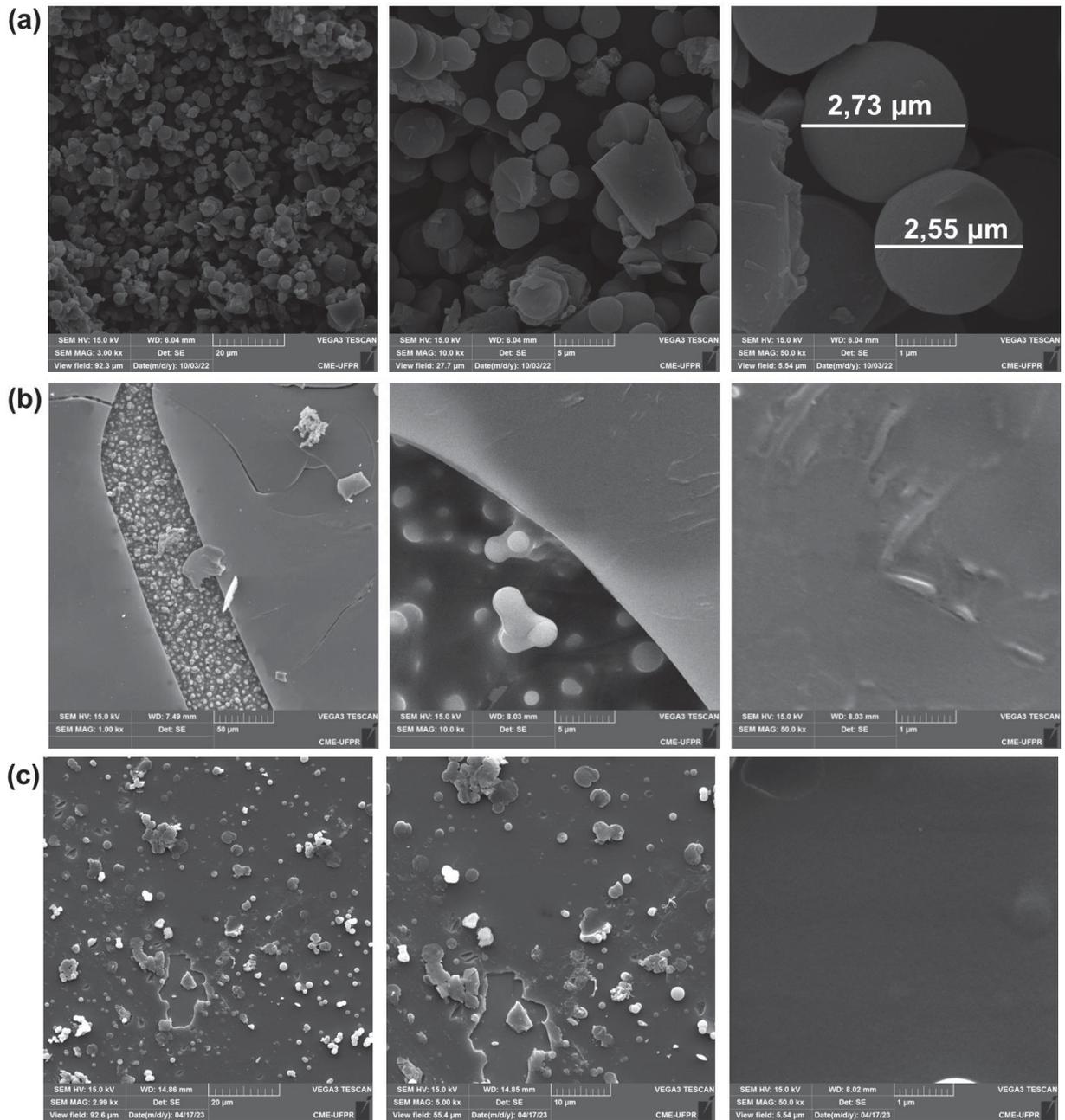
FIGURA 22 – Difratomogramas de raio X de pó registrados para  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$  (linha vermelha) e **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** (linha preta). Os (\*) informam os picos de difração esperados para  $(\text{NH}_4)_2\text{V}_3\text{O}_8$  segundo a carta JCPDS n° 51-1733, principais picos do difratograma em  $2\theta$  (°): 15,94; 20,00; 22,38; 25,64; 27,58; 32,14; 35,76; 39,46 e 45,84.



#### 5.2.2.2 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

As imagens de MEV para **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>** foram registradas na forma de pó e no filme, com o intuito de determinar a morfologia do composto em ambos os lotes, e correlacionar com suas características.

FIGURA 23 – Imagens de MEV para o sólido pulverizado do composto  $\text{Bu}^{\text{I}}\text{V}_{18}$  em aproximações de 3000x, 10000x e 50000x em (a) e para o composto  $\text{Bu}^{\text{I}}\text{V}_{18}$  na forma de filme não homogêneo (b) e na forma de filme homogêneo (c) em aproximações de 1000x, 5000x, 10000x e, 50000x.



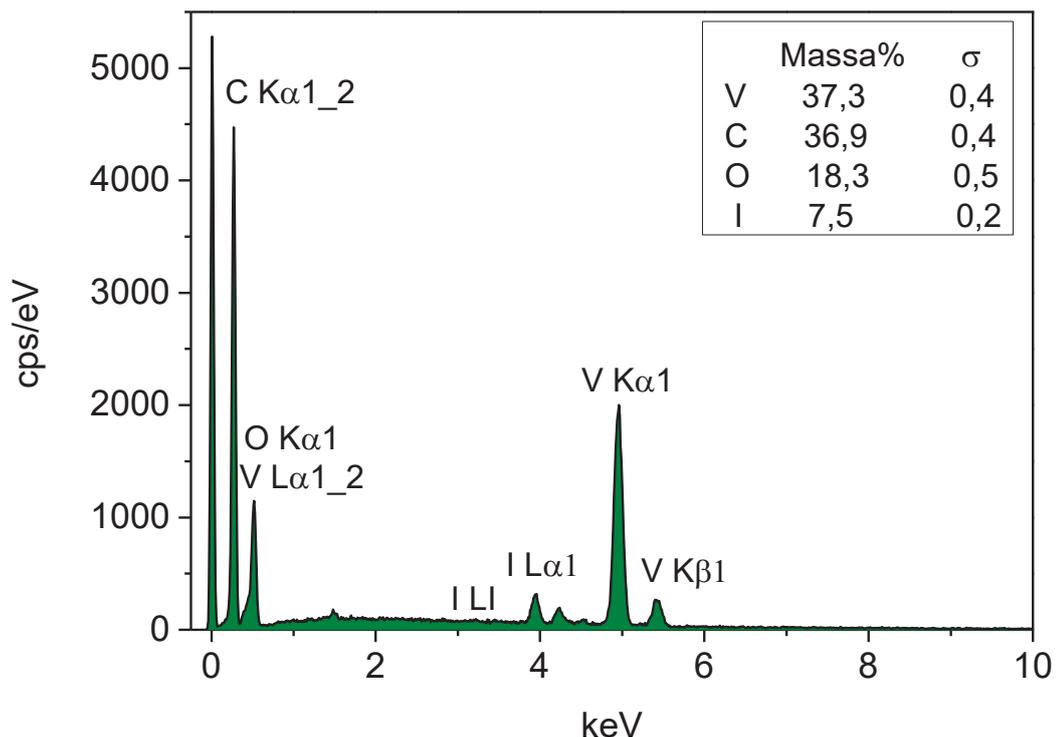
Para o produto isolado na forma de pó, foi observado a presença de esferas com diâmetro médio inferiores a  $3 \mu\text{m}$  e placas finas e pequenas dispersas entre as esferas (FIGURA 23a), confirmando a natureza não cristalina da amostra. Os filmes de  $\text{Bu}^{\text{I}}\text{V}_{18}$  apresentaram uma área extensa e homogênea, com algumas rachaduras (FIGURA 23b), entre as quais podem ser encontradas esferas semelhantes as observadas nas imagens do produto em pó.

Visando melhorar a qualidade do filme, foi preparada uma nova amostra em que o filme foi obtido mergulhando uma lâmina de vidro recoberta com um filme fino de FTO (óxido de estanho dopado com flúor) direto na solução da reação. As imagens de MEV, revelaram um filme homogêneo a olho nu e na ampliação de 50000x (FIGURA 23c). Ampliações de 3000x e 5000x revelam uma fina camada de filme homogêneo, com a deposição de esferas semelhantes às da FIGURA 23a, que podem estar indicando à formação de uma nova camada de filme.

### 5.2.2.3 Caracterização por espectroscopia de energia dispersiva de raios X

A análise por EDS consiste em escolher um ponto da amostra que já foi analisada por MEV, e identificar os elementos presentes. A EDS é baseada na interação de um feixe de alta energia de partículas carregadas que gera uma fonte de raios-X que excita uma amostra. A análise confirmou a presença de vanádio, iodo e oxigênio no produto **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**, mas suas porcentagens não são exatas (FIGURA 24). A EDS é uma análise semiquantitativa, pois ela fornece as porcentagens de cada elemento naquele ponto analisado da amostra, mas não da amostra como um todo.

FIGURA 24 – Espectro de EDS para o sólido pulverizado do composto **Bu<sup>t</sup>I@V<sub>18</sub>**, identificando os elementos presentes na amostra, onde (%) é a porcentagem relativa de cada elemento e ( $\sigma$ ) é o desvio padrão.



#### 5.2.2.4 Determinação quantitativa dos teores de C, H, N e V

Os resultados da análise elementar para o sólido verde escuro de **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**, apresentados na TABELA 7, levaram à formulação (NBu<sub>4</sub>)<sub>5</sub>V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>l. O produto **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** não contém águas de hidratação, provavelmente devido à baixa afinidade dos cátions tetrabutilamônio por água.

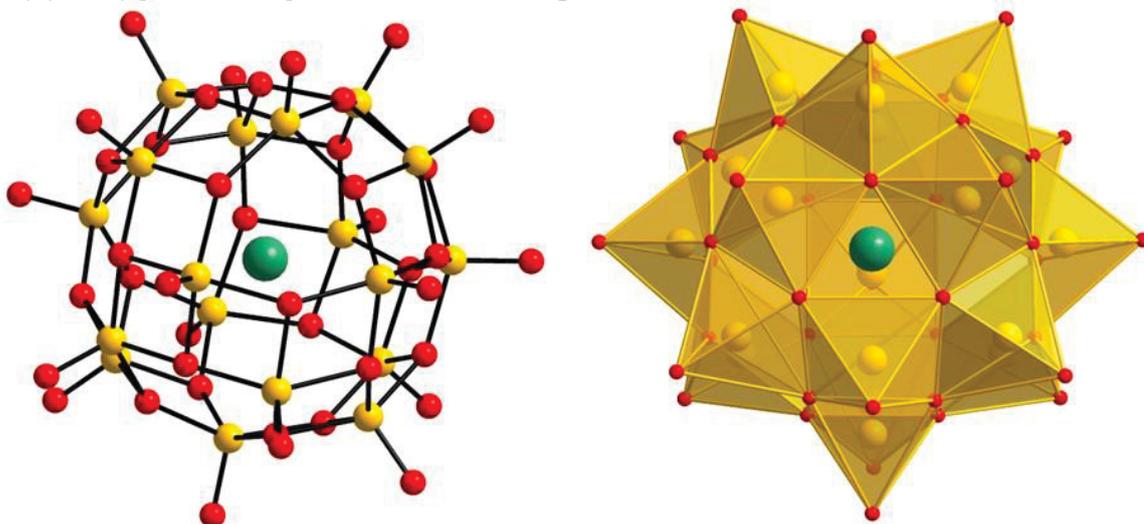
TABELA 7 – Resultados da dosagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e vanádio para o produto **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**

Teores em %(m/m)	C	H	N	V
<b>Determinado para Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub></b>	<b>33,15</b>	<b>6,17</b>	<b>2,32</b>	<b>30,89</b>
Calculado para (Bu <sub>4</sub> N) <sub>4</sub> [V <sub>18</sub> O <sub>42</sub> l]	28,62	5,40	2,09	34,14
<b>Calculado para (Bu<sub>4</sub>N)<sub>5</sub>[V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>l]</b>	<b>32,81</b>	<b>6,20</b>	<b>2,39</b>	<b>31,31</b>
Calculado para (Bu <sub>4</sub> N) <sub>6</sub> [V <sub>18</sub> O <sub>42</sub> l]	36,37	6,87	2,65	28,92
Erro *	0,34	0,03	0,07	0,42

\*Calculado considerando a formulação (Bu<sub>4</sub>N)<sub>5</sub>[V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>l]

Desta forma, foi proposto que **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** seja compreendido por um arcabouço polinuclear aniônico análogo a outros octadecavanadatos do tipo {X@V<sub>18</sub>O<sub>n</sub>}, onde n = 36-44; X = espécies encapsuladas, como Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, H<sub>2</sub>O, entre outros.<sup>135</sup> O arcabouço [V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>l]<sup>5-</sup> é análogo ao [V<sup>IV</sup><sub>12</sub>V<sup>V</sup><sub>6</sub>O<sub>42</sub>l]<sup>7-</sup> (**V<sub>18</sub>l**) apresentado na FIGURA 25, mas difere nas proporções entre V<sup>IV</sup> e V<sup>V</sup>.<sup>73,114</sup> A formulação (Bu<sub>4</sub>N)<sub>5</sub>[V<sub>18</sub>O<sub>42</sub>l] para **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** e a análise do balanço de carga permitiu chegar a proporção de 10V<sup>IV</sup>:8V<sup>V</sup>. É comum espécies de alta nuclearidade de valência mista apresentarem diferentes proporções de V<sup>IV</sup> e V<sup>V</sup>, levando a propriedades estruturais, espectroscópicas, magnéticas, eletrônicas e catalíticas diferenciadas.<sup>73</sup>

FIGURA 25 – Estruturas de bolas e bastão e poliedros do ânion  $[V_{18}O_{42}]^{7-}$  presente em  $(NH_4)_2(Me_4N)_5[V^{IV}_{12}V^V_6O_{42}I] \cdot Me_4NI \cdot 5H_2O$ .<sup>88,89</sup> Código de cores: Amarelo = V, vermelho = O, verde = I<sup>-</sup>.



Além dos compostos com iodeto encapsulado descritos por Muller,<sup>135</sup> outros autores tiveram sucesso na síntese de estruturas do tipo  $[V_{18}O_{42}]^{x-}$ , como é o caso de Livage,<sup>136</sup> que obteve o arcabouço  $(NMe_4)_{10}[H_3V_{18}O_{42}] \cdot 3H_2O$ , contendo apenas  $V^{IV}$ , e Moors,<sup>137</sup> que obteve um POV-VM  $[V_{18}O_{42}(I)]^{5-}$  com cinco cátions tetraetilamônio.

Moors relatou em outro trabalho a adsorção deste mesmo POV na superfície de Au(111), a fim de utilizar em futuros dispositivos nanoeletrônicos.<sup>138</sup> Nossos dados sugerem que o produto **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** é muito promissor comparado aos compostos já relatados, pois ele forma filmes homogêneos que aderem facilmente a superfícies como vidro e polietileno, além de apresentar uma síntese simples e de bom rendimento, o que permite que ele seja utilizado em diversas aplicações.

#### 5.2.2.5 Caracterização por espectroscopias vibracionais de infravermelho

O espectro de IV registrado para **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** está apresentado na FIGURA 26a e os principais modos vibracionais foram atribuídos tentativamente por comparação com outros POMs descritos na literatura (TABELA 8). O espectro de **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** apresentou bandas correspondentes às vibrações características de POVs em 997  $cm^{-1}$ , referente a  $\nu(V=O)$  e em 883 e 725  $cm^{-1}$  referentes a  $\nu(V-O-V)$ . As vibrações em 2959 e 2876  $cm^{-1}$  foram atribuídas a  $\delta(CH_2-CH_3)$  e as bandas em 1481 e 1381  $cm^{-1}$  a

$\delta_{as}$  e  $\delta_s$  ( $\text{CH}_3$ ).<sup>132</sup> O **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** apresenta bandas adicionais as encontradas no espectro de V<sub>18</sub>,<sup>73</sup> atribuídas as  $\delta(\text{CH}_2\text{-CH}_3)$  dos cátions tetrabutilamônio.

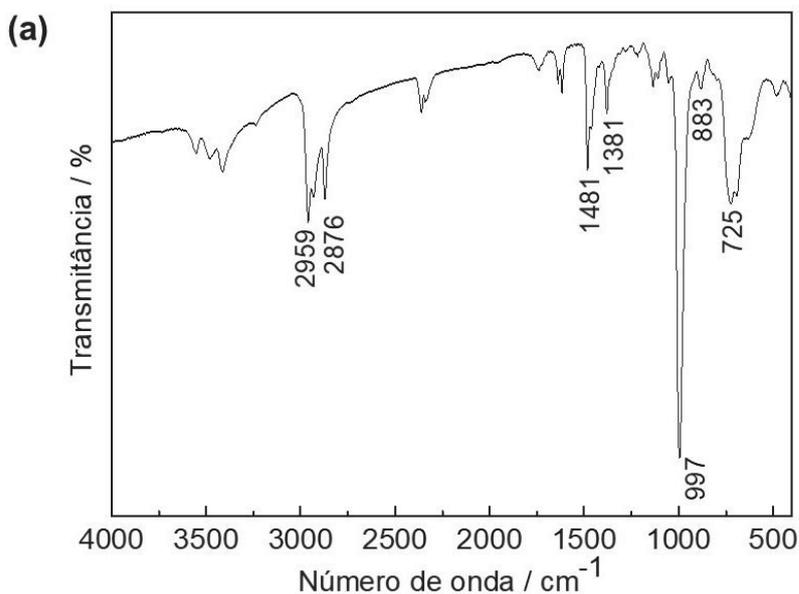
TABELA 8 – Atribuições tentativas para espectros vibracionais de IV e Raman do produto **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**

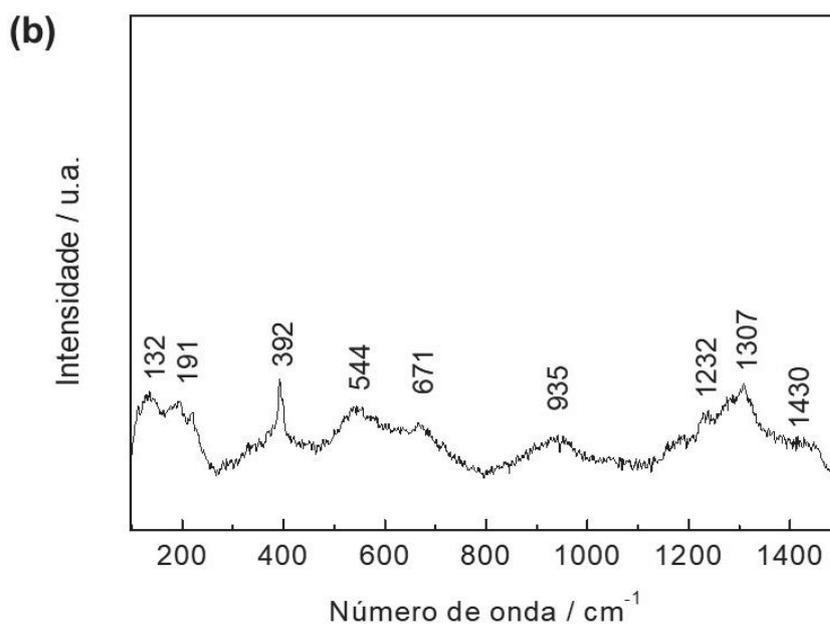
Atribuições tentativas <sup>133,134</sup>	IV / $\text{cm}^{-1}$		Raman / $\text{cm}^{-1}$	
	Bu <sup>l</sup> @V <sub>18</sub>	V <sub>18</sub> <sup>73</sup>	Bu <sup>l</sup> @V <sub>18</sub>	V <sub>18</sub> <sup>73</sup>
$\nu(\text{V=O})$	997	985	935	1020
$\nu(\text{V-O-V})$	883 e 725	707	671	688
$\delta(\text{V-O-V})$	-	617	-	417 e 514
$\delta(\text{CH}_2\text{-CH}_3)$	2959 e 2876	-	-	-
$\delta_{as}$ e $\delta_s$ ( $\text{CH}_3$ )	1481 e 1381	1486 e 1407	1310	-
$\nu(\text{O-H})$	-	3435 e 1618	-	-
(n-But) <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	-	-	392	-

$\nu$  = estiramentos simétricos e antissimétricos;  $\delta$  = deformação angular.

O espectro Raman obtido para o produto **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** (FIGURA 26b) revelou uma banda em  $392 \text{ cm}^{-1}$  produzida pela sobreposição das vibrações  $\nu_4$  do cátion tetrabutilamônio e do  $\delta(\text{V-O-V})$ , bem como bandas alargadas nas regiões centradas em  $671$  e  $935 \text{ cm}^{-1}$  referentes às vibrações  $\nu(\text{V-O-V})$  e  $\nu(\text{V=O})$ , respectivamente.

FIGURA 26 – Espectro de absorção na região do infravermelho em (a) e Espectro Raman utilizando laser de Ar<sup>+</sup> ( $514 \text{ nm}$ ) em (b) registrados para o produto **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**.

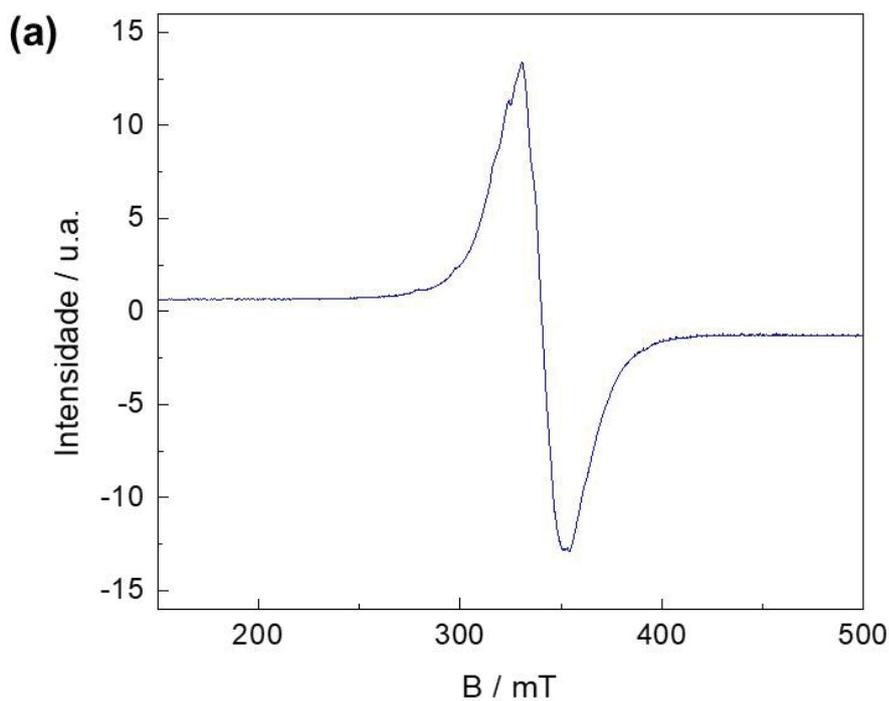


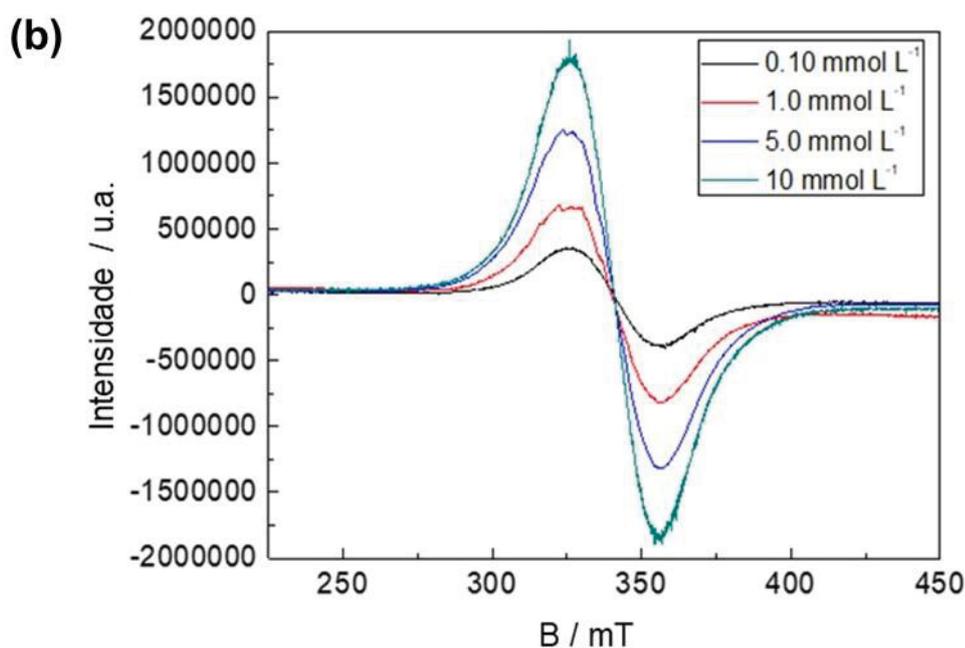


#### 5.2.2.6 Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A análise de RPE foi realizada para o produto **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** no estado sólido e em solução com o objetivo de obter informações sobre os estados de oxidação dos centros de vanádio e sobre a estabilidade do composto em solução.

FIGURA 27 – Espectro de RPE registrado a 77 K do produto **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** em (a) para o sólido pulverizado, e em (b) em acetona, nas concentrações de 0,10 a 10  $\text{mmol L}^{-1}$ .





Os espectros de RPE registrados para o produto **Bu<sup>IV</sup>@V<sub>18</sub>** a partir do sólido pulverizado a 77 K (FIGURA 27a) apresenta uma única linha alargada, com  $\Delta_{pp} = 47,6$  mT e  $g = 1,97$ , característica de espécies polinucleares que contêm centros de vanádio(IV) ( $I = 7/2$ ) com interação magnética.<sup>71</sup>

Um perfil espectral similar foi observado em solução para todas as concentrações avaliadas. Os espectros mostrados FIGURA 27b possui linhas alargadas ( $\Delta_{pp} = 31,1$  mT e  $g = 1,98$ ), o que é compatível com a manutenção da espécie polinuclear de valência mista, até mesmo nas soluções mais diluídas.<sup>139</sup> Os espectros sugerem que o composto se mantém estável em solução de acetona em todas as concentrações investigadas.

#### 5.2.2.7 Caracterização de **Bu<sup>IV</sup>@V<sub>18</sub>** em solução por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>51</sup>V)

A análise de RMN de <sup>51</sup>V foi realizada para o produto **Bu<sup>IV</sup>@V<sub>18</sub>** (Anexo 2, FIGURA A1), visando obter informações sobre a estabilidade do composto em solução. As concentrações utilizadas para o RMN de <sup>51</sup>V foram 0,100; 1,00; 5,00 e 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, em acetona-d<sub>6</sub>.

O espectro de RMN de <sup>51</sup>V pode ser usado na identificação de espécies que possuam vanádio(V) na sua composição, no entanto, estes sinais não foram

observados para **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** em nenhuma das concentrações investigadas. Esse resultado reforça a hipótese levantada a partir dos dados de RPE de que a estrutura polinuclear de valência mista é mantida em solução de acetona, e são comparáveis com os relatados para o **V<sub>18</sub>I**,<sup>73</sup> pois mostram que este agregado possui baixa tendência a sofrer quebras para formar espécies de menor nuclearidade. Finalmente, os dados apontam para uma maior estabilidade de octadecavanadatos com iodeto encapsulado nos diferentes solventes avaliados, seja prótico (água) ou aprótico (acetona), quando comparado ao POV análogo contendo fosfato encapsulado **V<sub>18</sub>P**,<sup>73</sup> que é mais suscetível a sofrer reações de hidrólise em solução aquosa.

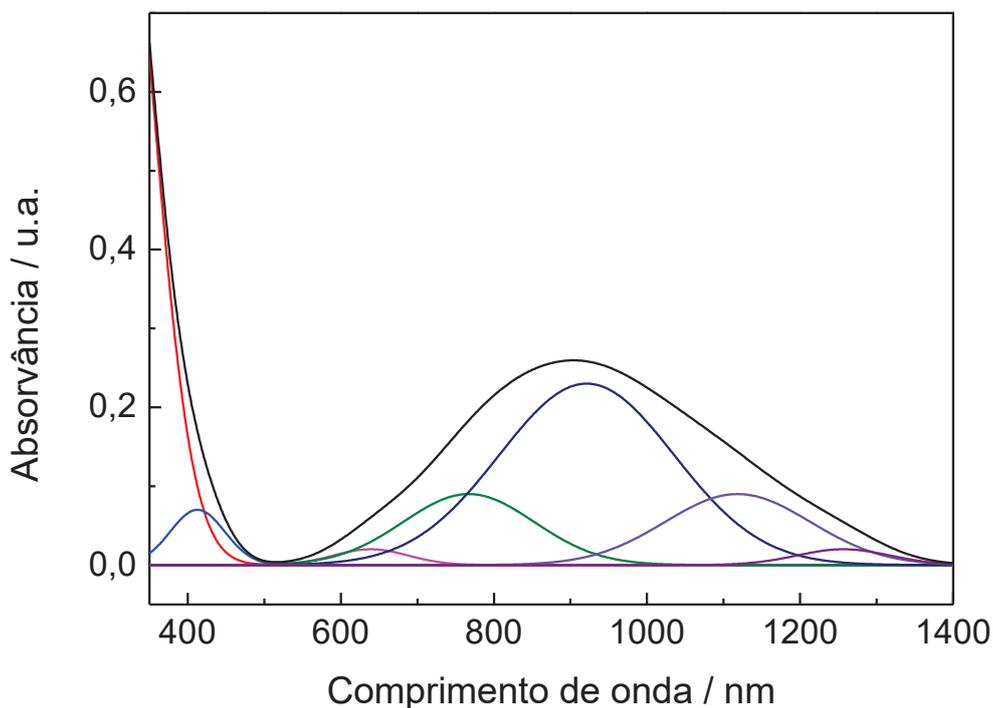
#### 5.2.2.8 Caracterização de **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** por espectroscopia eletrônica (UV-vis-NIR)

O espectro de **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** apresentou um perfil de bandas característico de polioxovanadatos de valência mista (V<sup>V</sup>:V<sup>IV</sup>). No espectro mostrado na FIGURA 28, foi observado a presença de uma banda de maior intensidade que se estende de 500 nm até a região do ultravioleta ( $\epsilon = 1100,0 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), que pode ser atribuída à transferência de carga ligante-metal (LMCT)  $p\pi(\text{O}, \text{oxo}) \rightarrow d(\text{V})$ ,<sup>3</sup> e outra banda de menor intensidade com máximo em 900 nm e  $\epsilon$  de  $380,0 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , atribuída a transição de transferência de carga de intervalência (TCIV, V<sup>IV</sup>→V<sup>V</sup>).<sup>140</sup> Os espectros de absorção foram registrados para soluções armazenadas a temperatura ambiente a cada 24 h, por três dias, não havendo alteração na intensidade das bandas, apontando novamente para a alta estabilidade de **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>**.

Robin e Day<sup>141,142</sup> propuseram 3 categorias diferenciadas pelo perfil e intensidade da interação eletrônica entre os centros metálicos:

- (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.

FIGURA 28 – Espectro de UV-Vis-NIR da solução em acetona do produto **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** em concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup>.



O valor obtido para  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$  teórico se encontra no limite entre a transição de carga localizada e a deslocalizada (Equação 3). 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.<sup>143</sup>

A distribuição de carga do produto **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** foi classificada como tipo II através da comparação dos valores experimentais e teóricos de largura de banda a meia altura ( $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ ). Os valores de  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$  foram determinados utilizando a Equação 3, apresentando valores iguais à  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$  (exp) de 6626 cm<sup>-1</sup> e  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$  (teor) de 5070 cm<sup>-1</sup>, e a banda de transferência de carga de intervalência de **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** foi classificada como do tipo II.

$$\Delta\bar{\nu}_{1/2(\text{teor})} = (2310 \times \bar{\nu}_{\text{max}})^{1/2} \text{ [Eq. 3]}$$

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

### 5.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO E NO MEIO DE CULTURA RPMI

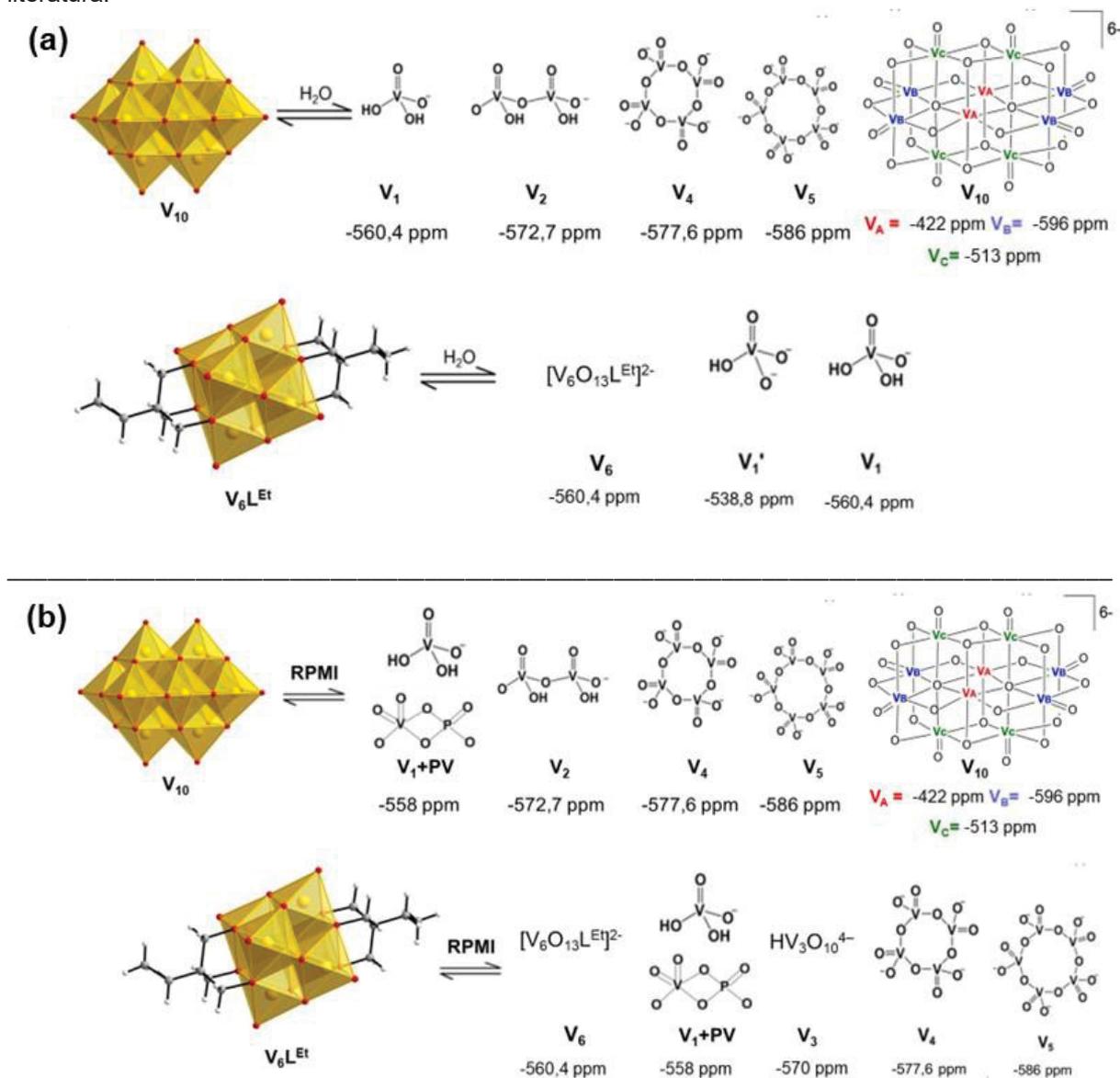
A análise de RMN é usualmente empregada para analisar espécies diamagnéticas em solução, deste modo, ela é utilizada para caracterizar espécies de vanádio(V). Já a análise de RPE é utilizada para estudar espécies paramagnéticas, identificando espécies de vanádio(IV) e de valência mista presentes em solução. Desta forma, foram realizadas análises de RMN de  $^{51}\text{V}$  para **V<sub>10</sub>**, **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**, **MeCl@V<sub>15</sub>** e **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** e de RPE apenas para **MeCl@V<sub>15</sub>** e **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>**.

Estes estudos permitiram determinar a estabilidade dos arca-bouços polinucleares em solução, além de identificar as entidades químicas presentes e auxiliar na correlação entre as estruturas químicas e as atividades observadas, possibilitando comparar a estabilidade relativa com a atividade contra as células de câncer.

#### 5.3.1 Análise dos polioxovanadatos de vanádio(V)

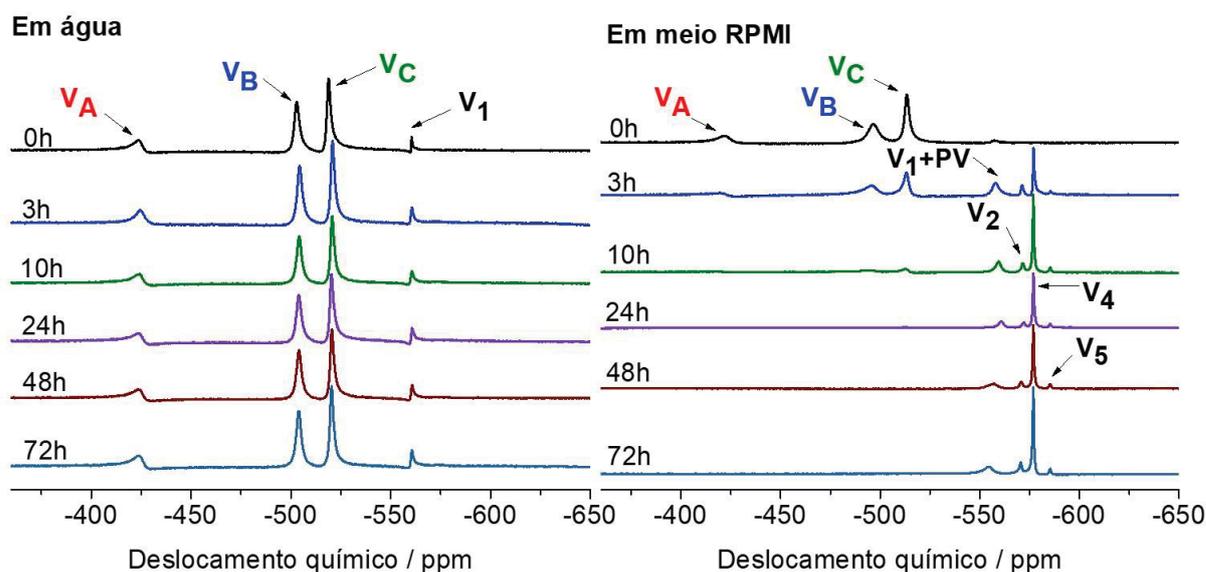
Sistemas de oxidovanádio(V) em solução aquosa possuem grande complexidade pela coexistência de várias espécies em equilíbrio. Os equilíbrios podem ser deslocados em diferentes condições, as quais incluem a concentração de vanádio, temperatura e pH do meio.<sup>51</sup> As espécies de vanádio(V) identificadas por RMN de  $^{51}\text{V}$  nas soluções de **V<sub>10</sub>** e **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** são comumente reportadas em soluções aquosas de polioxovanadatos,<sup>48</sup> enquanto no meio de cultura RPMI,<sup>50</sup> a composição variou com o tempo do experimento. A FIGURA 29 compila os principais dados que serão discutidos abaixo.

FIGURA 29 – Equilíbrios das espécies de vanádio(V) gerados para os sistemas de  $V_{10}$  e  $V_6L^{Et}$  na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  determinadas por RMN de  $^{51}\text{V}$  em: (a) solução aquosa e (b) meio celular RPMI. Onde  $V_1' = \text{HVO}_4^{2-}$ ,  $V_1 = \text{H}_2\text{VO}_4^-$ ,  $V_2 = \text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $V_4 = \text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ ,  $V_5 = \text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$  e  $V_{10} = [\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$ . Na figura estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de  $^{51}\text{V}$ , segundo a literatura.<sup>48</sup>



A literatura reporta que o ânion  $V_{10}$  é estável por dias em solução aquosa em pH de 4 a 7.<sup>48</sup> O espectro de  $V_{10}$  registrado em água, pH ajustado para 4 é mostrado na FIGURA 30, à esquerda. O espectro apresenta os sinais esperados para o ânion monoprotonado,  $[\text{HV}_{10}\text{O}_{28}]^{5-}$ , correspondentes aos três ambientes químicos diferentes para os centros de vanádio(V): vanádios centrais ( $V_A$ ) em  $-423$  ppm, vanádios equatoriais ( $V_B$ ) em  $-503$  ppm e vanádios axiais ( $V_C$ ) em  $-519$  ppm. O perfil espectral está de acordo com o relatado para soluções aquosas deste polioxidoânion.<sup>48,144</sup> Além dos sinais do  $V_{10}$ , o sinal em  $-560$  ppm foi atribuído ao  $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$  ( $V_1$ ).

FIGURA 30 – Espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  de  $\text{V}_{10}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e pH inicial igual a 4 (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  e pH inicial de 7,4 (direita).



O espectro registrado para a solução de  $\text{V}_{10}$  no meio de cultura RPMI recém-preparada (FIGURA 30, direita) apresenta os sinais de  $\text{V}_A$ ,  $\text{V}_B$  e  $\text{V}_C$  atribuídos ao ânion,  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  totalmente desprotonado em  $-421$ ,  $-496$  e  $-513$  ppm, respectivamente. O espectro apresentou ainda um sinal alargado em  $-558$  ppm, comumente presente em meios de cultivo celular tratados com compostos de vanádio. Este sinal é conhecido como  $\text{V}_1+\text{PV}$  e é gerado a partir do rápido equilíbrio entre o  $\text{V}_1$  ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) e o complexo de vanádio com fosfato ( $\text{PV} = \text{HVPO}_7^{3-}$ ).<sup>145</sup>

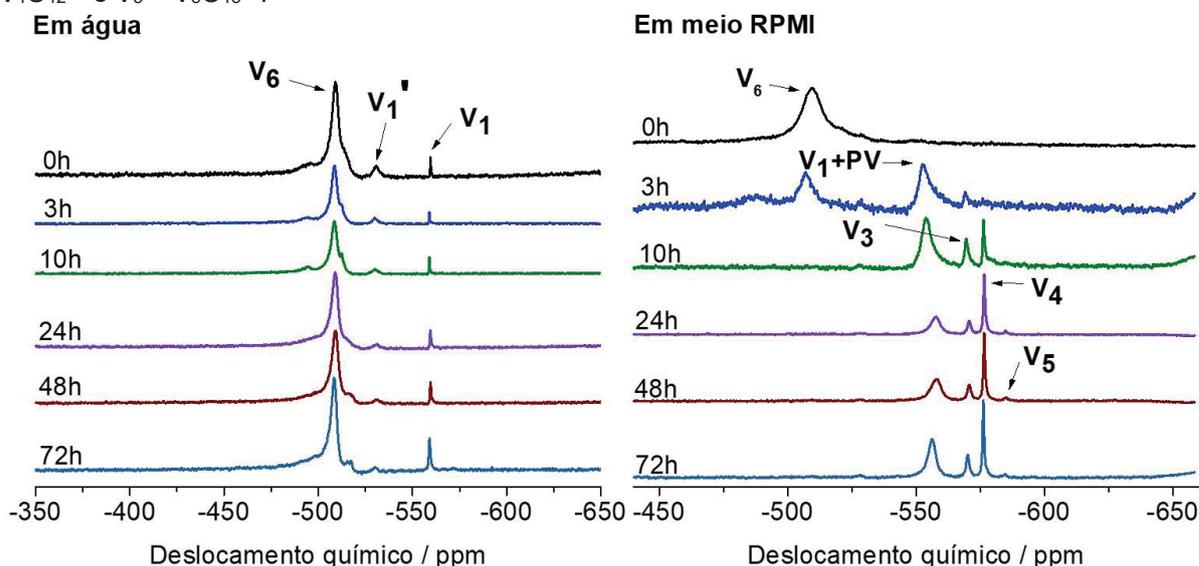
A partir de 3 h, foram observados sinais referentes ao ânion  $[\text{HV}_{10}\text{O}_{28}]^{5-}$ ,  $[\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7]^{3-}$  ( $\text{V}_2$ ) em  $-571$  ppm,  $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^{4-}$  ( $\text{V}_4$ ) em  $-577$  ppm e  $[\text{V}_5\text{O}_{15}]^{5-}$  ( $\text{V}_5$ ) em  $-585$  ppm, evidenciando uma extensa quebra do polioxoânion assim que este entra em contato com o meio de cultura.<sup>144,146</sup> Após 24 h de experimento, o  $\text{V}_4$  se tornou a espécie predominante até o tempo final do experimento de 72 h.

Ramos et al. confirmaram a influência de macromoléculas na estabilidade do  $\text{V}_{10}$ , pela investigação da interação da espécie  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  com G-actina.<sup>147</sup> O ânion  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  pode interagir com alguns componentes celulares, levando à decomposição da espécie, o que novamente corrobora a influência de macromoléculas na especiação dos POVs.<sup>48</sup> Esses resultados explicam a diferença entre os espectros em água e em meio celular RPMI, tanto para o  $\text{V}_{10}$ , quanto para os outros POVs, que apresentam maior especiação em meio celular. O modelo de especiação mais aceito

postula que em condições ácidas, apenas duas espécies majoritárias são reportadas,  $V_{10}$  e  $[VO_2(OH_2)_4]^+$  ( $VO_2^+$ ).<sup>48</sup>

O espectro de RMN de  $^{51}V$  para o  $V_6L^{Et}$  em solução de  $D_2O$  na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (FIGURA 31, esquerda), para todos os tempos estudados, apresentou um sinal intenso em aproximadamente  $\delta = -510 \text{ ppm}$ , atribuídos à espécie  $[V_6O_{13}L^{Et}]^{2-}$  ( $V_6$ ). Os sinais referentes às espécies  $[HVO_4]^{2-}$  e  $[H_2VO_4]^-$  aparecem em  $-531$  e  $-560 \text{ ppm}$ , respectivamente. Este resultado não era esperado para a solução inicial, pois os seis centros de vanádio são quimicamente equivalentes e é relatado que outros hexavanadatos são estáveis em soluções recém preparadas.<sup>148–150</sup> A presença da espécie monomérica pode estar associada à baixa concentração do composto utilizada na análise, não favorecendo a formação de espécies de maior nuclearidade. Um estudo adicional variando a concentração de  $V_6L^{Et}$  poderá ajudar a elucidar se esta quebra é inerente ao POVou ocorre apenas em concentrações baixas.

FIGURA 31 – Espectro de RMN de  $^{51}V$  de  $V_6L^{Et}$  em  $D_2O$  na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  (esquerda). Espectro de RMN de  $^{51}V$  de  $V_6L^{Et}$  em meio celular RPMI na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  (direita). Onde  $V_6 = [V_6O_{13}L^{Et}]^{2-}$ ,  $V_1' = HVO_4^{2-}$ ,  $V_1 = H_2VO_4^-$ ,  $V_1+PV = (H_2VO_4^- + HVPO_7^{3-})$ ,  $V_3 = HV_3O_{10}^{4-}$ ,  $V_4 = V_4O_{12}^{4-}$  e  $V_5 = V_5O_{15}^{5-}$ .



O espectro de RMN de  $^{51}V$  para o Produto  $V_6L^{Et}$  em meio celular RPMI na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (FIGURA 31, direita) para os tempos 0 e 3 h apresentou um sinal em  $\delta = -510 \text{ ppm}$ , referente ao ânion  $[V_6O_{13}L^{Et}]^{2-}$ , o qual foi o único sinal observado na solução recém preparada. Neste contexto, diferentemente do que foi

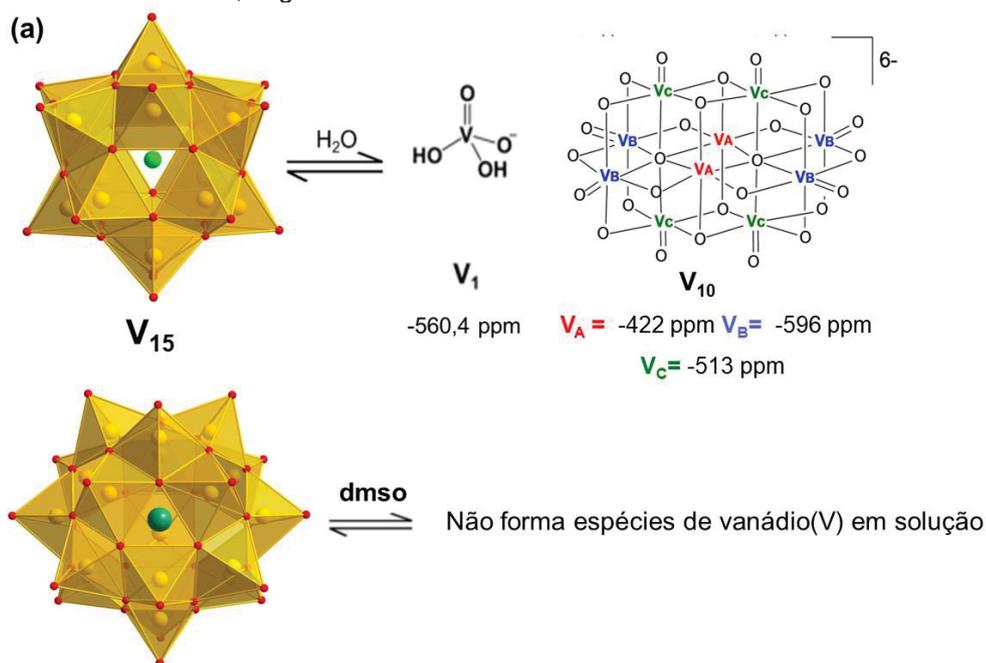
observado para o  $V_6L^{Et}$  em água, o meio de cultura RPMI retardou a ocorrência de reações de hidrólise que levam a formação de outros oligovanadatos.

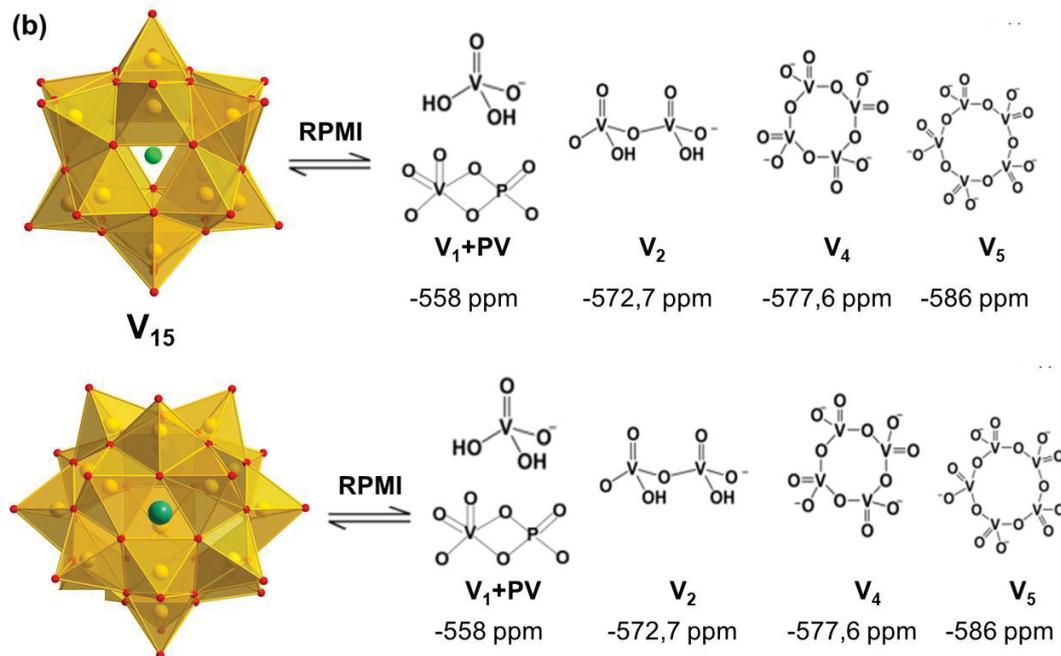
A partir de 3 h, o espectro apresentou um sinal adicional alargado em  $-558$  ppm, atribuído a  $V_1+PV$  e no tempo de 10 h, as espécies  $V_4$  e  $V_5$  foram observadas, em deslocamentos químicos de  $-576$  e  $-585$  ppm, respectivamente.

### 5.3.2 Análise dos polioxovanadatos de valência mista

As espécies de vanádio(V) que se formam em solução (água para  $MeCl@V_{15}$  e dmsO para  $Butl@V_{18}$ ) foram identificadas a partir da análise de RMN de  $^{51}V$  e as espécies de vanádio(IV) ou de valência mista por ressonância paramagnética eletrônica. Estas duas técnicas espectroscópicas são complementares para a descrição dos compostos contendo mais de um estado de oxidação. Na FIGURA 32a têm-se a especiação em solução, e na FIGURA 32b, a especiação dos POVs em meio de cultura RPMI, com seus respectivos deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^{51}V$ .

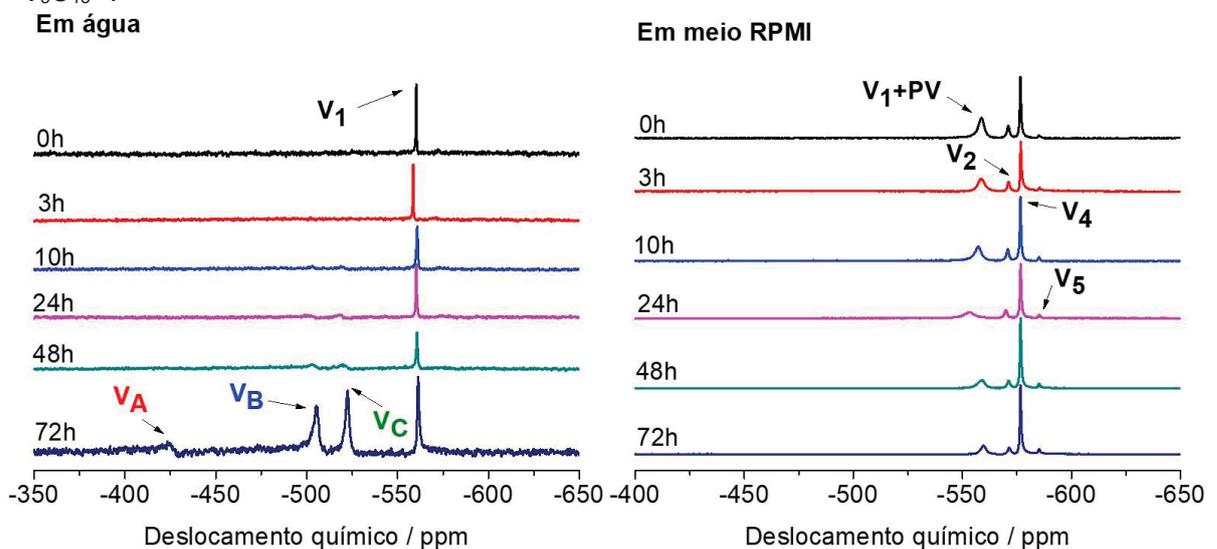
FIGURA 32 – Equilíbrios das espécies de vanádio(V) gerados para os sistemas de  $MeCl@V_{15}$  e  $Butl@V_{18}$  determinadas por RMN de  $^{51}V$  na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ : (a) em solução aquosa ou dmsO; (b) em meio celular RPMI. Onde  $V_1 = H_2VO_4^-$ ,  $V_{10} = [V_{10}O_{28}]^{6-}$ ,  $V_1+PV = (H_2VO_4^- + HVPO_7^{3-})$ ,  $V_2 = H_2V_2O_7^{2-}$ ,  $V_4 = V_4O_{12}^{4-}$  e  $V_5 = V_5O_{15}^{5-}$ . Na figura estão indicados os deslocamentos químicos para cada espécie no RMN de  $^{51}V$ , segundo a literatura.<sup>48</sup>





O **MeCl@V<sub>15</sub>** sofre hidrólise parcial em solução aquosa, formando oligovanadatos(V) simples e íons oxidovanádio(IV), que são gradualmente oxidados, resultando em um aparecimento e aumento da intensidade dos sinais de V<sub>1</sub> e de V<sub>10</sub> como o tempo de 24 h (FIGURA 33, esquerda). O resultado é interessante para aplicações medicinais, pois evidencia que este arcabouço é relativamente estável em solução aquosa, só formando grandes quantidades de outra espécie após 72 h.

FIGURA 33 – Espectro de RMN de <sup>51</sup>V de **MeCl@V<sub>15</sub>** em D<sub>2</sub>O na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> e pH inicial igual a 6,4 (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de 1,00 mmol L<sup>-1</sup> (direita). Onde V<sub>1</sub> = H<sub>2</sub>VO<sub>4</sub><sup>-</sup>, V<sub>A</sub>, V<sub>B</sub> e V<sub>C</sub> = [H<sub>2</sub>V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>]<sup>4-</sup>, V<sub>1</sub>+PV = (H<sub>2</sub>VO<sub>4</sub><sup>-</sup> + HVPO<sub>7</sub><sup>3-</sup>), V<sub>2</sub> = H<sub>2</sub>V<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, V<sub>4</sub> = V<sub>4</sub>O<sub>12</sub><sup>4-</sup> e V<sub>5</sub> = V<sub>5</sub>O<sub>15</sub><sup>5-</sup>.



O espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  para o Produto **MeCl@V<sub>15</sub>** em RPMI na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (FIGURA 33, direita) teve o mesmo perfil para todos os tempos estudados, apresentando um sinal alargado de  $V_1+PV$  em  $-578 \text{ ppm}$ . Foram observados sinais adicionais relativos a  $V_2$  em  $-571 \text{ ppm}$ ,  $V_4$  em  $-576 \text{ ppm}$  e  $V_5$  em  $-585 \text{ ppm}$ . Para este POV, o meio de cultura favoreceu a quebra do agregado, gerando diferentes espécies de menor nuclearidade.

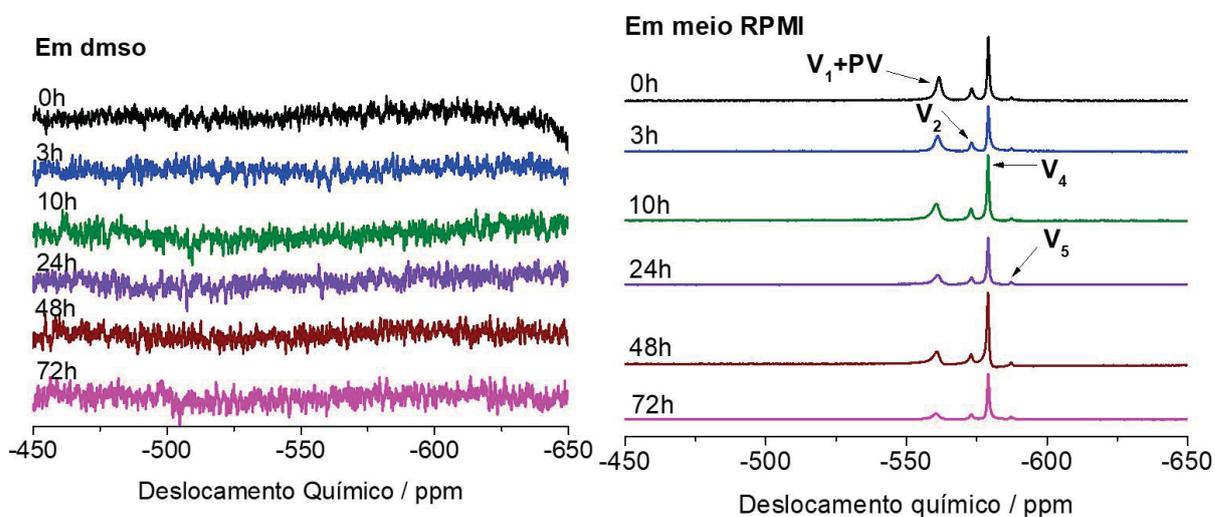
O espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  para **Bu<sup>†</sup>@V<sub>18</sub>** em dmsO deuterado (FIGURA 34, esquerda) não apresentou nenhum sinal, em todos os tempos estudados. Esse resultado pode sugerir que a estrutura do POV-VM se mantém inalterada, ou seja, o arcabouço polinuclear  $[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]^{4-}$  é altamente estável em solução, como já visto anteriormente quando o solvente utilizado foi acetona.

Esses resultados podem ser comparados com os obtidos para o POV-VM análogo **Mel@V<sub>18</sub>**,<sup>73</sup> que se mostrou bastante estável em solução (água, acetona e dmsO), não favorecendo a formação de espécies de menor nuclearidade.

Entretanto, quando o **Bu<sup>†</sup>@V<sub>18</sub>** foi analisado em meio celular RPMI, o espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  teve o mesmo perfil que o observado para o composto **MeCl@V<sub>15</sub>**, apresentando o mesmo conjunto de sinais em todos os tempos estudados (FIGURA 34, direita). Foram observados no espectro um sinal alargado em aproximadamente  $\delta = -578 \text{ ppm}$  ( $V_1+PV$ ), assim como sinais referentes às espécies  $V_2$  em  $-571 \text{ ppm}$ ,  $V_4$  em  $-576 \text{ ppm}$  e  $V_5$  em  $-585 \text{ ppm}$ .

Em comparação com o solvente dmsO, sugere-se que o meio celular RPMI favorece a especiação do **Bu<sup>†</sup>@V<sub>18</sub>** no momento em que o POV entra em contato com o meio, gerando sinais de espécies de vanádio(V) de menor nuclearidade.

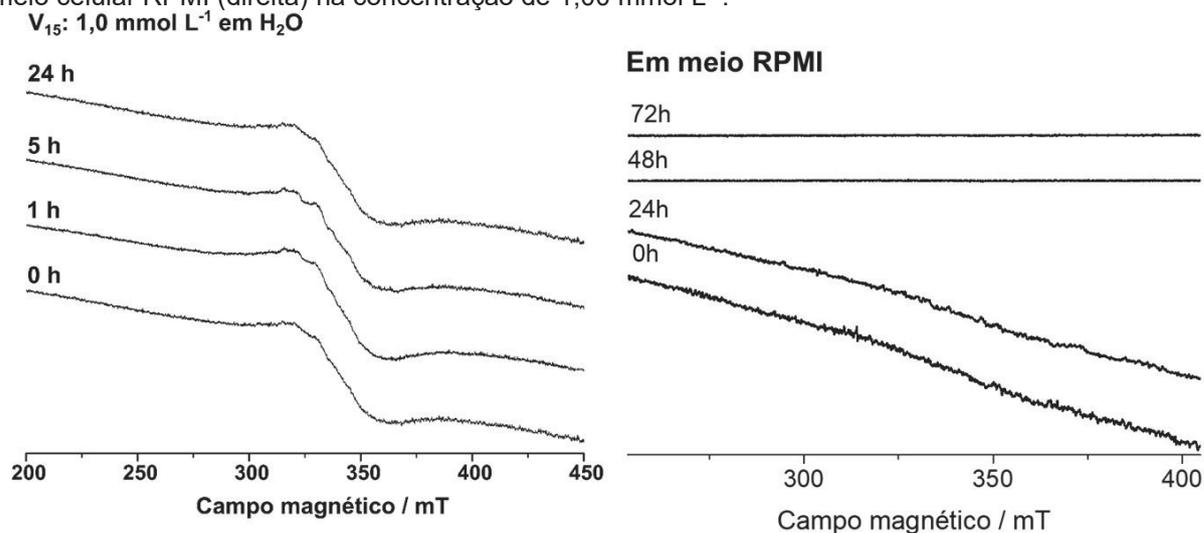
FIGURA 34 – Espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  de  $\text{Bu}^{\text{t}}\text{I@V}_{18}$  em dmsO deuterado na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$  (esquerda) e em meio celular RPMI na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (direita).



Nos experimentos de RPE de  $\text{MeCl@V}_{15}$  e  $\text{Bu}^{\text{t}}\text{I@V}_{18}$  nas soluções em água, dmsO ou meio celular RPMI, não foi identificada a presença de sinais de espécies de vanádio(IV) ou de valência mista em nenhum dos tempos estudados.

Já havia sido realizado anteriormente no nosso grupo de pesquisa, pela Dra. Kahoana Postal em sua tese de doutorado,<sup>151</sup> uma investigação da estabilidade em solução aquosa e em meio celular 7H9 para o  $\text{MeCl@V}_{15}$ . Quando solubilizado em água, o POV apresentou um sinal alargado até 24 h de experimento, referente ao arcabouço polinuclear do  $\text{MeCl@V}_{15}$  (FIGURA 35, esquerda). A análise realizada neste trabalho, em que o POV-VM, foi solúvel apenas em solventes orgânicos, não apresentou sinais, provavelmente devido à alta constante dielétrica dos solventes utilizados em relação ao limite de detecção do equipamento, que é menor quando comparada ao utilizado em estudos anteriores do grupo.

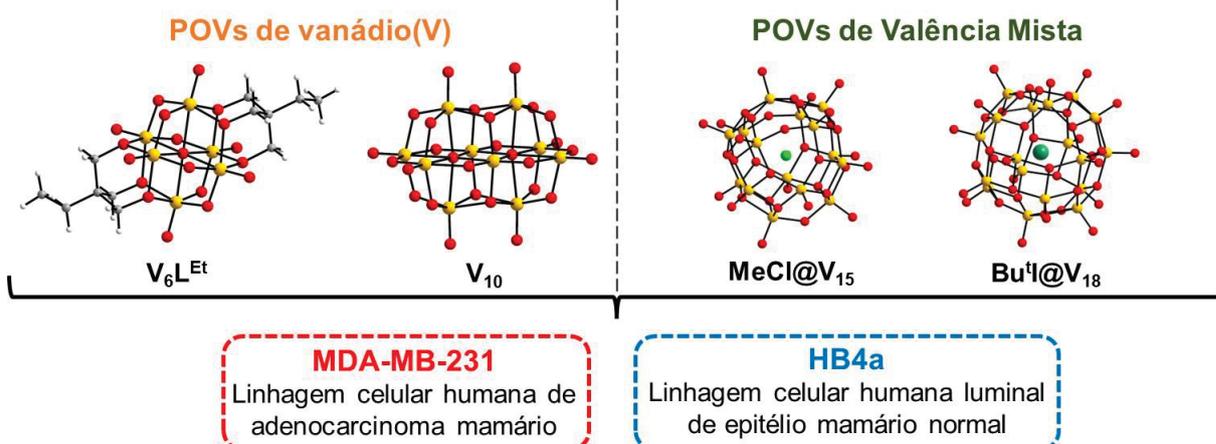
FIGURA 35 – Espectros de RPE registrados a 77 K do produto  $\text{MeCl@V}_{15}$  em água (esquerda)<sup>151</sup> e em meio celular RPMI (direita) na concentração de  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ .



#### 5.4 ENSAIOS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

Iniciamos nossos estudos empregando células MDA-MB-231, como modelo celular de câncer de mama humano, e a linhagem celular luminal de epitélio mamário HB4a como modelo celular normal de mama humano. A FIGURA 36 apresenta as estruturas dos agregados aniônicos e as linhagens celulares empregadas nos estudos de citotoxicidade.

FIGURA 36 – Esquema dos POVs e linhagens celulares utilizados nos ensaios biológicos.



A linhagem MDA-MB-231 foi selecionada por ser do subtipo triplo-negativo, ou seja, é altamente agressiva, invasiva e pouco diferenciada por não possuir receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona, assim como amplificação do HER2

(receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano).<sup>152,153</sup> Adicionalmente, esta é uma linhagem de fácil manuseio, considerada ideal para o treinamento em cultivo celular.

O ensaio de viabilidade mitocondrial e a curva de tempo foram realizados para todos os POVs, entretanto, a curva de tempo foi feita apenas para a linhagem tumoral. Os POVs estudados foram divididos em dois grupos:

- POVs de vanádio(V):  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  (**V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**), onde **L<sup>Et</sup>** = 1,1,1-tris(hidroximetil)propano e o ânion decavanadato  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$  (**V<sub>10</sub>**) (FIGURA 36).
- POVs de valência mista pseudoesféricos:  $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$  (**MeCl@V<sub>15</sub>**) e  $(NBu_4)_5[V_{18}O_{42}]$  (**Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>**) (FIGURA 36).

Para **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e **V<sub>10</sub>** foram realizados o Ensaio de Migração Celular (Wound Healing), e estudos por microscopia eletrônica de varredura. Finalmente, selecionou-se o **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** para realizar o ensaio de viabilidade mitocondrial na linhagem tumoral de mama de camundongos BALB/cfCRH e conduzir estudos preliminares do mecanismo da ação anticâncer, realizando e um estudo de expressão gênica com vários iniciadores.

#### 5.4.1 Polioxovanadatos (POVs) de vanádio(V)

##### 5.4.1.1 Ensaios de citotoxicidade

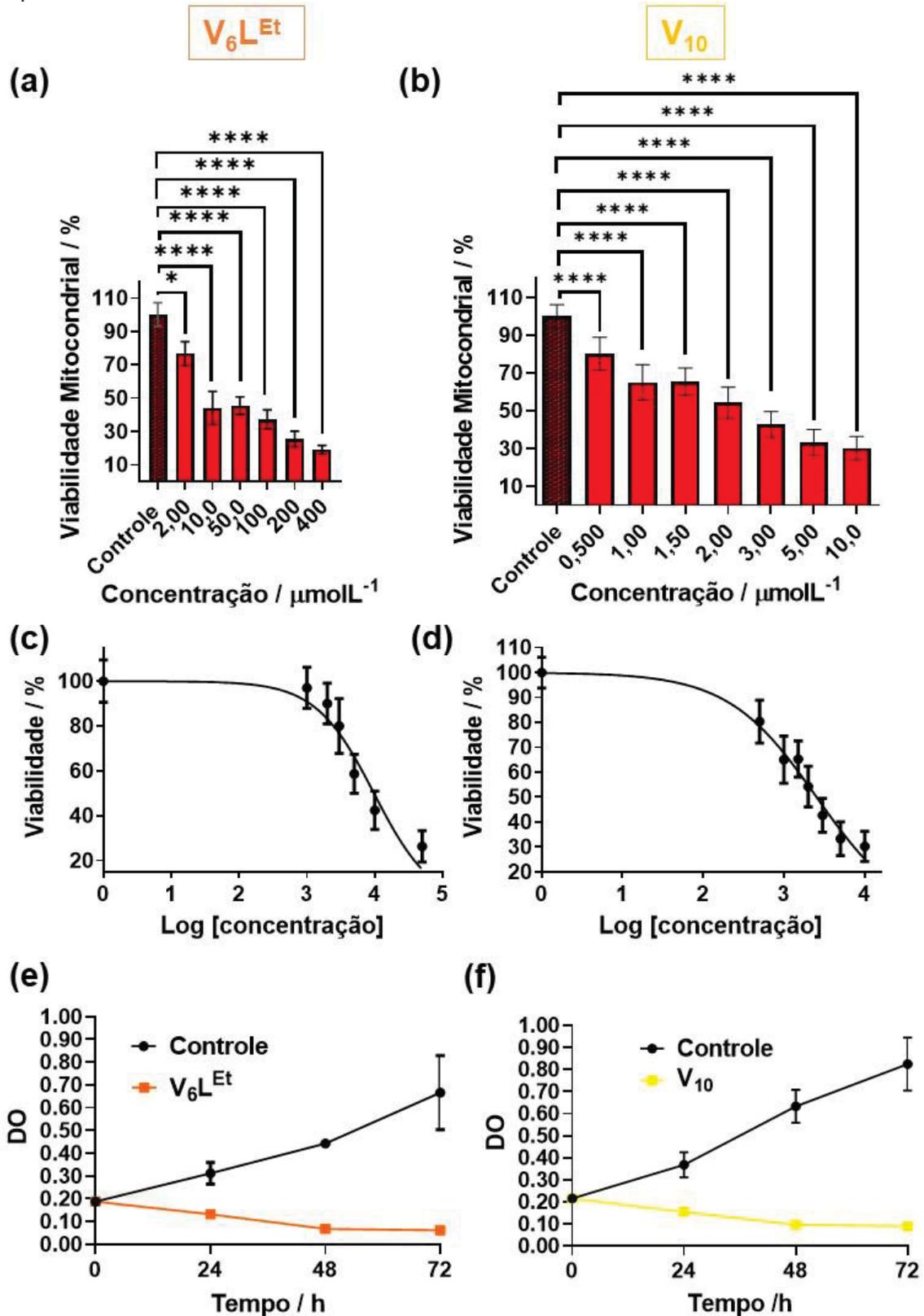
O ensaio de toxicidade dos POVs foi realizado através da verificação da viabilidade mitocondrial utilizando diferentes concentrações de cada composto nas linhagens tumoral e normal, por um período de incubação de 24 h. Para a determinação da IC<sub>50</sub> introduziu-se inicialmente as células aos poços para permitir a adesão celular, para depois adicionar quantidades crescentes de cada POV. A influência do tempo no crescimento celular foi analisada utilizando o valor obtido de IC<sub>50</sub> pelo ensaio de MTT e para tempos de incubação de 24, 48 e 72 h.

Os resultados do estudo de viabilidade mitocondrial na linhagem MDA-MB-231 após 24 h de incubação das culturas com concentrações crescentes de **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** (2,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e de **V<sub>10</sub>** (0,50 a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) são apresentados nas FIGURA 37, e mostram que a atividade antitumoral é mais sensível a variações de concentração do **V<sub>10</sub>**. Os valores de IC<sub>50</sub> de 17,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** é 7 vezes maior

que o do  $V_{10}$  de  $2,53 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para o  $V_6L^{\text{Et}}$ , não foi observado 100% de inibição da viabilidade mitocondrial, mesmo quando as células foram tratadas com a maior concentração. O resultado sugere que a célula tem uma quantidade limite de sítios alvo para este POV. O mesmo efeito não foi observado para o  $V_{10}$ , inicialmente apontando que os dois POVs podem ter afinidades diferentes pelos mesmos sítios ou interagir com sítios alternativos.

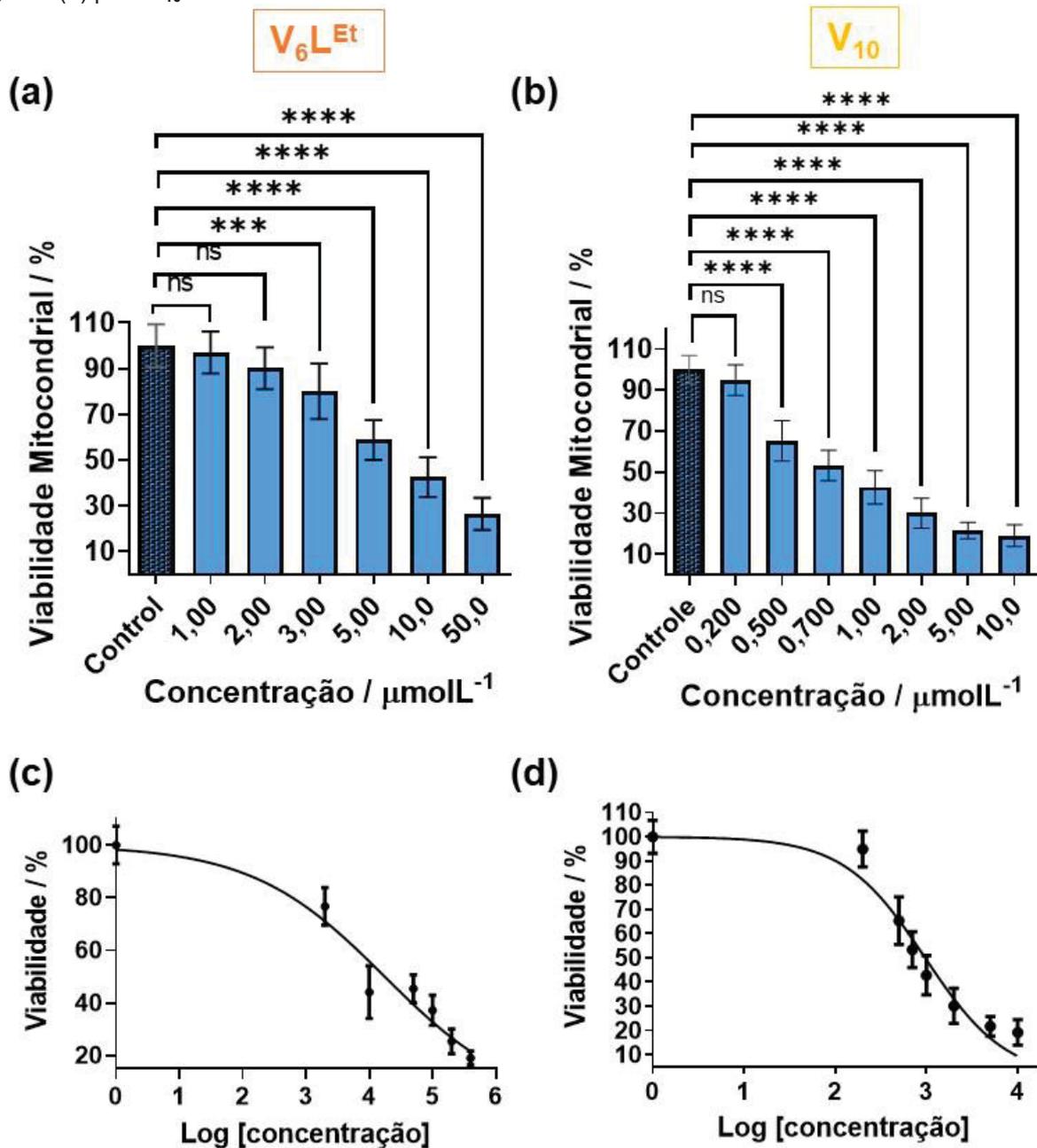
A concentração de  $IC_{50}$  de  $V_6L^{\text{E}}$  e  $V_{10}$  foram selecionadas para acompanhar a viabilidade mitocondrial ao longo de 24, 48 e 72 h. Os gráficos apresentados na FIGURA 37 mostraram que ambos os POVs são inibidores potentes do crescimento celular da linhagem MDA-MB-231, corroborando o valor determinado para a  $IC_{50}$  após 24 h de incubação. Observou-se ainda um caimento expressivo do crescimento celular em 48 h, o qual que se manteve constante após 72 h, demonstrando um efeito citotóxico.

FIGURA 37 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações do POV em 24, em (a) para  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ) e (b) para  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$  ( $V_{10}$ ). Curva de  $IC_{50}$  em (c) para  $V_6L^{Et}$  e (d) para  $V_{10}$ . As curvas de Tempo para  $V_6L^{Et}$  e  $V_{10}$  são apresentadas em (e) e (f), respectivamente.



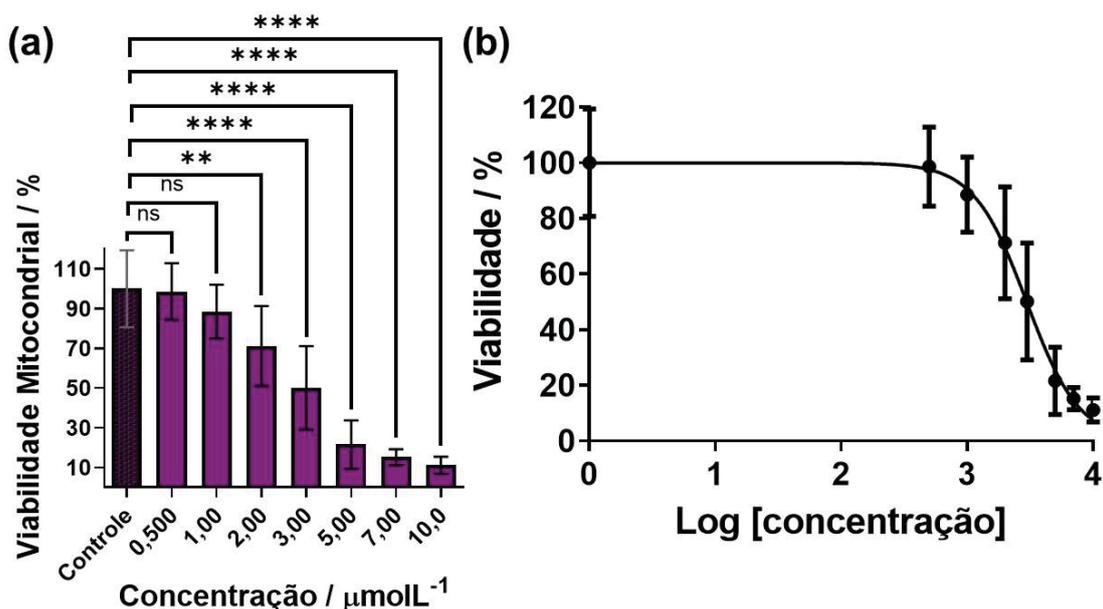
O ensaio de viabilidade mitocondrial para a linhagem HB4a, gerou um valor de IC<sub>50</sub> de 9,77  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  e 10 vezes menor para o  $\text{V}_{10}$  (0,966  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (FIGURA 38). O  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  destaca-se nestes ensaios porque os resultados de IC<sub>50</sub> na linhagem normal têm diminuição de viabilidade próxima a 50% da linhagem tumoral (Figura 37a), enquanto que para o  $\text{V}_{10}$  a diminuição foi somente 30% da viabilidade da linhagem tumoral. Neste contexto, em experimentos com animais esses dados precisam ser levados em consideração para escolha das doses.

FIGURA 38 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem HB4a em diferentes concentrações do POV em 24 h, em (a) para  $(\text{Et}_3\text{NH})_2[\text{V}_6\text{O}_{13}(\text{L}^{\text{Et}})_2]$  ( $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$ ) e (b) para  $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$  ( $\text{V}_{10}$ ). Curva de IC<sub>50</sub> em (c) para  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  e (d) para  $\text{V}_{10}$ .



Prevendo a possibilidade de ampliar nossos estudos para modelos animais, incluímos o modelo celular de câncer de mama murino (4T1), o qual é um modelo de câncer de mama metastático aceito como referência para comparar com o câncer de mama humano.<sup>121</sup> O ensaio de viabilidade mitocondrial para o  $V_6L^{Et}$  resultou em um valor de  $IC_{50}$  de  $2,97 \mu\text{mol L}^{-1}$ , e mostrou-se dependente da concentração do POV (FIGURA 39).

FIGURA 39 – (a) Avaliação do efeito citotóxico do  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ) na linhagem 4T1 (em roxo). (b) Curva de  $IC_{50}$ .



Comparando-se esse resultado com o obtido para a linhagem celular de MDA-MB-231, nota-se que o POV é mais tóxico para o modelo murino do que para o modelo humano, além de apresentar uma maior toxicidade quando comparado a linhagem normal de mama humano. Esse resultado é interessante, pois pode sugerir boas repostas do composto  $V_6L^{Et}$  na futura realização de testes em camundongos.

#### 5.4.1.2 Ensaio de migração celular (Wound Healing)

O ensaio de Wound Healing, popularmente conhecido como ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*, é um método simples que permite estudar a migração celular. A linhagem MDA-MB-231 é composta por células de câncer de mama com características mesenquimais (formato fusiforme) e, portanto, possuem habilidade

migratória.<sup>154</sup> Nesta técnica, as células de câncer foram cultivadas em meio RPMI, em uma placa de 6 poços, até formar uma monocamada de células confluentes. A seguir uma fenda foi gerada e o meio de cultura foi substituído por outro contendo o POV ( $V_6L^{Et}$  ou  $V_{10}$ ) nas concentrações desejadas. O fechamento da ranhura, causado pela migração celular foi quantificado fotografando os poços com um microscópio invertido nos intervalos de tempo 0, 24 e 48 h. Para avaliar um possível efeito sobre o processo de migração celular, foram selecionadas as concentrações de  $V_6L^{Et}$  de 4,50 e 8,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (valores inferiores a  $IC_{50}$  de 9,77  $\mu\text{mol L}^{-1}$  obtida para a linhagem normal HB4a). Para o  $V_{10}$  os valores empregados foram 0,450  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,900  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

As FIGURAS 40a e 41a (experimento controle) apresentam imagens selecionadas de um total de 6 repetições de cada condição, onde observa-se a migração padrão da linhagem sem tratamento sobre a fenda. Nos tratamentos com o  $V_6L^{Et}$  houve inibição da migração (FIGURA 40a). Com o aumento na concentração em cerca de 1 vez, mas ainda inferior a  $IC_{50}$ , a migração da linhagem diminuiu e consequentemente a área da lacuna aumentou, de 71% para 80%, após 48 h (FIGURA 40b). A diminuição da migração é essencial para uma terapia que vise não só a redução de um tumor, mas também retardar, ou até mesmo impedir um processo de metástase. O estudo realizado em paralelo com o  $V_{10}$  não gerou mudança significativa na migração celular ao longo do tempo (FIGURA 41).





#### 5.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura das células

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada nas linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231) e na linhagem normal de mama humano (HB4a), para  $V_6L^{Et}$  e  $V_{10}$ , a fim de verificar se os compostos interferem na morfologia celular em concentrações menores do que o valor obtido de  $IC_{50}$  para a linhagem normal de mama.

As concentrações utilizadas de  $V_6L^{Et}$  foram de 4,50 e 8,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para ambas as linhagens celulares. As imagens de MEV podem ser observadas na FIGURA 42, na linhagem MDA-MB-231, e na FIGURA 43, na linhagem HB4a. Para a linhagem MDA-MB-231 (FIGURA 42b,c) nota-se que em comparação com o controle (FIGURA 42a), ocorreu a perda do formato fusiforme característico desta linhagem, em ambas as concentrações estudadas, para um formato ameboide. Essa morfologia é geralmente relacionada a uma menor capacidade migratória, o que corrobora os ensaios de migração celular anteriormente discutidos. Finalmente, na maior dose do POV ocorreu a formação de microvesículas associadas ao início do processo de morte celular. Essas alterações morfológicas nas células podem estar relacionadas com o citoesqueleto e com a actina.

Já para a HB4a (FIGURA 43b,c), notou-se uma maior diminuição do número de células, o que era esperado, visto que o composto  $V_6L^{Et}$  é mais agressivo para essa linhagem, além de um elevado aumento no número de vesículas. Entretanto, não se notou grande diferença no formato ameboide característico das células HB4a, observado no controle (FIGURA 43a).

FIGURA 42 – Imagens de MEV para o produto  $V_6L^{Et}$ , na linhagem celular MDA-MB-231 em aproximações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x, em (a) para os controles, (b) na concentração de  $4,50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) na concentração de  $8,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

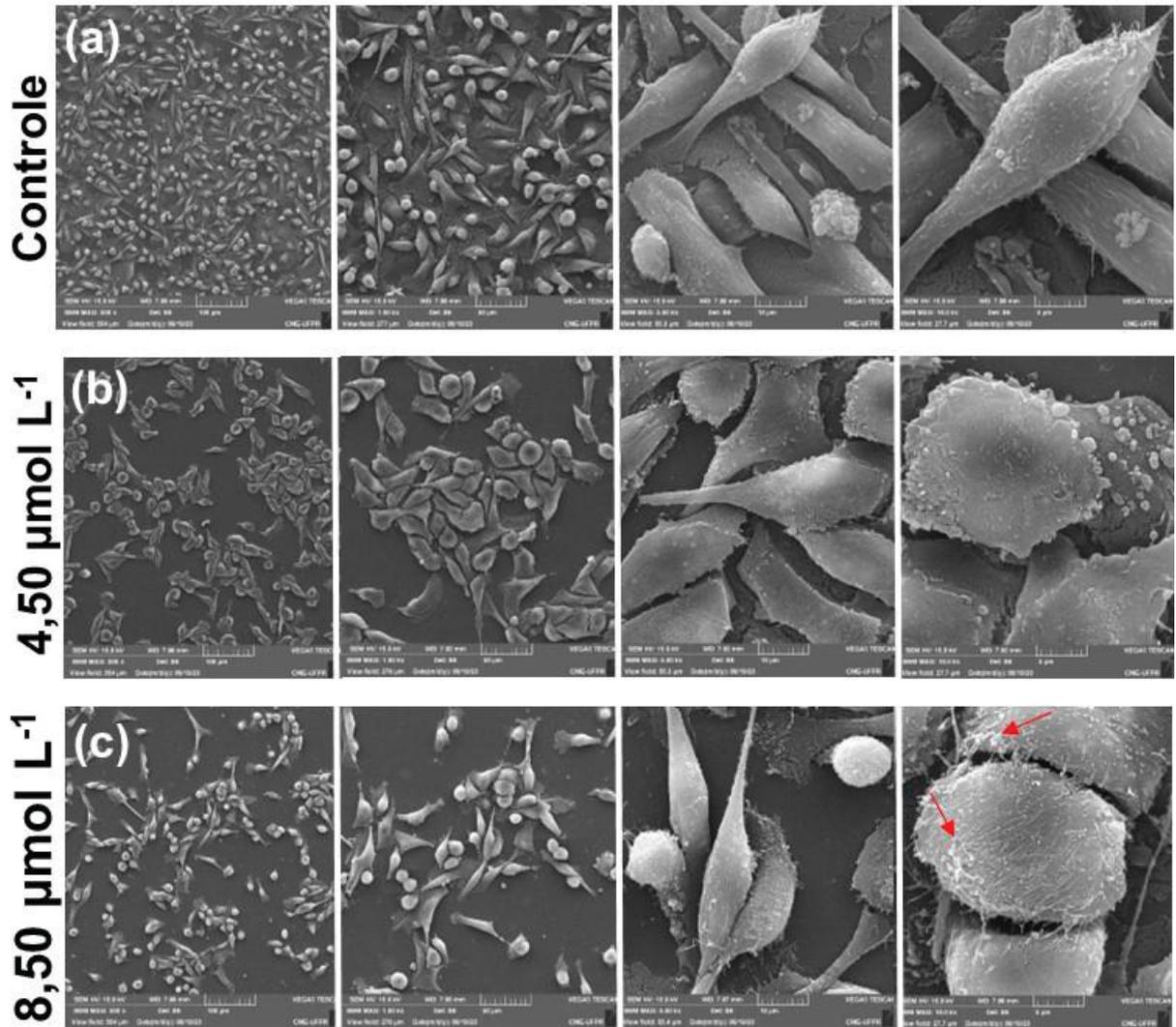
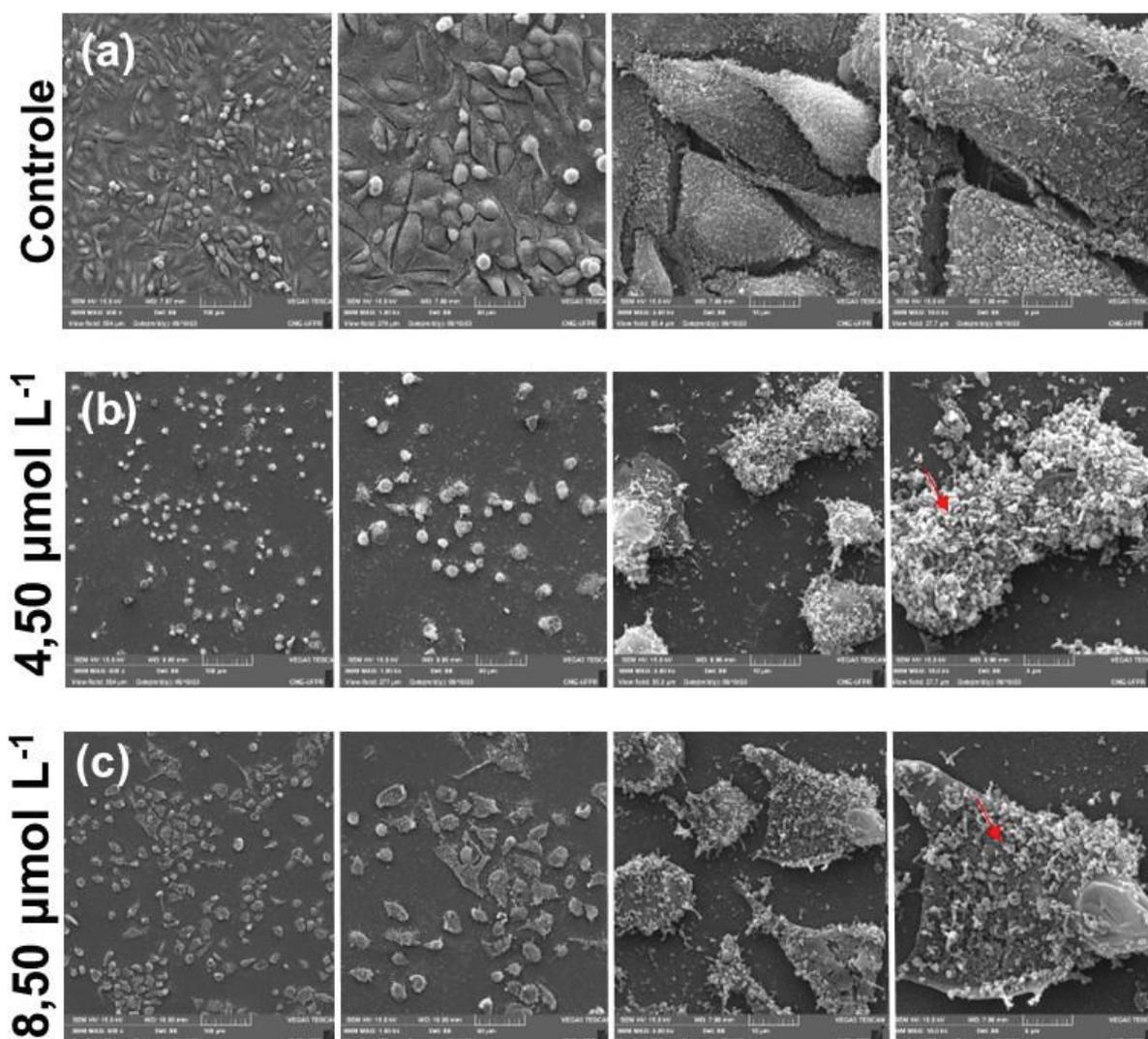
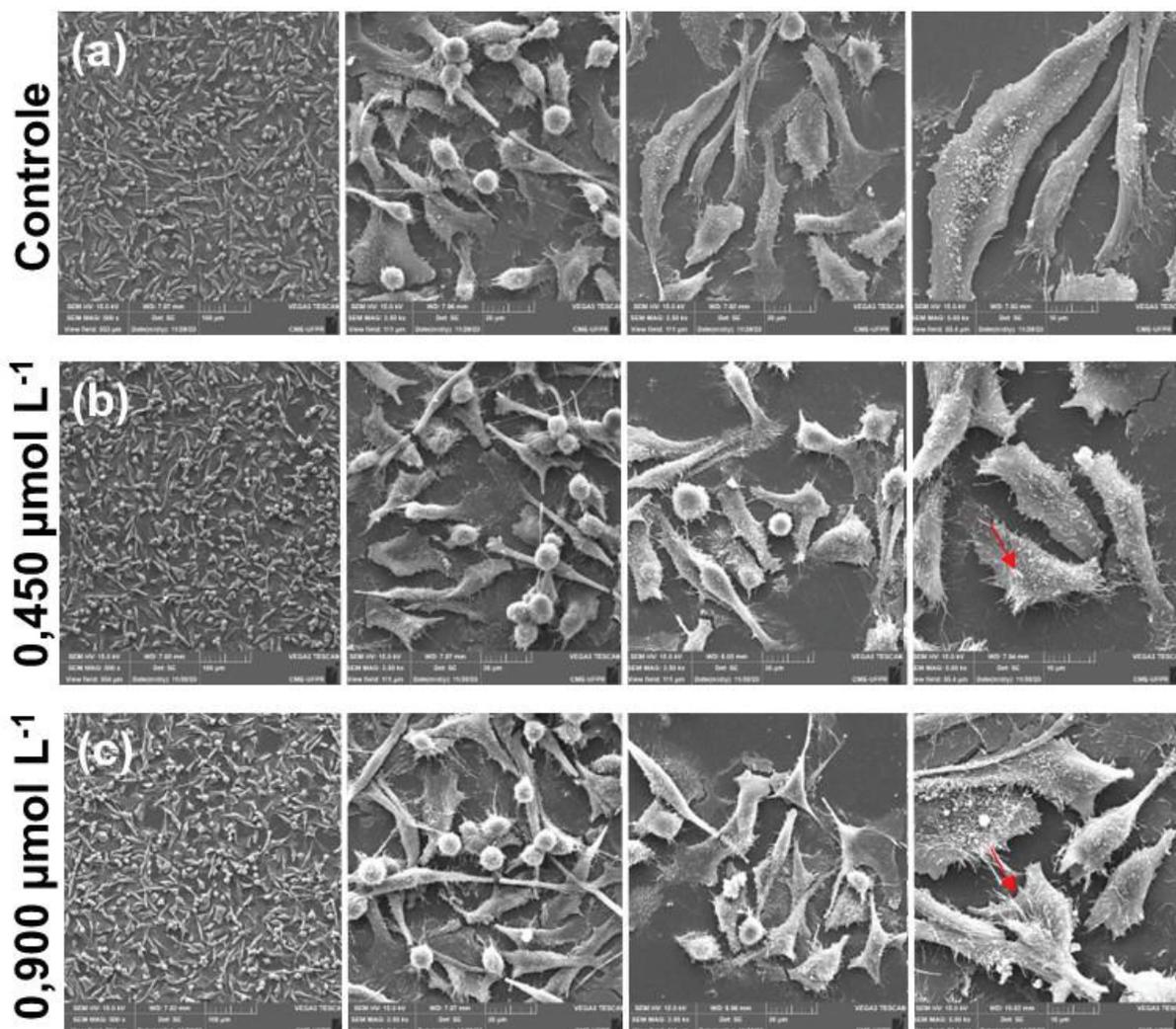


FIGURA 43 – Imagens de MEV para o produto  $V_6L^{Et}$ , para a linhagem celular HB4a em aproximações de 500x, 1000x, 5000x e 10000x, em (a) para os controles, (b) na concentração de  $4,50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) na concentração de  $8,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



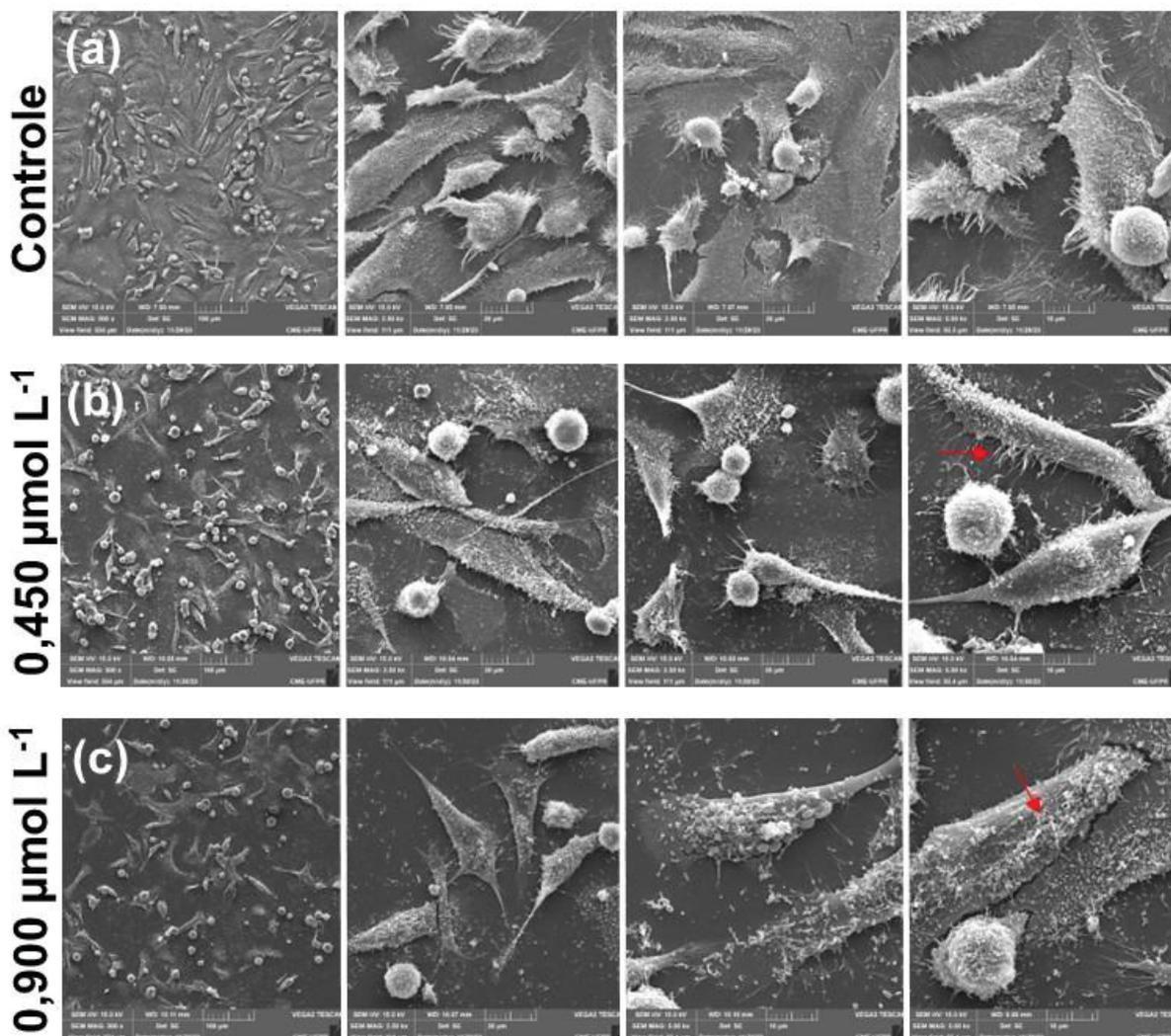
A fim de verificar se o tratamento das células com o decavanadato influencia na morfologia celular, foram analisadas as imagens de MEV das células, nas concentrações de  $V_{10}$  de  $0,450$  e  $0,900 \mu\text{mol L}^{-1}$  (FIGURA 44 e 45), em ambas as linhagens celulares.

FIGURA 44 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o produto  $V_{10}$  na linhagem celular MDA-MB-231, nas aproximações de 500x, 2500x e 5000x, em (a) para o controle, (b) na concentração de  $0,450 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) na concentração de  $0,900 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



Para o  $V_{10}$ , as imagens de MEV para a linhagem MDA-MB-231 podem ser observadas na FIGURA 44, na qual em ambas as concentrações utilizadas, quando comparadas ao controle (FIGURA 44a), observou-se um aumento do número de células mortas ou não aderidas (formato esférico), além de um aumento no número de vesículas das células em formato fusiforme. Em relação às células aderidas, não houve grande diferença na morfologia, visto que a maioria permanece alongada, assim como o controle. Algumas células estão descoladas e apresentam um formato esférico, indicando que estão mortas. Esses dados corroboram os obtidos no ensaio de migração celular.

FIGURA 45 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o produto  $V_{10}$  na linhagem celular HB4a, nas aproximações de 500x, 2500x e 5000x, em (a) para o controle, (b) na concentração de  $0,450 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (c) na concentração de  $0,900 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

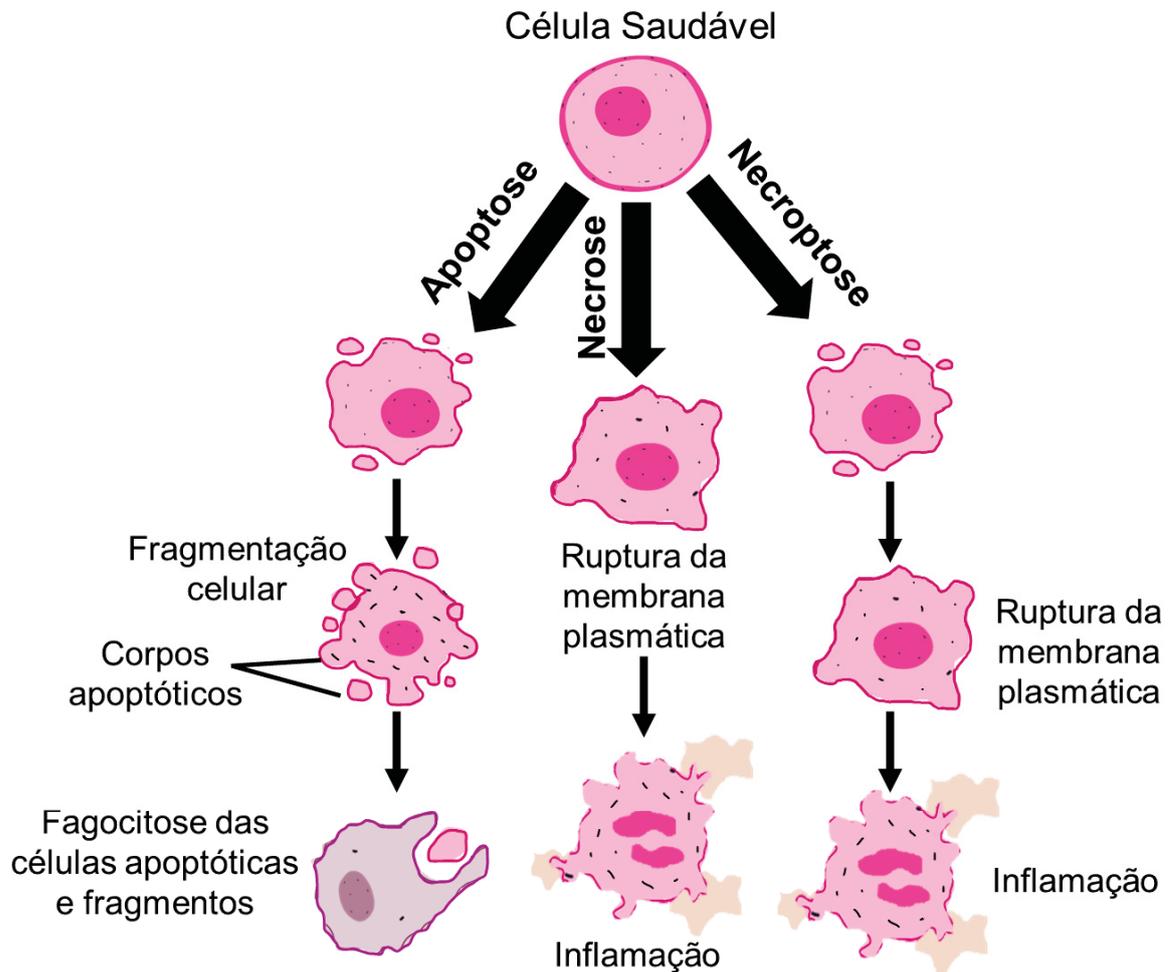


Nas imagens registradas para a linhagem HB4a (FIGURA 45), observou-se uma maior quantidade de células em formato esférico, provavelmente células mortas, e um maior número de vesículas. Entretanto, não foi observado grande diferença na morfologia das células vivas em comparação ao controle, com o aumento da concentração de  $V_{10}$ .

#### 5.4.1.4 Avaliação da expressão gênica na linhagem celular MDA-MB-231

Existem três mecanismos clássicos de morte celular, são eles: apoptose, necrose e necroptose, como observado na FIGURA 46.

FIGURA 46 – Mecanismos clássicos de morte celular.



A apoptose é uma morte celular programada e “organizada”, essencial para o desenvolvimento e a homeostase do organismo, que não gera uma resposta inflamatória. Ela é caracterizada pela contração celular e formação de corpos apoptóticos, e como o conteúdo celular não é liberado na corrente sanguínea não ocorre resposta inflamatória. Esse mecanismo pode ser desencadeado por sinais internos, como dano ao DNA, ou externos, como a sinalização de morte celular.<sup>155</sup>

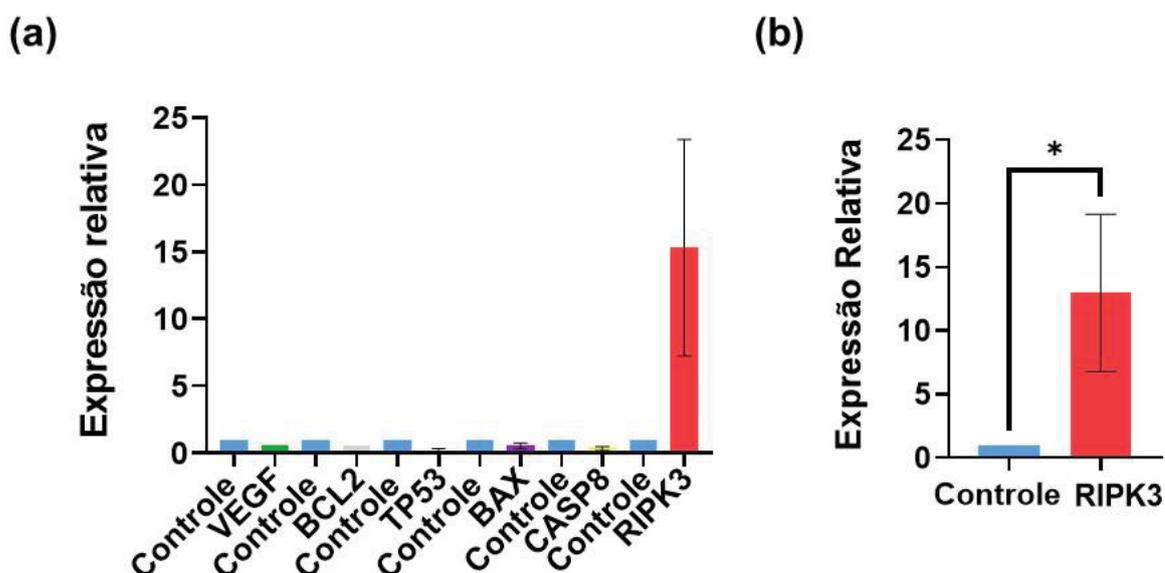
A necrose é uma morte celular não programada, geralmente desencadeada por injúrias ou danos extremos ao tecido. Diferentemente da apoptose, é um processo inflamatório que resulta na liberação de conteúdo celular para a corrente sanguínea. Ela é caracterizada por inchaço celular e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação do conteúdo celular e à consequente resposta inflamatória. Esse mecanismo pode ser causado principalmente por falta de suprimento sanguíneo.<sup>155</sup>

A necroptose é uma morte celular que se assemelha em morfologia à necrose clássica, entretanto, é uma morte celular inflamatória programada. Ao contrário da necrose, depende de uma via de sinalização mediada por quinases denominadas RIPK1 e RIPK3 e tem como molécula efetora a pseudoquinase MLKL.<sup>156</sup> Ela é caracterizada pela ruptura controlada da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular, mas com alguma regulação em comparação com a necrose.<sup>155</sup>

A partir dos resultados apresentados acima para os POVs, decidiu-se investigar o mecanismo de morte celular apenas para o  $V_6L^{Et}$  na linhagem MDA-MB-231, visto que como ele altera a morfologia celular, isso pode indicar que ele interage com a membrana desencadeando processos no interior da célula. Os genes escolhidos foram aqueles relacionados aos mecanismos de angiogênese (VEGF), apoptose (BCL2, TP53, CASP8 e BAX) e necroptose (RIPK3).

O gráfico de expressão relativa por gene (FIGURA 47) mostra o único gene que teve um aumento da expressão relativa em comparação ao controle foi o RIPK3, cuja expressão aumentou em 15 vezes. A expressão desse gene indica que um dos mecanismos de morte celular provocado pelo  $V_6L^{Et}$  na linhagem de câncer de mama pode ocorrer por necroptose.

FIGURA 47 – Avaliação da expressão relativa dos genes na linhagem MDA-MB-231 tratada com  $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  do composto  $(Et_3NH)_2[V_6O_{13}(L^{Et})_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ). Em (a) gráfico da expressão relativa com todos os genes testados, e em (b) triplicata com o gene que apresentou superexpressão, RIPK3.



A interação como o  $V_6L^{Et}$  pode desencadear a via da necroptose, sinalizada a partir da ativação do gene RIPK3 que é um fator envolvido na formação do

necrossoma, ativado quando ocorre inativação ou inibição das caspases. O necrossoma, juntamente com outros fatores, migra para a membrana celular causando a ruptura e vazamento, levando à morte celular.<sup>157</sup>

Alguns estudos com POMs confirmam que essa classe de compostos é capaz de atravessar a membrana celular de células de câncer, localizando-se dentro do citoplasma, entretanto, o mecanismo de ação dos POMs ainda não foi muito explorado.<sup>158-163</sup> Yamase realizou o primeiro estudo sobre o mecanismo de POMs em células de câncer. O mecanismo proposto consiste na redução e reoxidação do POM e, portanto, dos componentes celulares da cadeia de transporte de elétrons, que podem inibir a formação de ATP, levando à morte celular por apoptose.<sup>164</sup>

Essa proposta de mecanismo é embasada em uma série de estudos que sugeriram que a citotoxicidade de POMs bioativos está diretamente relacionada ao seu potencial redox, entretanto, outros fatores como tamanho, estrutura e composição também desempenham grande influência na atividade dos POMs contra células de câncer.<sup>40</sup>

O ânion decavanadato,  $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ , é um potente inibidor de ATPase do tipo P, que são bombas iônicas que mantêm o equilíbrio iônico nas células, além de atuarem como transdutoras de sinal.<sup>165-167</sup> A atividade anticâncer relatada do ânion decavanadato e alguns outros POVs, geralmente se devem em parte da inibição das ATPases do tipo P, contudo, esse processo não é seletivo para células tumorais.<sup>90</sup>

Para a linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, um decavanadato funcionalizado descrito por Cheng et.al.,  $Na_4\{(HOCH_2CH_2)_3NH\}_2[V_{10}O_{28}] \cdot 6H_2O$ , apresentou mecanismo de morte celular por apoptose,<sup>102</sup> que consiste em uma morte celular programada acompanhada por diversas alterações morfológicas, bioquímicas e na arquitetura celular.

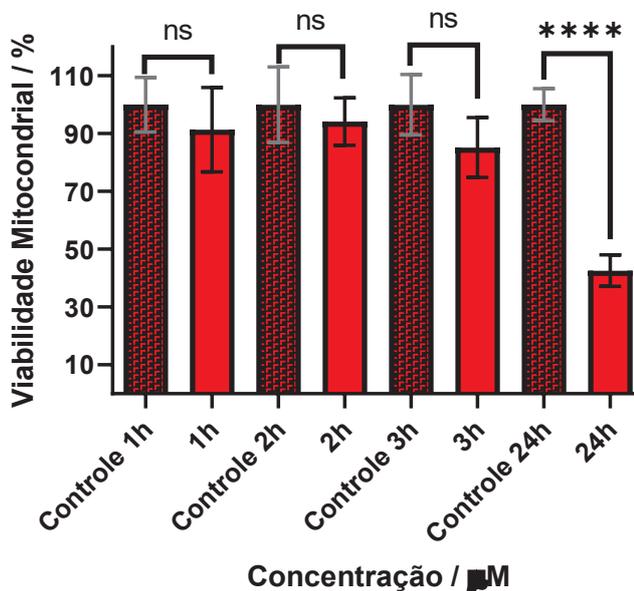
O mecanismo de morte celular descrito na literatura para o ânion decavanadato (apoptose) se diferencia do obtido neste trabalho para o  $V_6L^{Et}$ , que apresenta morte celular por necroptose. Essa diferença nos mecanismos de morte celular pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles a nuclearidade diferente de cada POV, as espécies formadas em solução, e a funcionalização do  $V_6L^{Et}$  com os dois ligantes álcoois tripédicos.

#### 5.4.1.5 Ensaios de citotoxicidade com variação de tempo de incubação

Os resultados de especiação obtidos pela análise de RMN de  $^{51}\text{V}$  para o  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  em meio RPMI (FIGURA 30) mostraram que o arcabouço polinuclear  $[\text{V}_6\text{O}_{13}\text{L}^{\text{Et}}]^{2-}$  se mantém em solução por até 3 h, decompondo-se em espécies de menor nuclearidade ( $\text{V}_1+\text{PV}$ ,  $\text{V}_3$  e  $\text{V}_5$ ) após este período. A partir desses resultados, um estudo foi realizado para avaliar se o  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  tem a maior contribuição para o valor de  $\text{IC}_{50}$ , ou se o resultado é devido a mistura de oxidovanadatos presentes em solução.

Para tal, realizou-se um experimento no qual as células de MDA-MB-231 foram tratadas com uma solução de  $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  (concentração da  $\text{IC}_{50}$ ) mantendo tempos de incubação de 1, 2, 3 e 24 h. O sobrenadante dos controles e das culturas contendo o POV foram retirados em cada tempo, e as células foram lavadas com PBS 1X. A seguir adicionou-se o meio RPMI, e a incubação foi mantida até completar 24 h, para em seguida realizar a adição de MTT em todos e determinar a viabilidade mitocondrial (FIGURA 48).

FIGURA 48 – Avaliação do efeito citotóxico do  $(\text{Et}_3\text{NH})_2[\text{V}_6\text{O}_{13}(\text{L}^{\text{Et}})_2]$  ( $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$ ) na linhagem MDA-MB-231(em vermelho), utilizando o valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , nos tempos de 1, 2, 3 e 24 h em comparação com os respectivos controles.



O gráfico da FIGURA 48 evidencia que não há diferença significativa nas três primeiras horas, quando comparados aos seus controles. Entretanto, após 24 h a viabilidade mitocondrial diminuiu em 50%, como esperado pelos ensaios de  $\text{IC}_{50}$ . Esse resultado sugere que o  $\text{V}_6\text{L}^{\text{Et}}$  não causa danos irreversíveis as células nas primeiras

horas, ou que outros oxidovanadatos que se formam em solução possam contribuir para os resultados de citotoxicidade observados.

#### 5.4.2 Polioxovanadatos de Valência Mista (POVs-VM)

Os resultados de inibição de viabilidade mitocondrial das células MDA-MB-231 tratadas com **MeCl@V<sub>15</sub>** e **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** por 24 h mostram uma dependência da concentração (FIGURA 49), resultando em um valor de IC<sub>50</sub> de 17,2 μmol L<sup>-1</sup> e 9,89 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (FIGURA 49 a,b). Os ensaios de viabilidade ao longo do tempo de 24, 48 e 72 h foram similares aos observados para o **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e ao **V<sub>10</sub>** e corroboram os valores de IC<sub>50</sub>. Os valores de IC<sub>50</sub> para as células normais HB4a foram 1,02 μmol L<sup>-1</sup> para **MeCl@V<sub>15</sub>** e 11,0 para **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** (FIGURA 50). O **MeCl@V<sub>15</sub>** foi 17 vezes mais tóxico para as células normais, do que para a linhagem tumoral. O **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** mostrou-se mais promissor, pois foi o único dos POVs avaliados até o momento que apresentou menor toxicidade para a células normais do que para as tumorais.

FIGURA 49 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações do POV em 24, em (a) para  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$  (**MeCl@V<sub>15</sub>**) e (b) para  $(\text{Bu}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]$  (**Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**). Curva de IC<sub>50</sub> em (c) para **MeCl@V<sub>15</sub>** e (d) para **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**. As curvas de Tempo para **MeCl@V<sub>15</sub>**<sup>t</sup> e **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** são apresentadas em (e) e (f), respectivamente.

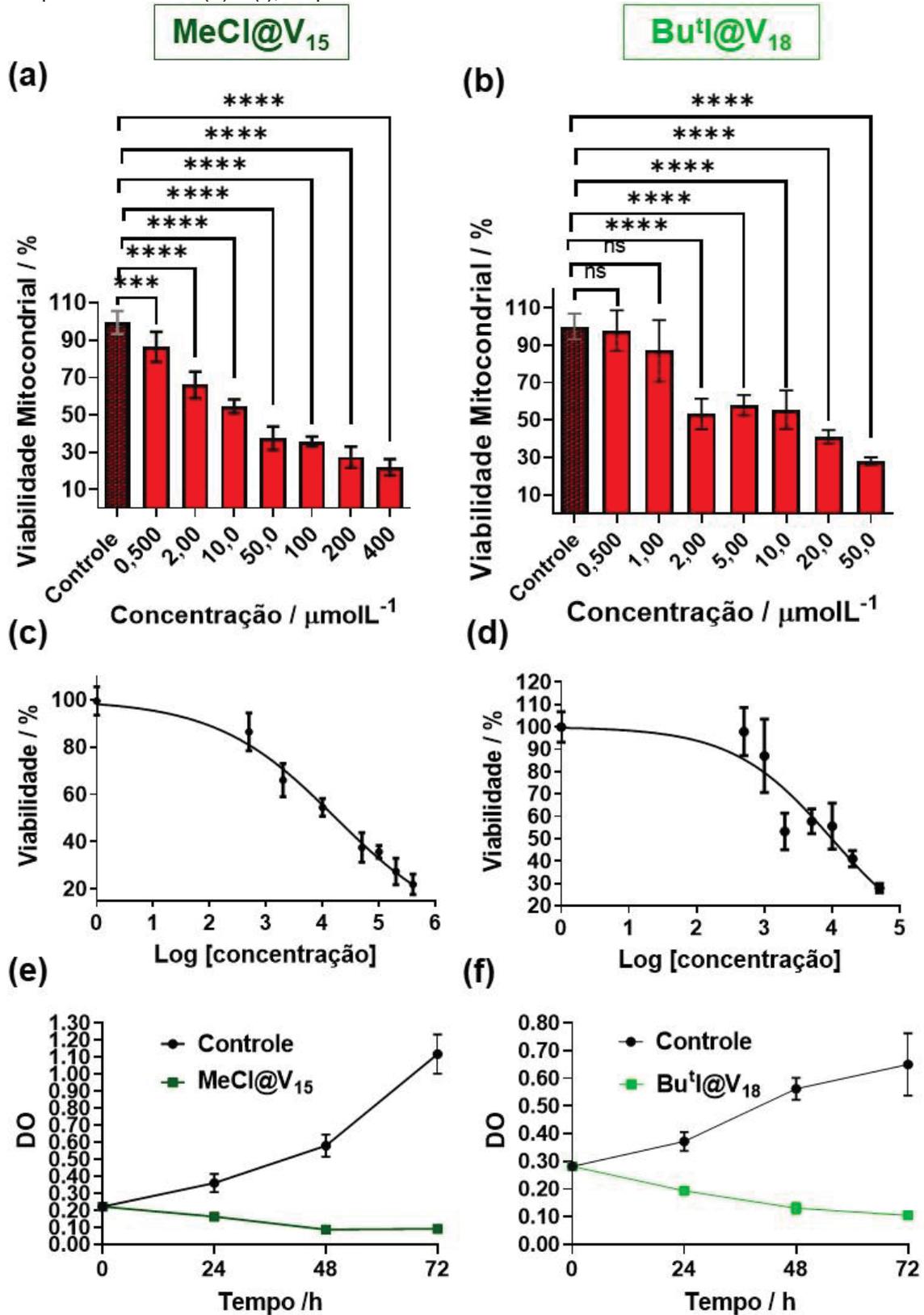
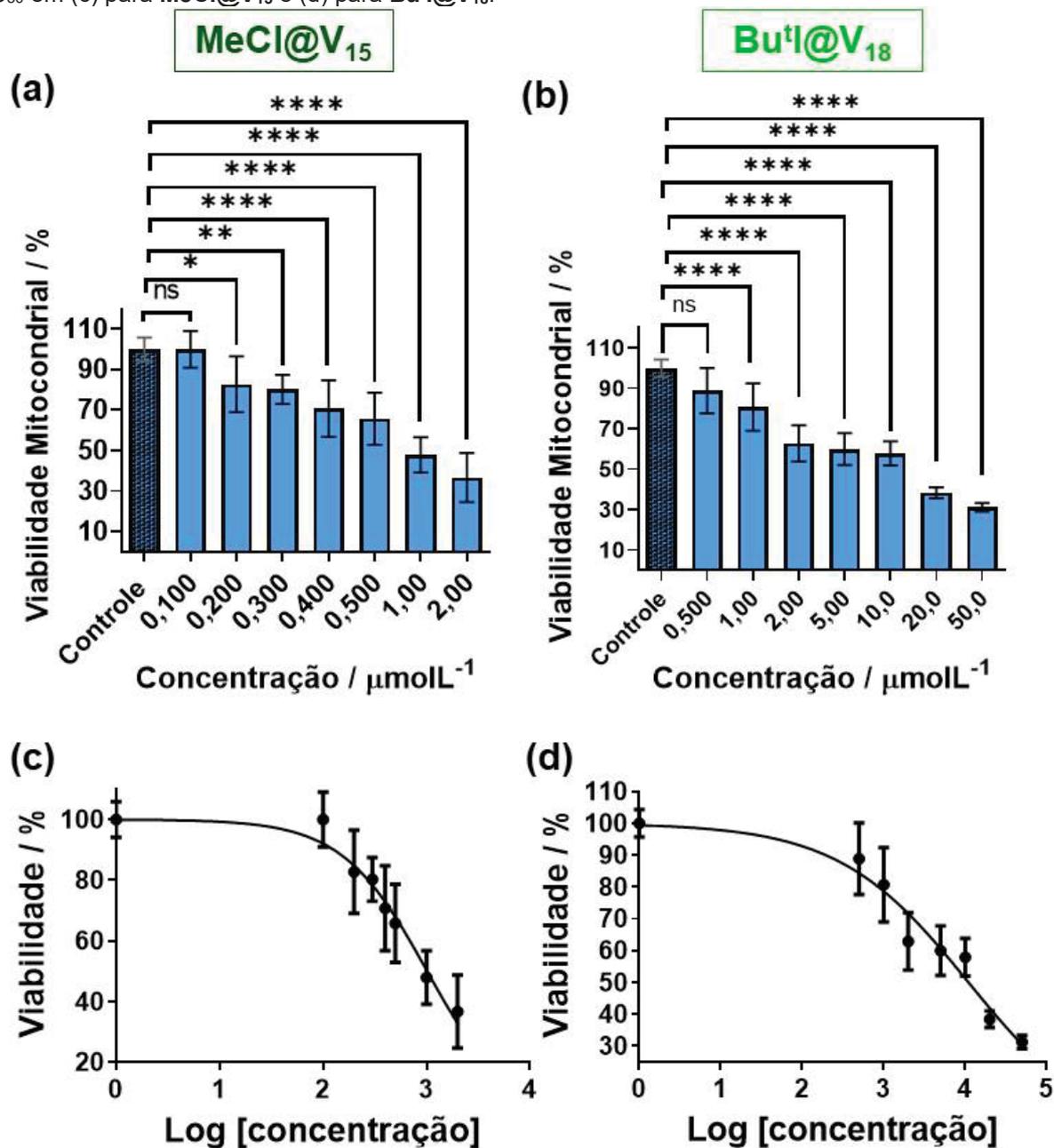


FIGURA 50 – Avaliação do efeito citotóxico na linhagem HB4a em diferentes concentrações do POV em 24 h, em (a) para  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$  (**MeCl@V<sub>15</sub>**) e (b) para  $(\text{Bu}_4\text{N})_5[\text{V}_{18}\text{O}_{42}]$  (**Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**). Curva de IC<sub>50</sub> em (c) para **MeCl@V<sub>15</sub>** e (d) para **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>**.



Na TABELA 9 são apresentados os valores de IC<sub>50</sub> obtidos com 24 h de incubação para os compostos **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>**, **MeCl@V<sub>15</sub>**, e **Bu<sup>l</sup>@V<sub>18</sub>** e **V<sub>10</sub>**, comparados com os valores relatados para outros polioxovanadatos encontrados na literatura que utilizam a mesma linhagem celular de câncer de mama.

TABELA 9 – Valores de IC<sub>50</sub> (μmol L<sup>-1</sup>) determinados para alguns polioxovanadatos nas linhagens celulares MDA-MB-231 e HB4a em 24h de incubação

	Polioxovanadato	MDA-MB-231	HB4a	Meio Celular	Referência
<b>V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup></b>	(Et <sub>3</sub> NH) <sub>2</sub> [V <sub>6</sub> O <sub>13</sub> (L <sup>Et</sup> ) <sub>2</sub> ]	17,6	9,77	RPMI	#
<b>MeCl@V<sub>15</sub></b>	(Me <sub>4</sub> N) <sub>6</sub> [V <sub>15</sub> O <sub>36</sub> (Cl)]	17,2	1,02	RPMI	#
<b>Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub></b>	(Bu <sub>4</sub> N) <sub>5</sub> [V <sub>18</sub> O <sub>42</sub> ]	9,89	11,0	RPMI	#
<b>V<sub>10</sub></b>	[V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ] <sup>6-</sup>	2,53	0,966	RPMI	#
<b>1</b>	K <sub>12</sub> [V <sup>IV</sup> <sub>18</sub> O <sub>42</sub> (H <sub>2</sub> O)]·6H <sub>2</sub> O	>500	-	DMEM	109
<b>2</b>	Mg(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (C <sub>4</sub> N <sub>2</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>4</sub> [V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ]·4H <sub>2</sub> O	10,0	-	DMEM	168
<b>3</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> Li <sub>2</sub> [V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ]·10H <sub>2</sub> O	125	-	DMEM	102

# Resultado deste trabalho. Onde C<sub>4</sub>N<sub>2</sub>H<sub>7</sub>=2-metilimidazol

Dentre os compostos listados, o POV contendo apenas V<sup>IV</sup>, [V<sup>IV</sup><sub>18</sub>O<sub>42</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>12-</sup> (**1**) apresenta o menor efeito citotóxico, cerca de 200 vezes menos potente que o **V<sub>10</sub>**. A diferença em relação a alta citotoxicidade de **MeCl@V<sub>15</sub>** e **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** sugere que o efeito do POV deve estar relacionado ao padrão estrutural e a estabilidade do agregado polinuclear, o qual é altamente dependente da natureza da entidade encapsulada. Enquanto os haletos estabilizam a estrutura do arcabouço polinuclear através de interações eletrostáticas, em [V<sup>IV</sup><sub>18</sub>O<sub>42</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>12-</sup> as forças atrativas entre a água encapsulada e os centros de vanádio no interior do POV são bem mais fracas.

Ainda que preliminares, os resultados da ação antiproliferativa do **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** são muito promissores. Este POV obteve o segundo melhor resultado de citotoxicidade para a linhagem de câncer, perdendo apenas para o **V<sub>10</sub>**, e uma menor toxicidade para a linhagem normal de mama humano, quando comparado aos POVs listados na TABELA 9. Os dados comprovaram a maior citotoxicidade do **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** para as células de câncer do que para as células normais, propondo-se que seu arcabouço polinuclear não se decompõe facilmente.

Até o momento, o efeito da funcionalização **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** ainda não foi bem compreendido, pois analisando-se apenas os valores de IC<sub>50</sub> para as células de câncer teve citotoxicidade semelhante ao **MeCl@V<sub>15</sub>**. Os compostos **2** e **3** da Tabela 8 são sais de decavanadato, variando na combinação de contraíons no número de moléculas de água cristalização presentes na estrutura. O sal **2** é um híbrido orgânico/inorgânico, enquanto **3** é um sal que só possui componentes inorgânicos. Os valores de IC<sub>50</sub> apontam para um efeito do contraíon, onde o sal contendo Li<sup>+</sup> rendeu um valor de IC<sub>50</sub> 50 vezes maior do que o observado para **V<sub>10</sub>**.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Atualmente já é bem conhecido que compostos de vanádio podem interferir nos diferentes estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), o que os torna promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. A classe dos polioxometalatos baseados em vanádio (polioxovanadatos) tem se mostrado promissora em estudos *in vitro* para diferentes linhagens de câncer.

Visando contribuir para este cenário, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo diversos derivados do ânion decavanadato e polioxovanadatos de valência mista ( $V^{IV}/V^V$ ) e avaliando a sua atividade em diferentes modelos biológicos, com especial interesse na ação antimicrobiana e antitumoral.

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados dois POVs inéditos, um hexavanadato de vanádio(V) funcionalizado com álcool tripédico, que já tinha sido preparado anteriormente pelo grupo de pesquisa, e um octadecavanadato de valência mista. Além deles, um pentadecavanadato já descrito na literatura, e o ânion decavanadato foram usados no trabalho, e todos os POVs foram testados em linhagem celulares, a de câncer de mama do subtipo triplo negativo (MDA-MB-231) e a linhagem normal de mama (HB4a).

O hexavanadato foi preparado empregando a metodologia desenvolvida pelo Dr. Gabriel Barros Baptistella, obtendo um POV de vanádio(V)  $(C_8H_{20}N)_2[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3CCH_2CH_3\}_2]$  ( $V_6L^{Et}$ ), produzindo cristais que cristalizaram no sistema monoclinico  $P2_1/n$  no formato de paralelepípedos alaranjados, com rendimento de 51,5%. O estudo de estabilidade em solução aquosa para os POVs de vanádio(V), o  $V_6L^{Et}$  e o ânion decavanadato ( $V_{10}$ ), mostrou a alta estabilidade em água para os dois compostos, que apresentaram os sinais mais intensos referentes aos arcabouços polinucleares por até 72 h de experimento. Entretanto, em meio celular RPMI, ambos os POVs mantiveram seus sinais característicos apenas até 3h de experimento, e após esse período, a prevalência foi de sinais de espécies de menor nuclearidade.

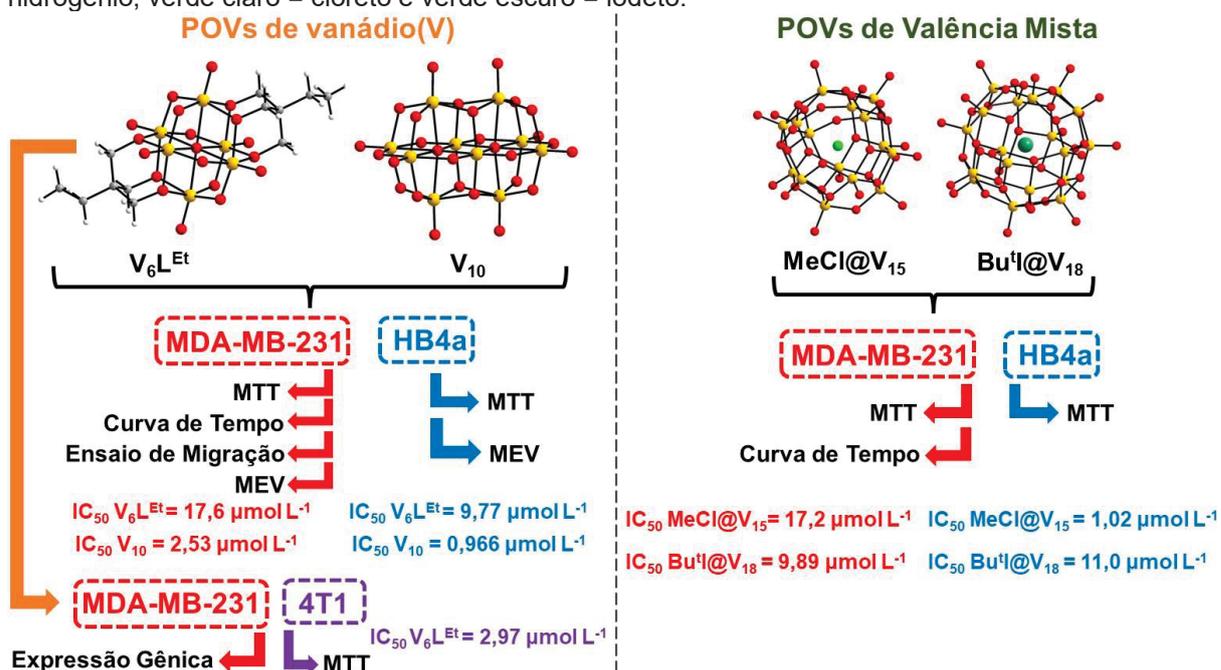
O pentadecavanadato  $[(CH_3)_4N]_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$  **MeCl@V<sub>15</sub>**,<sup>71</sup> foi preparado utilizando uma metodologia otimizada desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, produzindo cristais verde-escuros do sistema hexagonal  $P6_3/mmc$ , apresentando 63,4% de rendimento. Os estudos de especiação para este POV mostraram uma estabilidade nas soluções iniciais em água, entretanto, após 72 h de experimento

notou-se o aparecimento de sinais referentes ao ânion decavanadato. Já em meio celular RPMI, em todos os tempos estudados houve especiação para espécies de menor nuclearidade, provavelmente devido a possibilidade de interagir com componentes quelantes do meio, aminoácidos e vitaminas.

O octadecavanadato preparado apresentou rendimento de 36,3% e é constituído de um arcabouço pseudoesférico de valência mista com um iodeto encapsulado ( $\text{Bu}_4\text{N}$ )<sub>5</sub>[ $\text{V}_{18}\text{O}_{42}$ ] (**Bu<sup>+</sup>I@V<sub>18</sub>**). O **Bu<sup>+</sup>I@V<sub>18</sub>** análogo ao polioxidoânion descrito por Muller ( $\text{I@V}_{18}\text{O}_{42}^{x-}$ ) e que se difere de outro POV-VM estudado pelo grupo pela troca de cátion  $\text{Me}_4\text{N}^+$  por  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ .<sup>135</sup> Esta substituição impactou diretamente na solubilidade (em água ou solventes orgânicos) e na morfologia dos POV-VM (obtenção de cristais ou filmes). Esse POV apresentou alta estabilidade em solução aquosa, não apresentando sinais no espectro de RMN, o que indica que o arcabouço polinuclear não se quebrou em solução. Contudo, em meio celular ele apresentou especiação semelhante ao observado para o **MeCl@V<sub>15</sub>**.

O potencial dos POVs como novos agentes na terapia do câncer de mama no subtipo triplo negativo foi investigado na linhagem celular MDA-MB-231 (câncer de mama) e comparado com a linhagem de epitélio mamário normal HB4a. Até o momento, o **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** é o composto que está com seus estudos em estágio mais avançado. A Figura 51 resume os ensaios realizados até o momento.

FIGURA 51 – Esquema dos POVs sintetizados ou reproduzidos neste trabalho e seus respectivos estudos biológicos. Legenda: amarelo = vanádio, vermelho = oxigênio, cinza = carbono, branco = hidrogênio, verde claro = cloreto e verde escuro = iodeto.



Apesar de o hexavanadato  $V_6L^{Et}$  apresentar uma maior toxicidade às células normais, ele foi capaz de impedir a migração celular, diferentemente do que foi observado para  $V_{10}$  e  $MeCl@V_{15}$ , que se mostraram altamente citotóxicos para a linhagem HB4a e não foram capazes de impedir a migração celular das células de câncer. Dados da literatura *in vitro* mostram que o  $V_{10}$  tem excelente ação antitumoral.

Os estudos adicionais realizados com o  $V_6L^{Et}$  mostraram que o POV modifica a morfologia celular, o que não é observado para o  $V_{10}$ , e desencadeia a morte celular por meio da necroptose. Além disso, ele é tóxico para as células de câncer de mama murino (4T1), revelando-se mais agressivo para essa linhagem do que para as linhagens humanas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o  $V_6L^{Et}$  seria um candidato bastante promissor para desenvolver estudos *in vivo*. Neste sentido, estudos em camundongos BALB/cfCRH, um modelo aceito para comparar com o câncer de mama humano poderiam ser realizados no âmbito da UFPR.

Os POVs estudados apresentaram uma maior toxicidade à linhagem HB4a do que à MDA-MB-231, exceto o  $Bu^t@V_{18}$  que foi 0,90 vezes mais tóxico às células de câncer, revelando-se um composto promissor para dar continuidade nos estudos biológicos em comparação com  $V_6L^{Et}$  e  $V_{10}$ .

Os resultados aqui apresentados justificam a continuidade dos estudos, e a futura utilização dos outros POVs em desenvolvimento nos ensaios de viabilidade mitocondrial, com o intuito de comparar a influência de diferentes contraíons e ânions encapsulados na atividade do composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ME, J. F. et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **2024**.
- (2) *Estimativa 2023- Incidência de câncer no Brasil*. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023>. (acesso 09-08-2023).
- (3) Nedeljković, M.; Damjanović, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells* **2019**, *8* (9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>.
- (4) Bianchini, G.; Balko, J. M.; Mayer, I. A.; Sanders, M. E.; Gianni, L. Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease. *Nat Rev Clin Oncol* **2016**, *13* (11), 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>.
- (5) Carvalho, F.; Aureliano, M. Polyoxometalates Impact as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (5), 5043. <https://doi.org/10.3390/ijms24055043>.
- (6) Huang, J.-H.; Huang, F.; Evans, L.; Glasauer, S. Vanadium: Global (Bio)Geochemistry. *Chem Geol* **2015**, *417*, 68–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.09.019>.
- (7) Rehder, D. The Role of Vanadium in Biology. *Metallomics* **2015**, *7* (5), 730–742. <https://doi.org/10.1039/C4MT00304G>.
- (8) Sharfalddin, A. A.; Al-Younis, I. M.; Mohammed, H. A.; Dhahri, M.; Mouffouk, F.; Abu Ali, H.; Anwar, Md. J.; Qureshi, K. A.; Hussien, M. A.; Alghrably, M.; Jaremko, M.; Alasmael, N.; Lachowicz, J. I.; Emwas, A.-H. Therapeutic Properties of Vanadium Complexes. *Inorganics (Basel)* **2022**, *10* (12), 244. <https://doi.org/10.3390/inorganics10120244>.
- (9) Butler, A. Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms. *Science (1979)* **1998**, *281* (5374), 207–209. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.207>.
- (10) Trefry, J. H.; Metz, S. Role of Hydrothermal Precipitates in the Geochemical Cycling of Vanadium. *Nature* **1989**, *342* (6249), 531–533. <https://doi.org/10.1038/342531a0>.
- (11) Rehder, D. Biological and Medicinal Aspects of Vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*. Elsevier May 1, 2003, pp 604–617. [https://doi.org/10.1016/S1387-7003\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(03)00050-9).
- (12) Santos, M. F. A.; Pessoa, J. C. Interaction of Vanadium Complexes with Proteins: Revisiting the Reported Structures in the Protein Data Bank

- (PDB) since 2015. *Molecules* **2023**, *28* (18), 6538. <https://doi.org/10.3390/molecules28186538>.
- (13) Hanus-Fajerska, E.; Wiszniewska, A.; Kamińska, I. A Dual Role of Vanadium in Environmental Systems—Beneficial and Detrimental Effects on Terrestrial Plants and Humans. *Plants* **2021**, *10* (6), 1110. <https://doi.org/10.3390/plants10061110>.
- (14) Rehder, D. Import and Implications of Vanadium in Live Aspects. *Inorganics (Basel)* **2023**, *11* (6), 256. <https://doi.org/10.3390/inorganics11060256>.
- (15) Begum, A.; Vani, K.; Husain, A.; Chinnagalla, T.; Pradeep Kumar, M.; Swapna, S.; Ayodhya, D.; Shaik, A. A Comprehensive Review of Anti-Diabetic Activity of Vanadium-Based Complexes via PTP-1B Inhibition Mechanism. *Results Chem* **2023**, *6*, 101154. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101154>.
- (16) *Web of Science*. <https://access.clarivate.com/login?app=wos&alternative=true&shibShireURL=https:%2F%2Fwww.webofknowledge.com%2F%3Fauth%3DShibboleth&shibReturnURL=https:%2F%2Fwww.webofknowledge.com%2F%3FDestApp%3DUA%26action%3Dtransfer%26mode%3DNextgen%26path%3D%252Fwos&referrer=mode%3DNextgen%26path%3D%252Fwos%26DestApp%3DUA%26action%3Dtransfer&roaming=true> (acesso 02-02-2024).
- (17) Garribba, E. ; S. D. ; D. R. ; C. P. J. ; C. D. C. Hydrolysis, Ligand Exchange and Redox Properties of Vanadium Compounds. Implications of Solution Transformation and Environment, Biology and Therapeutic Applications. *Chem. Rev.* **2023**.
- (18) Amaral, L. M. P. F.; Moniz, T.; Silva, A. M. N.; Rangel, M. Vanadium Compounds with Antidiabetic Potential. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (21), 15675. <https://doi.org/10.3390/ijms242115675>.
- (19) Ferretti, V.; León, I. An Overview of Vanadium and Cell Signaling in Potential Cancer Treatments. *Inorganics (Basel)* **2022**, *10* (4), 47. <https://doi.org/10.3390/inorganics10040047>.
- (20) Huang, Y.; Liu, F.; Zhang, F.; Liu, P.; Xu, T.; Ding, W. Vanadium(IV)-Chlorodipicolinate Alleviates Hepatic Lipid Accumulation by Inducing Autophagy via the LKB1/AMPK Signaling Pathway in Vitro and in Vivo. *J Inorg Biochem* **2018**, *183*, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.006>.
- (21) Boruah, J. J.; Bhatt, Z. S.; Nathani, C. R.; Bambhaniya, V. J.; Guha, A. K.; Das, S. P. Green Synthesis of a Vanadium(V) Schiff Base Complex by Grinding Method: Study on Its Catalytic and Anti-Bacterial Activity. *J Coord Chem* **2021**, *74* (12), 2055–2068. <https://doi.org/10.1080/00958972.2021.1942861>.

- (22) Bhanot, S.; Michoulas, A.; McNeill, J. H. Antihypertensive Effects of Vanadium Compounds in Hyperinsulinemic, Hypertensive Rats. *Mol Cell Biochem* **1995**, *153* (1–2), 205–209. <https://doi.org/10.1007/BF01075939>.
- (23) Ścibior, A.; Pietrzyk, Ł.; Plewa, Z.; Skiba, A. Vanadium: Risks and Possible Benefits in the Light of a Comprehensive Overview of Its Pharmacotoxicological Mechanisms and Multi-Applications with a Summary of Further Research Trends. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2020**, *61*, 126508. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126508>.
- (24) 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* **2012**, *41* (21), 6419. <https://doi.org/10.1039/c2dt30521f>.
- (25) Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D. Vanadium Compounds in Medicine. *Coord Chem Rev* **2015**, *301–302*, 24–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>.
- (26) Evangelou, A. M. Vanadium in Cancer Treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* **2002**, *42* (3), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00221-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00221-9).
- (27) Ray, R. S.; Rana, B.; Swami, B.; Venu, V.; Chatterjee, M. Vanadium Mediated Apoptosis and Cell Cycle Arrest in MCF7 Cell Line. *Chem Biol Interact* **2006**, *163* (3), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.08.006>.
- (28) Klein, A.; Holko, P.; Ligeza, J.; Kordowiak, A. M. Sodium Orthovanadate Affects Growth of Some Human Epithelial Cancer Cells (A549, HTB44, DU145). *Folia Biol (Praha)* **2008**, *56* (3), 115–121. [https://doi.org/10.3409/fb.56\\_3-4.115-121](https://doi.org/10.3409/fb.56_3-4.115-121).
- (29) Kostova, I. Titanium and Vanadium Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem* **2009**, *9* (8), 827–842. <https://doi.org/10.2174/187152009789124646>.
- (30) Thompson, H. J.; Chasteen, N. D.; Meeker, L. D. Dietary Vanadyl(IV) Sulfate Inhibits Chemically-Induced Mammary Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1984**, *5* (6), 849–851. <https://doi.org/10.1093/carcin/5.6.849>.
- (31) Köpf-Maier, P.; Wagner, W.; Hesse, B.; Köpf, H. Tumor Inhibition by Metallocenes: Activity against Leukemias and Detection of the Systemic Effect. *European Journal of Cancer (1965)* **1981**, *17* (6), 665–669. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(81\)90270-X](https://doi.org/10.1016/0014-2964(81)90270-X).
- (32) Köpf-Maier, P.; Köpf, H. Vanadocen-Dichlorid - Ein Weiteres Antitumor-Agens Aus Der Metallocenreihe / Vanadocene Dichloride - Another Antitumor Agent from the Metallocene Series. *Zeitschrift für*

- Naturforschung B* **1979**, *34* (6), 805–807. <https://doi.org/10.1515/znb-1979-0609>.
- (33) D’Cruz, O. J.; Uckun, F. M. Metvan: A Novel Oxovanadium(IV) Complex with Broad Spectrum Anticancer Activity. *Expert Opin Investig Drugs* **2002**, *11* (12), 1829–1836. <https://doi.org/10.1517/13543784.11.12.1829>.
- (34) Petanidis, S.; Kioseoglou, E.; Hadzopoulou-Cladaras, M.; Salifoglou, A. Novel Ternary Vanadium-Betaine-Peroxido Species Suppresses H-Ras and Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Increasing Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. *Cancer Lett* **2013**, *335* (2), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.052>.
- (35) Gu, Y.; Li, Q.; Huang, Y.; Zhu, Y.; Wei, Y.; Ruhlmann, L. Polyoxovanadate-Iodobodipy Supramolecular Assemblies: New Agents for High Efficiency Cancer Photochemotherapy. *Chemical Communications* **2020**, *56* (19), 2869–2872. <https://doi.org/10.1039/C9CC09944A>.
- (36) Sankar Ray, R.; Roy, S.; Ghosh, S.; Kumar, M.; Chatterjee, M. Suppression of Cell Proliferation, DNA Protein Cross-Links, and Induction of Apoptosis by Vanadium in Chemical Rat Mammary Carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2004**, *1675* (1–3), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.09.004>.
- (37) Rizk, S. L.; Sky-Peck, H. H. Comparison between Concentrations of Trace Elements in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue. *Cancer Res* **1984**, *44* (11), 5390–5394.
- (38) León, I. E.; Porro, V.; Astrada, S.; Egusquiza, M. G.; Cabello, C. I.; Bollati-Fogolin, M.; Etcheverry, S. B. Polyoxometalates as Antitumor Agents: Bioactivity of a New Polyoxometalate with Copper on a Human Osteosarcoma Model. *Chem Biol Interact* **2014**, *222*, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.012>.
- (39) Bijelic, A.; Rompel, A. Polyoxometalates: More than a Phasing Tool in Protein Crystallography. *ChemTexts* **2018**, *4* (3), 10. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0064-1>.
- (40) Bijelic, A.; Aureliano, M.; Rompel, A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (10), 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>.
- (41) 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* **2016**, *52* (24), 4418–4445. <https://doi.org/10.1039/C5CC10447E>.
- (42) 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* **2011**, *17* (50), 14129–14138. <https://doi.org/10.1002/chem.201101754>.
- (43) Raza, R.; Matin, A.; Sarwar, S.; Barsukova-Stuckart, M.; Ibrahim, M.; Kortz, U.; Iqbal, J. Polyoxometalates as Potent and Selective Inhibitors of Alkaline Phosphatases with Profound Anticancer and Amoebicidal Activities. *Dalton Transactions* **2012**, *41* (47), 14329. <https://doi.org/10.1039/c2dt31784b>.
- (44) Pu, F.; Wang, E.; Jiang, H.; Ren, J. Identification of Polyoxometalates as Inhibitors of Basic Fibroblast Growth Factor. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9* (1), 113–120. <https://doi.org/10.1039/C2MB25389E>.
- (45) Pope, M. T.; Müller, A. Polyoxometalate Chemistry: An Old Field with New Dimensions in Several Disciplines. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30* (1), 34–48. <https://doi.org/10.1002/anie.199100341>.
- (46) Kiss, T.; Odani, A. Demonstration of the Importance of Metal Ion Speciation in Bioactive Systems. *Bull Chem Soc Jpn* **2007**, *80* (9), 1691–1702. <https://doi.org/10.1246/bcsj.80.1691>.
- (47) Crans, D. C. Applications of Speciation Chemistry in a Modern Society. *Coord Chem Rev* **2017**, *352*, 398–400. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.008>.
- (48) Gumerova, N. I.; Rompel, A. Polyoxometalates in Solution: Speciation under Spotlight. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (21), 7568–7601. <https://doi.org/10.1039/D0CS00392A>.
- (49) Hayashi, Y. Hetero and Lacunary Polyoxovanadate Chemistry: Synthesis, Reactivity and Structural Aspects. *Coord Chem Rev* **2011**, *255* (19–20), 2270–2280. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.013>.
- (50) Aureliano, M.; Gumerova, N. I.; Sciortino, G.; Garribba, E.; Rompel, A.; Crans, D. C. Polyoxovanadates with Emerging Biomedical Activities. *Coord Chem Rev* **2021**, *447*, 214143. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214143>.
- (51) Livage, J. Hydrothermal Synthesis of Nanostructured Vanadium Oxides. *Materials* **2010**, *3* (8), 4175–4195. <https://doi.org/10.3390/ma3084175>.
- (52) Rebecca H. Laye; Qiang Wei; Pamela V. Mason; Maheswaran Shanmugam; Simon J. Teat; Euan K. Brechin; David Collison; Eric J. L.McInnes. A Highly Reduced Vanadium(III/IV) Polyoxovanadate Comprising an Octavanadyl Square-Prism Surrounding a Dimetallic Vanadium(III) Fragment. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 9020–9021.

- (53) Wang, J.; Liu, X.; Du, Z.; Xu, Y. Organo-Functionalized Polyoxovanadates: Crystal Architecture and Property Aspects. *Dalton Transactions* **2021**, 50 (23), 7871–7886. <https://doi.org/10.1039/D1DT00494H>.
- (54) Monakhov, K. Yu.; Bensch, W.; Kögerler, P. Semimetal-Functionalised Polyoxovanadates. *Chem Soc Rev* **2015**, 44 (23), 8443–8483. <https://doi.org/10.1039/C5CS00531K>.
- (55) 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: Na<sub>2</sub>[V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>{(OCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>}<sub>4</sub>]. *Inorg Chem Commun* **2017**, 84, 96–98. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2017.08.010>.
- (56) Aureliano, M.; Ohlin, C. A. Decavanadate in Vitro and in Vivo Effects: Facts and Opinions. *J Inorg Biochem* **2014**, 137, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.05.002>.
- (57) Aureliano, M.; Gândara, R. M. C. Decavanadate Effects in Biological Systems. *J Inorg Biochem* **2005**, 99 (5), 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.024>.
- (58) 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. *Inorg Chem* **2017**, 56 (18), 10893–10903. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01018>.
- (59) 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. *Eur J Inorg Chem* **2013**, 2013 (10–11), 1859–1868. <https://doi.org/10.1002/ejic.201201345>.
- (60) Evans, H. T. The Molecular Structure of the Isopoly Complex Ion, Decavanadate (V<sub>10</sub>O<sub>28</sub><sup>6-</sup>). *Inorg Chem* **1966**, 5 (6), 967–977. <https://doi.org/10.1021/ic50040a004>.
- (61) Lunk, H.-J.; Hartl, H. The Fascinating Polyoxometalates. *ChemTexts* **2021**, 7 (4), 26. <https://doi.org/10.1007/s40828-021-00145-y>.
- (62) Linnenberg, O.; Kondinski, A.; Stöcker, C.; Monakhov, K. Yu. The Cu(I)-Catalysed Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition Route to (Bio-)Organic Functionalisation of Polyoxovanadates. *Dalton Transactions* **2017**, 46 (45), 15636–15640. <https://doi.org/10.1039/C7DT03376A>.
- (63) Gao, Y.; Chi, Y.; Hu, C. Organic-Functionalized, Substituted Polyoxovanadium and Vanadoniobates: Synthesis, Structure and Application. *Polyhedron* **2014**, 83, 242–258. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.08.018>.
- (64) LINNENBERG, O. K. A. M. K. Yu. The Lindqvist Hexavanadate: A Platform for Coordination Directed Assembly. In *Supramolecular Systems: Chemistry, Types and Applications*; 2017; pp 33–66.

- (65) Chen, Q.; Goshorn, D. P.; Scholes, C. P.; Tan, X. L.; Zubieta, J. Coordination Compounds of Polyoxovanadates with a Hexametalate Core. Chemical and Structural Characterization of  $[V^V_6O_{13}[(OCH_2)_3CR]_2]^{2-}$ ,  $[V^V_6O_{11}(OH)_2[(OCH_2)_3CR]_2]$ ,  $[V^{IV}_4V^V_2O_9(OH)_4[(OCH_2)_3CR]_2]^{2-}$ , and  $[V^V_6O_7(OH)_6]_2[(OCH_2)_3CR]_2]^{2-}$ . *J Am Chem Soc* **1992**, *114* (12), 4667–4681. <https://doi.org/10.1021/ja00038a033>.
- (66) 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. *Cryst Growth Des* **2008**, *8* (11), 4092–4099. <https://doi.org/10.1021/cg800534v>.
- (67) Zhang, C.-D.; Liu, S.-X.; Gao, B.; Sun, C.-Y.; Xie, L.-H.; Yu, M.; Peng, J. Hybrid Materials Based on Metal–Organic Coordination Complexes and Cage-like Polyoxovanadate Clusters: Synthesis, Characterization and Magnetic Properties. *Polyhedron* **2007**, *26* (7), 1514–1522. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2006.11.050>.
- (68) HASENKNOPF, B. Polyoxometalates: Introduction to a Class of Inorganic Compounds and Their Biomedical Applications. *Front. Biosci* **2005**, *10*, 102741.
- (69) Hagrman, P. J.; Finn, R. C.; Zubieta, J. Molecular Manipulation of Solid State Structure: Influences of Organic Components on Vanadium Oxide Architectures. *Solid State Sci* **2001**, *3* (7), 745–774. [https://doi.org/10.1016/S1293-2558\(01\)01186-4](https://doi.org/10.1016/S1293-2558(01)01186-4).
- (70) Ammam, M. Polyoxometalates: Formation, Structures, Principal Properties, Main Deposition Methods and Application in Sensing. *J Mater Chem A Mater* **2013**, *1* (21), 6291. <https://doi.org/10.1039/c3ta01663c>.
- (71) 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. de O.; Soares, J. F.; de Souza, E. M. Synthesis, Characterization and Chemoprotective Activity of Polyoxovanadates against DNA Alkylation. *J Inorg Biochem* **2012**, *108*, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.019>.
- (72) 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 Adv* **2016**, *6* (115), 114955–114968. <https://doi.org/10.1039/C6RA15826A>.
- (73) Postal, K.; Santana, F. S.; Hughes, D. L.; Rüdiger, A. L.; Ribeiro, R. R.; Sá, E. L.; de Souza, E. M.; Soares, J. F.; Nunes, G. G. Stability in Solution and Chemoprotection by Octadecavanadates(IV/V) in E. Coli Cultures. *J Inorg Biochem* **2021**, *219*, 111438. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111438>.

- (74) Kahoana Postal. Síntese, estudos de especiação em solução e avaliação da atividade biológica de polioxovanadatos pseudoesféricos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.
- (75) 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* **2020**, *12* (7), 1044–1061. <https://doi.org/10.1039/d0mt00044b>.
- (76) Barbosa, M. de M.; Lima, L. M. A. de; Alves, W. A. da S.; Lima, E. K. B. de; Silva, L. A. da; Silva, T. D. da; Postal, K.; Ramadan, M.; Kostenkova, K.; Gomes, D. A.; Nunes, G. G.; Pereira, M. C.; Silva, W. E. da; Belian, M. F.; Crans, D. C.; Lira, E. C. In Vitro, Oral Acute, and Repeated 28-Day Oral Dose Toxicity of a Mixed-Valence Polyoxovanadate Cluster. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (9), 1232. <https://doi.org/10.3390/ph16091232>.
- (77) Pettersson, L. Equilibria of Polyoxometalates in Aqueous Solution. *Molecular Engineering* **1993**, *3* (1–3), 29–42. <https://doi.org/10.1007/BF00999622>.
- (78) Crans, D. C. Fifteen Years of Dancing with Vanadium. *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77* (9), 1497–1527. <https://doi.org/10.1351/pac200577091497>.
- (79) CRANS, D. C., P. K. , M. J. A. Vanadium—Speciation Chemistry Can Be Important When Assessing Health Effects on Living Systems. In *Metal Toxicology Handbook* ; BAGCHI, D. B. , M., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2021; p 510.
- (80) CRANS, D. C. et. al. X-Ray Structure of (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (Gly-Gly)<sub>2</sub>V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>. Cntdot. 4H<sub>2</sub>O: Model Studies for Polyoxometalate-Protein Interactions. *Inorg Chem* **1994**, *33*, 5586–5590.
- (81) Farahbakhsh, M.; Schmidt, H.; Rehder, D. A Decavandate Sandwiched by Diprotonated Cryptands-222: Model for the Vanadate-Ionophore Interaction. *Chem Ber* **1997**, *130* (8), 1123–1127. <https://doi.org/10.1002/cber.19971300814>.
- (82) Aureliano, M.; Joaquim, N.; Sousa, A.; Martins, H.; Coucelo, J. M. Oxidative Stress in Toadfish (*Halobatrachus Didactylus*) Cardiac Muscle. *J Inorg Biochem* **2002**, *90* (3–4), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00414-2).
- (83) Boyd, D. W.; Kustin, K.; Niwa, M. Do Vanadate Polyanions Inhibit Phosphotransferase Enzymes? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1985**, *827* (3), 472–475. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90235-3](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90235-3).
- (84) Xu, X.; Bošnjaković-Pavlović, N.; Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Vasić, V. M.; Gillet, J.-M.; Wu, P.; Wei, Y.; Spasojević-de Biré, A. A Combined Crystallographic Analysis and Ab Initio Calculations to Interpret the

- Reactivity of Functionalized Hexavanadates and Their Inhibitor Potency toward Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Inorg Biochem* **2016**, *161*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.04.029>.
- (85) Bošnjaković-Pavlović, N.; Xu, X.; Krstić, D.; Gillet, J.-M.; Wei, Y.; Wu, P.; Čolović, M.; Spasojević-de Biré, A. Experimental and Theoretical Insights of Functionalized Hexavanadates on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity; Molecular Interaction Field, Ab Initio Calculations and in Vitro Assays. *J Inorg Biochem* **2019**, *198*, 110720. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110720>.
- (86) Krstić, D.; Čolović, M.; Bošnjaković-Pavlović, N.; Spasojević-De Bire, A.; Vasić, V. Influence of Decavanadate on Rat Synaptic Plasma Membrane ATPases Activity. *Gen Physiol Biophys* **2009**, *28* (3), 302–306. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2009\\_03\\_302](https://doi.org/10.4149/gpb_2009_03_302).
- (87) Soares, S. S.; Henao, F.; Aureliano, M.; Gutiérrez-Merino, C. Vanadate Induces Necrotic Death in Neonatal Rat Cardiomyocytes Through Mitochondrial Membrane Depolarization. *Chem Res Toxicol* **2008**, *21* (3), 607–618. <https://doi.org/10.1021/tx700204r>.
- (88) Gândara, R. M. C.; Soares, S. S.; Martins, H.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. Vanadate Oligomers: In Vivo Effects in Hepatic Vanadium Accumulation and Stress Markers. *J Inorg Biochem* **2005**, *99* (5), 1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.023>.
- (89) 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. *J Inorg Biochem* **2012**, *108*, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.009>.
- (90) Soares, S. S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. Decavanadate Induces Mitochondrial Membrane Depolarization and Inhibits Oxygen Consumption. *J Inorg Biochem* **2007**, *101* (5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.01.012>.
- (91) 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 Ca<sup>2+</sup>-ATPase Inhibition. *New Journal of Chemistry* **2019**, *43* (45), 17577–17587. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01208G>.
- (92) Peters, K. G.; Davis, M. G.; Howard, B. W.; Pokross, M.; Rastogi, V.; Diven, C.; Greis, K. D.; Eby-Wilkens, E.; Maier, M.; Evdokimov, A.; Soper, S.; Genbauffe, F. Mechanism of Insulin Sensitization by BMOV (Bis Maltolato Oxo Vanadium); Unliganded Vanadium (VO<sub>4</sub>) as the Active Component. *J Inorg Biochem* **2003**, *96* (2–3), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00236-8](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00236-8).
- (93) Bishayee, A.; Waghray, A.; Patel, M. A.; Chatterjee, M. Vanadium in the Detection, Prevention and Treatment of Cancer: The in Vivo Evidence.

- Cancer Lett* **2010**, *294* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.030>.
- (94) A. Barrio, D.; B. Etcheverry, S. Potential Use of Vanadium Compounds in Therapeutics. *Curr Med Chem* **2010**, *17* (31), 3632–3642. <https://doi.org/10.2174/092986710793213805>.
- (95) 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* **2007**, No. 43, 4884. <https://doi.org/10.1039/b705079h>.
- (96) 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. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.001>.
- (97) 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. *J Clust Sci* **2015**, *26* (5), 1821–1831. <https://doi.org/10.1007/s10876-015-0881-y>.
- (98) Tao, Z.; Shi, A.; Lu, C.; Song, T.; Zhang, Z.; Zhao, J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* **2015**, *72* (2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>.
- (99) Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* (1979) **2011**, *331* (6024), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- (100) *Tratamento de câncer de mama no SUS*. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-mama/tratamento>.
- (101) Liu, Y.; Tian, S.; Liu, S.; Wang, E. In Vitro Inhibitory Effect of Polyoxometalates on Human Tumor Cells. *Transition Metal Chemistry* **2005**, *30* (1), 113–117. <https://doi.org/10.1007/s11243-004-3825-1>.
- (102) 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* **2018**, *155*, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.08.052>.
- (103) 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. *J Inorg Biochem* **2015**, *142*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.10.004>.
- (104) Zhai, F.; Wang, X.; Li, D.; Zhang, H.; Li, R.; Song, L. Synthesis and Biological Evaluation of Decavanadate  $\text{Na}_4\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ . *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2009**, *63* (1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.01.006>.

- (105) Anyushin, A. V.; Kondinski, A.; Parac-Vogt, T. N. Hybrid Polyoxometalates as Post-Functionalization Platforms: From Fundamentals to Emerging Applications. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (2), 382–432. <https://doi.org/10.1039/C8CS00854J>.
- (106) Li, J.-K.; Huang, X.-Q.; Yang, S.; Ma, H.-W.; Chi, Y.-N.; Hu, C.-W. Four Alkoxohexavanadate-Based Pd-Polyoxovanadates as Robust Heterogeneous Catalysts for Oxidation of Benzyl-Alkanes. *Inorg Chem* **2015**, *54* (4), 1454–1461. <https://doi.org/10.1021/ic502447b>.
- (107) Hu, X.; Wang, H.; Huang, B.; Li, N.; Hu, K.; Wu, B.; Xiao, Z.; Wei, Y.; Wu, P. A New Scheme for Rational Design and Synthesis of Polyoxovanadate Hybrids with High Antitumor Activities. *J Inorg Biochem* **2019**, *193*, 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.013>.
- (108) Wang, Y.; Wang, F.; Wang, D.; Li, A.; Chen, G.; Xiong, H.; Wei, Y.; Wu, P.; Xiao, Z. Synthesis and Structure Studies of a New Hexavanadate-Glycine Hybrid with High Antitumor Activities. *J Mol Struct* **2020**, *1201*, 127138. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127138>.
- (109) 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* **2017**, *22* (9), 1535. <https://doi.org/10.3390/molecules22091535>.
- (110) Roubatis, L.; Anastasiadis, N. C.; Paratriantafyllopoulou, C.; Moushi, E.; Tasiopoulos, A. J.; Karkabounas, S. Ch.; 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. *Inorg Chem Commun* **2016**, *69*, 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2016.04.019>.
- (111) Aureliano, M. Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities:  $V_{10}$  or  $V_1$ , Both or None? *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/6103457>.
- (112) Saurin W, H. M. D. E. Getting in or out: Early Segregation between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *J Mol Evol*. **1999**, *48*, 22–41.
- (113) Dean M, R. A. A. R. *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily*; 2002.
- (114) Kita, D. H.; Andrade, G. A.; Missina, J. M.; Postal, K.; Boell, V. K.; Santana, F. S.; Zattoni, I. F.; Zanzarini, I. da S.; Moure, V. R.; Rego, F. G. de M.; Picheth, G.; Souza, E. M.; Mitchell, D. A.; Ambudkar, S. V.; Nunes, G. G.; Valdameri, G. Polyoxovanadates as New P-glycoprotein Inhibitors: Insights into the Mechanism of Inhibition. *FEBS Lett* **2022**, *596* (3), 381–399. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14265>.

- (115) Sajid, A.; Rahman, H.; Ambudkar, S. V. Advances in the Structure, Mechanism and Targeting of Chemoresistance-Linked ABC Transporters. *Nat Rev Cancer* **2023**, *23* (11), 762–779. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00612-3>.
- (116) Gonçalves, J. P.; de Oliveira, C. C.; da Silva Trindade, E.; Riegel-Vidotti, I. C.; Vidotti, M.; Simas, F. F. In Vitro Biocompatibility Screening of a Colloidal Gum Arabic-Polyaniline Conducting Nanocomposite. *Int J Biol Macromol* **2021**, *173*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.101>.
- (117) Baptistella, G. B. Desenvolvimento de Uma Nova Abordagem Sintética e Cálculos Teóricos de Oxidocompostos de Vanádio Para Aplicações Medicinais. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024.
- (118) Moore, G. E. Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **1967**, *199* (8), 519. <https://doi.org/10.1001/jama.1967.03120080053007>.
- (119) Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q. V. J. Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary Characterization. *In Vitro* **1978**, *14* (11), 911–915. <https://doi.org/10.1007/BF02616120>.
- (120) Stamps, A. C.; Davies, S. C.; Burman, J.; O'Hare, M. J. Analysis of Proviral Integration in Human Mammary Epithelial Cell Lines Immortalized by Retroviral Infection with a Temperature-Sensitive SV40 T-Antigen Construct. *Int J Cancer* **1994**, *57* (6), 865–874. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910570616>.
- (121) 4T1 cell line. <https://www.atcc.org/products/crl-2539>.
- (122) Vistica VT, S. P. S. D. M. A. P. A. B. MR. Tetrazolium-Based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2515–2520.
- (123) Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys* **1993**, *303* (2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>.
- (124) Slater, T. F.; Sawyer, B.; Sträuli, U. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. *Biochim Biophys Acta* **1963**, *77*, 383–393. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90513-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90513-4).
- (125) Maehara, Y.; Anai, H.; Tamada, R.; Sugimachi, K. The ATP Assay Is More Sensitive than the Succinate Dehydrogenase Inhibition Test for Predicting Cell Viability. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1987**, *23* (3), 273–276. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0277-5379(87)90070-8).

- (126) Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat Protoc* **2007**, 2 (2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- (127) Hu, X.; Xiao, Z.; Huang, B.; Hu, X.; Cheng, M.; Lin, X.; Wu, P.; Wei, Y. Syntheses and Post-Functionalization of Tri-Substituted Polyalkoxohexavanadates Containing Tris(Alkoxo) Ligands. *Dalton Transactions* **2017**, 46 (26), 8505–8513. <https://doi.org/10.1039/C7DT01543G>.
- (128) Malta, M.; Torresi, R. M. Electrochemical and Kinetic Studies of Lithium Intercalation in Composite Nanofibers of Vanadium Oxide/Polyaniline. *Electrochim Acta* **2005**, 50 (25–26), 5009–5014. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.05.035>.
- (129) Zhang, J.; Huang, Y.; Li, G.; Wei, Y. Recent Advances in Alkoxylation Chemistry of Polyoxometalates: From Synthetic Strategies, Structural Overviews to Functional Applications. *Coord Chem Rev* **2019**, 378, 395–414. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.10.025>.
- (130) Khan, M. I.; Chen, Q.; Hope, H.; Parkin, S.; O'Connor, C. J.; Zubieta, J. Hydrothermal Synthesis and Characterization of Hexavanadium Polyoxo Alkoxide Anion Clusters: Crystal Structures of the Vanadium(IV) Species  $\text{Ba}[\text{V}_6\text{O}_7(\text{OH})_3\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_3\}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Na}_2[\text{V}_6\text{O}_7\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_2\text{CH}_3\}_4]$ , of the Mixed-Valence Complex  $(\text{Me}_3\text{NH})[\text{V}^{\text{IV}}_5\text{V}^{\text{V}}\text{O}_7(\text{OH})_3\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_3\}_3]$ , and of the Fluoro Derivative  $\text{Na}[\text{V}_6\text{O}_6\text{F}(\text{OH})_3\{(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_3\}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . *Inorg Chem* **1993**, 32 (13), 2929–2937. <https://doi.org/10.1021/ic00065a022>.
- (131) Müller, A.; Krickemeyer, E.; Penk, M.; Walberg, H.; Bögge, H. Spherical Mixed-Valence  $[\text{V}_{15}\text{O}_{36}]^{5\ominus}$ , an Example from an Unusual Cluster Family. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1987**, 26 (10), 1045–1046. <https://doi.org/10.1002/anie.198710451>.
- (132) Wang, D.; Kung, H. H.; Barteau, M. A. Identification of Vanadium Species Involved in Sequential Redox Operation of VPO Catalysts. *Appl Catal A Gen* **2000**, 201 (2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(00\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(00)00439-7).
- (133) Menezes, W. G.; Reis, D. M.; Oliveira, M. M.; Soares, J. F.; Zarbin, A. J. G. Vanadium Oxide Nanostructures Derived from a Novel Vanadium(IV) Alkoxide Precursor. *Chem Phys Lett* **2007**, 445 (4–6), 293–296. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.08.026>.
- (134) NECHAY, B. R. et al. Role of Vanadium in Biology. *FASEB Journal* **1986**, 45, 123–132.
- (135) 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.; Schmidtman, M. Polyoxovanadates: High-Nuclearity Spin Clusters with Interesting Host–Guest Systems and Different Electron Populations. Synthesis, Spin Organization,

- Magnetochemistry, and Spectroscopic Studies. *Inorg Chem* **1997**, *36* (23), 5239–5250. <https://doi.org/10.1021/ic9703641>.
- (136) Livage, J.; Bouhedja, L.; Bonhomme, C. Chemically Controlled Condensation of Polyoxovanadates. *J Solgel Sci Technol* **1998**, *13* (1/3), 65–70. <https://doi.org/10.1023/A:1008647120784>.
- (137) Moors, M.; Warneke, J.; López, X.; de Graaf, C.; Abel, B.; Monakhov, K. Yu. Insights from Adsorption and Electron Modification Studies of Polyoxometalates on Surfaces for Molecular Memory Applications. *Acc Chem Res* **2021**, *54* (17), 3377–3389. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00311>.
- (138) Linnenberg, O.; Moors, M.; Solé-Daura, A.; López, X.; Bäumer, C.; Kentzinger, E.; Pyckhout-Hintzen, W.; Monakhov, K. Yu. 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* **2017**, *121* (19), 10419–10429. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b02138>.
- (139) BENCINI, A.; GATTESCHI, D. *EPR of Exchange Coupled Systems*. ; Dover Publications, 2012.
- (140) Frost, R. L.; Erickson, K. L.; Weier, M. L.; Carmody, O. Raman and Infrared Spectroscopy of Selected Vanadates. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2005**, *61* (5), 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.06.006>.
- (141) DAY, P. Mixed-Valence Compounds. *Recherche* **1981**, *12*, 304–311.
- (142) Day, P.; Hush, N. S.; Clark, R. J. H. Mixed Valence: Origins and Developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2008**, *366* (1862), 5–14. <https://doi.org/10.1098/rsta.2007.2135>.
- (143) Rocha, R. C.; Toma, H. E. Transferência de Elétrons Em Sistemas Inorgânicos de Valência Mista. *Quim Nova* **2002**, *25* (4), 624–638. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400018>.
- (144) Rehder, D.; Polenova, T.; Bühl, M. Vanadium-51 NMR; 2007; pp 49–114. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(07\)62002-X](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(07)62002-X).
- (145) Samart, N.; Arhouma, Z.; Kumar, S.; Murakami, H. A.; Crick, D. C.; Crans, D. C. Decavanadate Inhibits Mycobacterial Growth More Potently Than Other Oxovanadates. *Front Chem* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00519>.
- (146) Gorzsás, A.; Andersson, I.; Pettersson, L. Speciation in Aqueous Vanadate–Ligand and Peroxovanadate–Ligand Systems. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (4), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.006>.

- (147) Ramos, S.; Manuel, M.; Tiago, T.; Duarte, R.; Martins, J.; Gutiérrez-Merino, C.; Moura, J. J. G.; Aureliano, M. Decavanadate Interactions with Actin: Inhibition of G-Actin Polymerization and Stabilization of Decameric Vanadate. *J Inorg Biochem* **2006**, *100* (11), 1734–1743. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.06.007>.
- (148) Han, J. W.; Hardcastle, K. I.; Hill, C. L. Redox-Active Coordination Polymers from Esterified Hexavanadate Units and Divalent Metal Cations. *Eur J Inorg Chem* **2006**, *2006* (13), 2598–2603. <https://doi.org/10.1002/ejic.200600096>.
- (149) Han, J. W.; Hill, C. L. A Coordination Network That Catalyzes O<sub>2</sub>-Based Oxidations. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (49), 15094–15095. <https://doi.org/10.1021/ja069319v>.
- (150) Li, D.; Song, J.; Yin, P.; Simotwo, S.; Bassler, A. J.; Aung, Y.; Roberts, J. E.; Hardcastle, K. I.; Hill, C. L.; Liu, T. Inorganic–Organic Hybrid Vesicles with Counterion- and PH-Controlled Fluorescent Properties. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (35), 14010–14016. <https://doi.org/10.1021/ja204034g>.
- (151) POSTAL, K. Síntese, estudos de especiação em solução e avaliação da atividade biológica de polioxovanadatos pseudoesféricos. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.
- (152) Liu, H.; Zang, C.; Fenner, M. H.; Possinger, K.; Elstner, E. PPAR $\gamma$  Ligands and ATRA Inhibit the Invasion of Human Breast Cancer Cells in Vitro. *Breast Cancer Res Treat* **2003**, *79* (1), 63–74. <https://doi.org/10.1023/A:1023366117157>.
- (153) Chavez, K. J.; Garimella, S. V.; Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* **2011**, *32* (1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.
- (154) Kioseoglou, E.; Gabriel, C.; Petanidis, S.; Psycharis, V.; Raptopoulou, C. P.; Terzis, A.; Salifoglou, A. Binary Decavanadate-Betaine Composite Materials of Potential Anticarcinogenic Activity. *Z Anorg Allg Chem* **2013**, *639* (8–9), 1407–1416. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300144>.
- (155) KUMAR, V. et. al. *Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas Das Doenças.* , 9th ed.; Rio de Janeiro, 2016.
- (156) *Necroptose.* <https://www.einstein.br/pesquisa/pesquisa-experimental/projetos-pesquisa/mecanismos-e-consequencias-da-morte-celular>.
- (157) Liu, X.; Zhou, M.; Mei, L.; Ruan, J.; Hu, Q.; Peng, J.; Su, H.; Liao, H.; Liu, S.; Liu, W.; Wang, H.; Huang, Q.; Li, F.; Li, C.-Y. Key Roles of Necroptotic Factors in Promoting Tumor Growth. *Oncotarget* **2016**, *7* (16), 22219–22233. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7924>.

- (158) Zheng, W.; Yang, L.; Liu, Y.; Qin, X.; Zhou, Y.; Zhou, Y.; Liu, J. Mo Polyoxometalate Nanoparticles Inhibit Tumor Growth and Vascular Endothelial Growth Factor Induced Angiogenesis. *Sci Technol Adv Mater* **2014**, *15* (3), 035010. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/15/3/035010>.
- (159) Dianat, S.; Bordbar, A. K.; Tangestaninejad, S.; Zarkesh-Esfahani, S. H.; Habibi, P.; Abbasi Kajani, A. CtDNA Interaction of Co-Containing Keggin Polyoxomolybdate and in Vitro Antitumor Activity of Free and Its Nano-Encapsulated Derivatives. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2016**, *13* (10), 1895–1904. <https://doi.org/10.1007/s13738-016-0906-y>.
- (160) Dianat, S.; Bordbar, A.-K.; Tangestaninejad, S.; Yadollahi, B.; Amiri, R.; Zarkesh-Esfahani, S.-H.; Habibi, P. In Vitro Antitumor Activity of Free and Nano-Encapsulated  $\text{Na}_5[\text{PMo}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]\cdot n\text{H}_2\text{O}$  and Its Binding Properties with CtDNA by Using Combined Spectroscopic Methods. *J Inorg Biochem* **2015**, *152*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.015>.
- (161) Dianat, S.; Bordbar, A. K.; Tangestaninejad, S.; Yadollahi, B.; Zarkesh-Esfahani, S. H.; Habibi, P. In Vitro Antitumor Activity of Parent and Nano-Encapsulated Mono Cobalt-Substituted Keggin Polyoxotungstate and Its CtDNA Binding Properties. *Chem Biol Interact* **2014**, *215*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.011>.
- (162) Geisberger, G.; Gyenge, E. B.; Maake, C.; Patzke, G. R. Trimethyl and Carboxymethyl Chitosan Carriers for Bio-Active Polymer–Inorganic Nanocomposites. *Carbohydr Polym* **2013**, *91* (1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.009>.
- (163) Dianat, S.; Bordbar, A. K.; Tangestaninejad, S.; Yadollahi, B.; Zarkesh-Esfahani, S. H.; Habibi, P. CtDNA Binding Affinity and in Vitro Antitumor Activity of Three Keggin Type Polyoxotungstates. *J Photochem Photobiol B* **2013**, *124*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.04.001>.
- (164) Yamase, T. Polyoxometalates for Molecular Devices: Antitumor Activity and Luminescence; 1994; pp 337–358. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0920-8\\_25](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0920-8_25).
- (165) Gumerova, N.; Krivosudský, L.; Fraqueza, G.; Breibeck, J.; Al-Sayed, E.; Tanuhadi, E.; Bijelic, A.; Fuentes, J.; Aureliano, M.; Rompel, A. The P-Type ATPase Inhibiting Potential of Polyoxotungstates. *Metallomics* **2018**, *10* (2), 287–295. <https://doi.org/10.1039/C7MT00279C>.
- (166) Bošnjaković-Pavlović, N.; Bajuk-Bogdanović, D.; Zakrzewska, J.; Yan, Z.; Holclajtner-Antunović, I.; Gillet, J.-M.; Spasojević-de Biré, A. Reactivity of 12-Tungstophosphoric Acid and Its Inhibitor Potency toward  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: A Combined  $^{31}\text{P}$  NMR Study, Ab Initio Calculations and Crystallographic Analysis. *J Inorg Biochem* **2017**, *176*, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.014>.
- (167) Fraqueza, G.; Ohlin, C. A.; Casey, W. H.; Aureliano, M. Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Interactions with Decaniobate, Decavanadate,

Vanadate, Tungstate and Molybdate. *J Inorg Biochem* **2012**, *107* (1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.10.010>.

- (168) Yeruva, L.; Hall, C.; Elegbede, J. A.; Carper, S. W. Perillyl Alcohol and Methyl Jasmonate Sensitize Cancer Cells to Cisplatin. *Anticancer Drugs* **2010**, *21* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32832a68ad>.

## ANEXO 1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES

Tabela A1 – Preparo das soluções em água em diferentes concentrações dos POVs **MeCl@V<sub>15</sub>**, **V<sub>6</sub>L<sup>Et</sup>** e **NaV<sub>10</sub>** para o ensaio de viabilidade celular

Solução <b>A</b> (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <b>B</b> (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <b>C</b> (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração desejada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Volume da solução ( $\mu\text{L}$ )	Volume de RPMI ( $\mu\text{L}$ )	Concentração desejada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Volume da solução ( $\mu\text{L}$ )	Volume de RPMI ( $\mu\text{L}$ )
<b>A</b>	0,100	2,0	98	0,100	8,00	392
<b>A</b>	0,200	4,0	96	0,200	16,0	384
<b>A</b>	0,300	6,0	94	0,300	24,0	376
<b>A</b>	0,400	8,0	92	0,400	32,0	368
<b>A</b>	0,500	10,0	90	0,500	40,0	360
<b>A</b>	0,700	14,0	86,0	0,700	56,0	344
<b>A</b>	1,00	20	80	1,00	80,0	320
<b>B</b>	1,50	3,0	97	1,50	12,0	388
<b>B</b>	2,00	4,0	96	10,0	16,0	384
<b>B</b>	3,00	6,0	94	3,00	24,0	376
<b>B</b>	5,00	10	90	5,00	40,0	360
<b>B</b>	7,00	14	86	7,00	56	344
<b>B</b>	10,0	20	80	10,0	80,0	320
<b>C</b>	50,0	10	90	50,0	40,0	360
<b>C</b>	100	20	80	100	80,0	320
<b>C</b>	200	40	60	200	160	240
<b>C</b>	400	80	20	400	320	80,0

Tabela A2: Preparo das soluções em dms0 em diferentes concentrações do POV **Bu<sup>I</sup>@V<sub>18</sub>** para o ensaio de viabilidade celular

Solução <b>A</b> (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <b>B</b> (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <b>C</b> (10000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração desejada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Volume da solução ( $\mu\text{L}$ )	Volume de RPMI ( $\mu\text{L}$ )	Concentração desejada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Volume da solução ( $\mu\text{L}$ )	Volume de RPMI ( $\mu\text{L}$ )
<b>A</b>	0,500	1,00	99,0	0,500	4,00	396
<b>A</b>	1,00	2,00	98,0	1,00	8,00	392
<b>A</b>	2,00	4,00	96,0	2,00	16,0	384
<b>B</b>	5,00	1,00	99,0	5,00	4,00	396
<b>B</b>	10,0	2,00	98,0	10,0	8,00	392
<b>B</b>	20,0	4,00	96,0	20,0	16,0	384
<b>C</b>	50,0	1,00	99,0	50,0	4,00	396

## ANEXO 2

FIGURA A1 – Espectro de RMN de  $^{51}\text{V}$  registrado em temperatura ambiente para **Bu<sup>t</sup>@V<sub>18</sub>** em acetona-  
 $\text{d}_6$ .

[ ] mmol/L

10

5.0

1.0

0.1

-400 -420 -440 -460 -480 -500 -520 -540 -560 -580 ppm