



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE
MATERIAIS

Ana Gabriela da Silva Bezerra

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E
ANTIMICROBIANA DE LEVANAS MODIFICADAS**

Recife
2018

Ana Gabriela da Silva Bezerra*

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E ANTIMICROBIANA DE LEVANAS MODIFICADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências de Materiais.

Área de concentração: Materiais não metálicos

Orientador: Prof. Dr. André Galembeck

Orientadora Externa ao PGMtr: Prof.^a Dr.^a Mônica Freire Belian

Co-Orientador: Eduardo Padrón

Recife
2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

B574a Bezerra, Ana Gabriela da Silva
Avaliação da atividade antineoplásica e antimicrobiana de levanas modificadas / Ana Gabriela da Silva Bezerra . – 2018.
90 f. : fig., tab.

Orientador: André Galembeck
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018.
Inclui referências e apêndice

1. Levana. 2. Platina. 3. Câncer. I. Galembeck, André . (Orientador). II. Título.

620.11 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-59

ANA GABRIELA DA SILVA BEZERRA
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E ANTIMICROBIANA DE
LEVANAS MODIFICADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências de Materiais

Aprovada em: 12/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. André Galembeck (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. João Rufino de Freitas Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profº. Dr. Hércio José Batista (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profº. Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profª. Drª. Glória Maria Vinhas (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho José Hidelbrando da Silva Júnior meu companheiro de todas as horas. Obrigada por tudo. Você me ajudou muito durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me livrar da depressão e por responder às minhas orações guiando-me nas decisões que me afligiam.

Ao meu marido **Júnior**, a quem amo muito, por me apoiar durante esse período tão estressante.

Ao professor **André Galembeck** pela confiança depositada em mim ao desenvolver esse trabalho.

À professora **Mônica Belian** e ao professor **Wagner Eduardo** pela contribuição imensurável neste trabalho, pelos conselhos amigos, pelo carinho e preocupação destinados a mim durante estes anos de convivência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências de Materiais: **André Galembeck, Eduardo Falcão, Eduardo Padrón, Yadira Cantú, Fernando Rodriguez-Macia, Rosa Maria Souto Maior, Petrus Santa Cruz, e Patricia Farias**; por contribuírem ativamente em minha formação acadêmica.

Ao professor **Eduardo Falcão** a quem tive a oportunidade de conhecer em um estágio a docência e me ensinou muito sobre simplicidade, humanidade e profissionalismo.

A minha amiga **Alinne Girlaine** que apesar de distante nunca foi ausente e sempre uma grande irmã.

A minha amiga **Nayara Cely** por todas as tribulações passadas juntas e o apoio em que recebi em todas elas.

A minha amiga **Moara Targino**, nossa amizade foi essencial pra dar continuidade aos nossos trabalhos.

Aos amigos do **LAQIS** pela amizade nestes anos de convivência.

À **Eliete, Patrícia e Paulo** pela ajuda nas caracterizações.

Ao **CENAPESQ-UFRPE** e a **Central analítica da UFPE** pelo apoio instrumental.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

A **CNPq** e a **FACEPE** pelo apoio ao projeto.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública, ao longo do Mundo, causando mais de um quarto de todas as mortes em muitos países. O número de pessoas diagnosticadas com câncer é aumentado constantemente havendo uma estimativa de 15 milhões de novos casos até 2020, segundo a Organização Mundial de Saúde. À medida que o número de casos de câncer aumenta é importante que surjam novos medicamentos utilizados na quimioterapia. Diversos compostos naturais e/ou sintéticos vêm apresentando bons resultados em estudos sobre antitumorais, como por exemplo, podem ser citados os polissacarídeos. A levana, por exemplo, é um polímero de frutose produzido por diversos organismos incluindo *Zymomonas mobilis*, e possui propriedades espessante, emulsificante e estabilizante, apresentando, também, atividades biológicas como imunoestimulação, atividade antitumoral *in vivo* contra tumores do tipo sarcoma 180 e carcinoma de Erhlich, e *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas pertencentes ao fígado e ao sistema gástrico humano sem apresentar toxicidade. Neste trabalho é reportada a produção e modificação química da matriz da levana por aminas e íons platina. Foi avaliado as possíveis atividades antineoplásica e antimicrobiana da matriz modificada. O interesse da investigação da atividade antimicrobiana surgiu após verificar relatos na literatura sobre a possível atividade antimicrobiana por aminoglicosídeos. A matriz da levana foi produzida através do cultivo do microrganismo *Zymomonas mobilis*, utilizando meio de cultura de fermentação a base de sacarose. A matriz da levana foi fracionada, congelada e liofilizada obtendo um sólido branco esponjoso. Foram realizadas modificações químicas na matriz, a primeira modificação realizada foi uma oxidação nas hidroxilas vicinais a 10% e 25% utilizando periodato de potássio, os produtos foram codificados por Levoxi. Em seguida foram feitas modificações na matriz oxidada com as moléculas: etilediamina, glicina e 3-amino-1,2-propanediol que contém grupos aminos, sintetizando assim, aminoglicosídeos, que foram codificados por Levoxietileno, Levoxiglicina e Levoxiamino. E por fim reagiram-se as levanas aminas com íons platina contidos em complexos percursoros (hexacloroplatinato e tetracloroplatinato de potássio) que foram recuperados a partir de rejeitos, os novos produtos foram

codificados por LexoxietilenoPt, LevoxiglicinaPt e LevoxiaminoPt. A matriz de levana pura e as levana aminadas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética de ^1H e ^{13}C . Os complexos de platina precursores (hexacloroplatinato e o tetracloroplatinato de potássio) foram caracterizados por difratometria de raios-X. Os compostos de coordenação formados pela incorporação de íons platina às matrizes aminadas foram caracterizados por Infravermelho e RMN ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt . Após caracterização os compostos foram submetidos a ensaios biológicos para avaliação de citotoxicidade em células tumorais e avaliação antimicrobiana (determinação da concentração mínima inibitória - CMI). A maior porcentagem de inibição de crescimento celular apresentado no teste de citotoxicidade em células tumorais foi o LevoxietilenoPt (55,3%), frente às células de leucemia promielocítica aguda. Com relação aos testes de avaliação antimicrobiana os melhores resultados foram oriundos do Levoxi, Levoxiamino e Levoxiglicina que inibiram eficientemente a *Candida Krusei* ambos com a concentração de $78,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Câncer. Levana. Levanas aminadas. Platina.

ABSTRACT

Cancer is a public health problem throughout the world, causing more than a quarter of all deaths in many countries. The number of people diagnosed with cancer is steadily increasing with an estimated 15 million new cases by 2020, according to the World Health Organization. As the number of cancer cases increases, it is important for new drugs to emerge from chemotherapy. Several natural and / or synthetic compounds have shown good results in antitumor studies, for example, polysaccharides can be cited. Levana, for example, is a fructose polymer produced by various organisms including *Zymomonas mobilis*, and has thickening, emulsifying and stabilizing properties, also exhibiting biological activities such as immunostimulation, in vivo antitumor activity against sarcoma 180 tumors and carcinoma of Erlich, and in vitro against human tumor cell lines belonging to the liver and to the human gastric system without toxicity. In this work the production and chemical modification of the levane matrix by amines and platinum ions are reported. The possible antineoplastic and antimicrobial activities of the modified matrix were evaluated. The interest of the investigation of the antimicrobial activity arose after verifying reports in the literature on the possible antimicrobial activity by aminoglycosides. The levane matrix was produced by culturing the *Zymomonas mobilis* microorganism, using sucrose-based fermentation culture medium. The levane matrix was fractionated, frozen and lyophilized to give a fluffy white solid. Chemical modifications were made in the matrix, the first modification was an oxidation in the 10% and 25% vicinal hydroxyls using potassium periodate, the products were coded by Levoxi. Then modifications were made to the oxidized matrix with the molecules: ethylene diamine, glycine and 3-amino-1,2-propanediol containing amine groups, thus synthesizing aminoglycosides which were encoded by Levoxyethylene, Levoxyglycine and Levoxyamino. Finally, the platinum amine amines were contained in percussive complexes (hexachloroplatinate and potassium tetrachloroplatinate) that were recovered from tailings, the new products were encoded by LexoxyethylenePt, LevoxyglycinePt and LevoxyaminoPt. The pure levane matrix and the amine levane were characterized by infrared spectroscopy and ¹H and ¹³C magnetic resonance spectroscopy. The precursor platinum complexes (hexachloroplatinate and potassium tetrachloroplatinate) were characterized by

X-ray diffraction. The coordination compounds formed by the incorporation of platinum ions into the amine matrices were characterized by Infrared and ^1H NMR, ^{13}C and ^{195}Pt . After characterization the compounds were submitted to biological assays for evaluation of cytotoxicity in tumor cells and antimicrobial evaluation (determination of minimum inhibitory concentration - MIC). The highest percentage of inhibition of cell growth presented in the cytotoxicity test in tumor cells was LevoxyethylenePt (55.3%) against acute promyelocytic leukemia cells. Regarding the antimicrobial evaluation, the best results were obtained from Levoxi, Levoxyamino and Levoxyglycine, which efficiently inhibited *Candida Krusei* both with a concentration of $78.1\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

Key words: Cancer. Levana. Levana aminate. Platinum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do processo de carcinogênese.....	23
Figura 2 -	Estrutura química da Levana.....	26
Figura 3 -	Fórmula estrutural da Cisplatina.....	28
Figura 4 -	Meio de cultura contendo a bactéria <i>Escherichia coli</i> antes (a) e depois (b) da aplicação do campo elétrico.....	29
Figura 5 -	Cisplatina produzida no Brasil - Platinil®.....	29
Figura 6 -	Etapas das reações de substituição nucleofílica na cisplatina após sua difusão celular, com a saída de cloretos e entrada de uma e duas moléculas de água.....	30
Figura 7 -	Sítios mais susceptíveis a formação da ligação coordenativa com a platina.....	31
Figura 8 -	Principais complexos cisplatina-DNA formados. (A) Ligação monofuncional, (B) ligação bifuncional Intrafita, (C) ligação bifuncional Interfita e (C) Ligação bifuncional Intermolecular.....	32
Figura 9 -	Estruturas de compostos de platina (II) disponíveis no mercado como fármacos antitumorais: carboplatina, nedaplatina e oxaliplatina.....	33
Figura 10 -	Transplatina e alguns de seus análogos sintetizados.....	35
Figura 11 -	Estruturas de complexos híbridos de platina (II) em que os ligantes possuem propriedades antitumorais reconhecidas, (a) tamoxifeno e (b) acridina.....	35
Figura 12 -	Complexo trinuclear de platina BBR3464.....	37
Figura 13 -	Esquema da metodologia empregada para recuperar resíduos de platina.....	39
Figura 14 -	Esquema da metodologia empregada para recuperar resíduos de platina.....	39
Figura 15 -	Reação de oxidação da levana.....	46
Figura 16 -	Reação de Modificação da Levana Oxidada I.....	47
Figura 17 -	Reação Modificação da Levana Oxidada II.....	48
Figura 18 -	Reação Modificação da Levana Oxidada III.....	48
Figura 19 -	(a) Cristais de hexacloroplatinato de potássio e (b) cristais	

	de tetracloroplatinato de potássio.....	53
Figura 20 -	Difratograma de raios-X do hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) - dados experimental e do banco de dados sobrepostos.....	54
Figura 21 -	Difratogramas de Raios-X do tetracloroplatinato de potássio (K_2PtCl_4) - dado experimental e do banco de dados sobrepostos.....	54
Figura 22 -	Meio de pré-fermentação: antes da inoculação (A) e após 24 horas de inoculação (B).....	55
Figura 23 -	(A) Levana fracionada (F50) e (B) liofilizada.....	56
Figura 24 -	Espectro de infravermelho da levana F50.....	58
Figura 25 -	Espectro de RMN 1H (300 MHz) em D_2O , da levana F50...	59
Figura 26 -	Espectro de RMN bidimensional (COSY) para a levana F50, em D_2O com a correlação ($^1H - ^1H$) em linhas vermelhas.....	60
Figura 27 -	Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) em D_2O , da levana F50...	61
Figura 28 -	Espectros de infravermelho da levana F50 e da levana oxidada (LEVOXI) em sobreposição.....	62
Figura 29 -	Gráfico da concentração de glutaraldeído com sua absorbância, monitorada em 480 nm.....	63
Figura 30 -	Gráfico de correlação indicando o valor correspondente a uma absorbância de 0,099825.....	64
Figura 31 -	Gráfico de correlação indicando o valor correspondente a uma absorbância de 0,063375.....	65
Figura 32 -	Espectro de Infravermelho do Levoxiamino, Levoxietileno e Levoxiglicina com estruturas químicas.....	67
Figura 33 -	Espectro de RMN 1H (400 MHz) em D_2O , da levana modificada: Levoxi, Levoxietileno, Levoxiamino e Levoxiglicina.....	69
Figura 34 -	Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz) em D_2O , da levana modificada Levoxiamino e Levoxietileno.....	70
Figura 35 -	Espectro de RMN ^{195}Pt em D_2O , da levana modificada LevoxiaminoPt, LevoxietilenoPt e LevoxiglicinaPt.....	72

Figura 36 - Janela espectral aproximada para os deslocamentos químicos de ^{195}Pt , em diferentes estados de oxidação.....	73
Figura 37 - Espectro de absorção eletrônica da matriz da levana, do hexacloroplatinato e do complexo LEVOXIETILENOPt.....	74
Figura 38 - Gráfico da concentração de soluções padrão de platina (0, 10, 50, 75 e 100 ppm) com sua absorbância, monitorada em 265, 9 nm.....	75
Figura 39 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxietilenoPt e do ligante Levoxietileno.....	76
Figura 40 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxiaminoPt e do ligante Levoxiamino.....	77
Figura 41 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxiglicinaPt e do ligante Levoxiglicina.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do Meio Agar Nutritivo.....	41
Tabela 2 -	Composição do Meio de Cultura SDL.....	42
Tabela 3 -	Composição do Meio de Pré-fermentação.....	43
Tabela 4 -	Composição do Meio de Fermentação.....	43
Tabela 5 -	Massa molecular viscosimétrica média, para a levana, obtida em cada uma das etapas de fracionamento etanólico.....	56
Tabela 6 -	Frações de levana obtidas a partir dos percentuais de etanol.....	57
Tabela 7 -	Concentrações das soluções de glutaraldeído e seus respectivos máximos de absorção (ABS) em 480 nm.....	63
Tabela 8 -	Valores de concentração dos padrões usados e das absorbâncias obtidas na medida de espectroscopia de absorção atômica.....	75
Tabela 9 -	Porcentagem de inibição de crescimento celular das amostras avaliadas.....	79
Tabela 10 -	Concentração mínima inibitória da levana e das levanas modificadas.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AN -	Ágar Nutritivo
Ag11 e ZAP -	Códigos de linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .
BBR3464® -	Código de complexo trinuclear de platina (complexo consolidado)
CMI -	Concentração mínima inibitória
COSY -	Correlation Spectroscopy
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
DNH -	2,4-dinitrofenilhidrazina
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DRX -	Difratometria de Raio-X
F10, F20, F30, F40 e F50 -	Frações de levana precipitada de acordo com a concentração de etanol.
HCT-116 -	Células de Carcinoma colorretal
Hep-2 -	Células de Carcinoma de laringe humana
HL-60 -	Células de Leucemia promielocítica aguda
JCPDS -	Joint Committee on Powder Diffraction Data
LAQIS -	Laboratório de Análises Química Inorgânica e Sensores
Levoxi -	Código do produto da reação de oxidação da matriz polimérica da levana
Levoxiamino -	Código do produto da reação da levana oxidada com 3-amino-1,2-propanediol
Levoxietileno -	Código do produto da reação da levana oxidada com etilenodiamina
Levoxiclicina -	Código do produto da reação da levana oxidada com glicina
LevoxiaminoPt -	Código do produto da levana aminada (levoxiamino) com íons platina
LevoxietilenoPt -	Código do produto da levana aminada (levoxietileno) com íons platina
LevoxiclicinaPt -	Código do produto da levana aminada (levoxiclicina) com íons platina
MCF-7 -	Células de Cancer de mama humano

Molt-4 -	Células de Leucemia linfoblástica aguda
MTT -	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCI-H292 -	Células de Carcinoma muco epidermóide de pulmão humano
nDNA -	Ácido desoxirribonucléico nuclear
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI -	Meio de cultura criado por Roswell Park Memorial Institute para cultivar células humanas
SDL -	Meio de Cultura Sabouraud Líquido
UFPEDA -	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
ZAG-12 -	Cultura obtida artificialmente pela fusão de esferoblastos oriundos de outras linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo geral.....	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1	CÂNCER.....	22
2.2	POLISSACARÍDEOS.....	24
2.2.1	Levana.....	25
2.3	COMPLEXOS DE PLATINA.....	28
2.3.1	Mecanismo de Ação da Cisplatina.....	30
2.3.2	Complexos de Platina “Não-tradicionais”	34
3	METODOLOGIA.....	38
3.1	REAGENTES E SOLVENTES.....	38
3.2	SÍNTESES DOS COMPLEXOS DE PLATINA PRECURSORES.	38
3.2.1	Síntese do Hexacloroplatinato de Potássio Através da Recuperação do Resíduo de Platina.....	38
3.2.2	Síntese do Tetracloroplatinato de Potássio.....	39
3.3	PRODUÇÃO DE LEVANA.....	40
3.3.1	Micro-organismos.....	40
3.3.2	Preparo dos Meios de Cultura.....	40
3.3.2.1	Agar Nutritivo.....	40
3.3.2.2	Meio de Cultura Sabouraud Líquido (SDL).....	41
3.3.2.3	Meios de Pré-Fermentação.....	42
3.3.2.4	Meios de Fermentação.....	43
3.3.3	Centrifugação e Filtração do Meio de Fermentação.....	43
3.3.4	Fracionamento de Levana Produzida por Precipitação.....	44
3.4	OXIDAÇÃO DA LEVANA.....	45
3.4.1	Avaliação Quantitativa de Carbonila na levana Oxidada.....	46
3.5	MODIFICAÇÕES NA MATRIZ DA LEVANA OXIDADA.....	47
3.5.1	Modificação da Levana Oxidada I (Utilizando etilenodiamina).....	47
3.5.2	Modificação da Levana Oxidada II (Utilizando	

	glicina).....	47
3.5.3	Modificação da Levana Oxidada III (Utilizando 3-amino-1,2-propanediol).....	48
3.6	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE AMINA.....	49
3.7	INCORPORAÇÃO DOS ÍONS Pt^{2+} A MATRIZ DO LEVANA MODIFICADA.....	49
3.7.1	Incorporação dos Íons Pt^{2+} a Matriz do LEVOXIETILENO.....	49
3.8	CARACTERIZAÇÃO.....	49
3.8.1	Difratometria de Raios-X.....	49
3.8.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	49
3.8.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de 1H e de ^{13}C.....	50
3.8.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{195}Pt.....	50
3.8.5	Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV/Visível.....	50
3.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	51
3.9.1	Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais.....	51
3.9.2	Avaliação de Atividade Antimicrobiana.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	NA SÍNTESE DOS COMPLEXOS: HEXACLOROPLATINATO E TETRACLOROPLATINATO DE POTÁSSIO.....	53
4.1.1	Aspecto físico.....	53
4.1.2	Difratometria de Raios-X (DRX).....	53
4.2	NA PRODUÇÃO DE LEVANA.....	54
4.2.1	Eficiência das etapas na produção e aspecto físico.....	54
4.2.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	57
4.2.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	58
4.3	NA OXIDAÇÃO DA LEVANA.....	61
4.3.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho da LEVOXI.....	61
4.3.2	Avaliação Quantitativa de Carbonila.....	63
4.4	NAS MODIFICAÇÕES NA MATRIZ DA LEVANA OXIDADA COM AMINAS.....	65

4.4.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho: Levoxielileno, Levoxielilicina e Levoxielilamino.....	66
4.4.2	Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H dos compostos: Levoxielileno, Levoxielilicina e Levoxielilamino.....	67
4.4.3	Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C dos compostos: Levoxielileno, Levoxielilicina e Levoxielilamino.....	70
4.5	NA INCORPORAÇÃO DOS ÍONS PT ²⁺ A MATRIZ DO LEVANA MODIFICADA.....	71
4.5.1	Ressonância Magnética Nuclear de ¹⁹⁵ Pt dos compostos: LevoxielilenoPt, LevoxielilicinaPt e LevoxielilaminoPt.....	71
4.5.2	Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis do LevoxielilenoPt.....	73
4.5.3	Espectroscopia de Absorção Atômica do LevoxielilenoPt	74
4.5.4	Espectroscopia na região do infravermelho do LevoxielilenoPt, LevoxielilaminoPt e LevoxielilicinaPt.....	76
4.6	NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	78
4.6.1	Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais.....	78
4.6.2	Avaliação de Atividade Antimicrobiana.....	79
5	CONCLUSÕES.....	81
6	PESPECTIVAS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	APENDICE A - PATENTE DEPOSITADA.....	89

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de óbito por doença na população adulta, por ser uma doença potencialmente fatal, que surge devido a mutações gênicas espontâneas ou induzida por agentes cancerígenos, tais como radiação, agentes químicos e biológicos, inflamações crônicas, xenobióticos (tabaco, álcool, pesticidas) e estresse oxidativo que alteram o comportamento normal da célula, desencadeando divisão celular desordenada e acelerada, resultando em tecidos cuja funcionalidade normal foi perdida. Esse crescimento desordenado de células pode invadir tecidos e órgãos podendo se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2016).

O diagnóstico e tratamento dos diferentes tipos de câncer sofreram expressivos avanços nos últimos anos. Quando é possível o diagnóstico precoce, aliado aos atuais métodos terapêuticos (cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia), também se torna possível obter índices de sobrevivência progressivamente maiores em casos considerados incuráveis. Assim, é importante ressaltar o surgimento constante de medicamentos mais eficazes e o emprego de drogas combinadas no tratamento de quimioterapia antineoplásica ou antitumoral, método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento do câncer (KELLAND, 2007).

Diversos compostos naturais e/ou sintéticos vêm sendo apontados como promissores, em estudos recentes, sobre atividades antitumorais, como por exemplo, podem ser citados os polissacarídeos (GLINSKY et al., 1996), e os novos compostos de coordenação de platina (KELLAND, 2007), ambos os objetos de estudo deste trabalho. Polissacarídeos são candidatos promissores para o controle de doenças, por estarem presentes na superfície celular e interferirem no fenômeno de reconhecimento celular normal. Esses açúcares têm sido reportados por bloquear a progressão tumoral e interferirem na angiogênese, interação célula-célula, célula-matriz, invasão tumoral e metástase (GLINSKY et al., 1996; SLOVIN et al., 1999). A levana, por exemplo, é um polímero de D-frutose produzido por diversos organismos incluindo *Zymomonas mobilis* (ALLEN; BOWEN, 1990). Esse polissacarídeo, além de possuir propriedades espessante, emulsificante e estabilizante (HAN, 1990), apresenta, também, atividades biológicas como imunoestimulação, atividade

antitumoral *in vivo* contra tumores de camundongos, tais como sarcoma 180 (S-180) e carcinoma de Erhlich, e *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas (HepG2 e SNU-1, células pertencentes ao fígado e ao sistema gástrico humano, respectivamente) sem possuir a citotoxicidade apresentada pelos agentes antineoplásicos tradicionais utilizados (CALAZANS et al., 1997).

Já os complexos de platina, inseridos nesse estudo, por exemplo a cisplatina, possui propriedades antitumorais, e é o fármaco mais utilizado na quimioterapia antineoplásica. A descoberta casual de sua atividade antitumoral desencadeou o interesse em estudos de análogos estruturais, a fim de verificar suas atividades citotóxicas (KELLAND, 2007). Os primeiros fármacos, após a cisplatina, desenvolvidos foram os análogos denominados complexos de segunda e terceira gerações, tais como a carboplatina, oxaliplatina e a nedaplatina (PASSETO et al., 2006). Porém, devido aos efeitos colaterais e resistência adquirida, atualmente outras classes de compostos são estudados, entre eles, alguns complexos com geometria trans (MUSSETI et al, 2011), polinucleares de platina (II) (FARRELL, 2004) e complexos híbridos (WANG; GUO, 2008).

Diante da importância do surgimento de novos quimioterápicos, este trabalho tem como objetivo a síntese de novos compostos, formados a partir da modificação de um polissacarídeo, conhecido como levana, com grupamentos amina, modificação ainda não citada na literatura, a fim de coordenar íons Pt^{2+} ; almejando uma promissora atividade antitumoral.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar novos compostos a partir da modificação química da matriz polimérica da levana utilizando grupamentos aminos e íons platina II.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir levana;
- Modificar a levana com grupos amina;
- Incorporar íons platina na levana aminada;
- Realizar ensaios *in vitro* com os compostos modificados em células tumorais humanas: HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão humano), MCF-7(câncer de mama humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT- 116 (carcinoma colorretal) e Molt-4 (leucemia aguda linfoblástica).
- Realizar ensaios de atividade antimicrobiana (Concentração mínima inibitória – CMI em bactérias [*Staphylococcus aureus* (02), *Bacillus subtilis* (86), *Enterococcus faecalis* (138), *Escherichia coli* (224) e *Pseudomonas aeruginosa* (416)) e fungos (*Candida albicans* (1007), *Candida utilis* (1009), *Candida krusei* (1002)].

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

De acordo com as previsões do Instituto Nacional do Câncer, em novembro de 2015, a estimativa da incidência da doença no biênio 2016-2017 foi de 596 mil novos casos de câncer, sendo esperados 295.200 casos para os homens e 300.800 casos entre as mulheres (INCA, 2016).

Essas estimativas são as principais ferramentas de planejamento e da gestão pública no país na oncologia, orientando ações de prevenção, detecção precoce e oferta de tratamento, além de mostrar por números que o câncer se tornou um problema de saúde pública (INCA, 2016).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2016).

Trata-se de uma doença potencialmente fatal que pode se desenvolver de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos – químicos, físicos e biológicos - que alteram o comportamento normal da célula, desencadeando uma divisão celular desordenada e acelerada, resultando em tecidos cuja funcionalidade normal foi perdida (VOGELSTEIN; KINZLER, 1998).

A multiplicação desordenada das células ocasiona o que se chama de tumor, uma acumulação de massa de tecido celular. Os tumores podem ser benignos ou malignos, porém o diagnóstico de câncer só é dado ao paciente quando este é de natureza maligna (INCA, 2016).

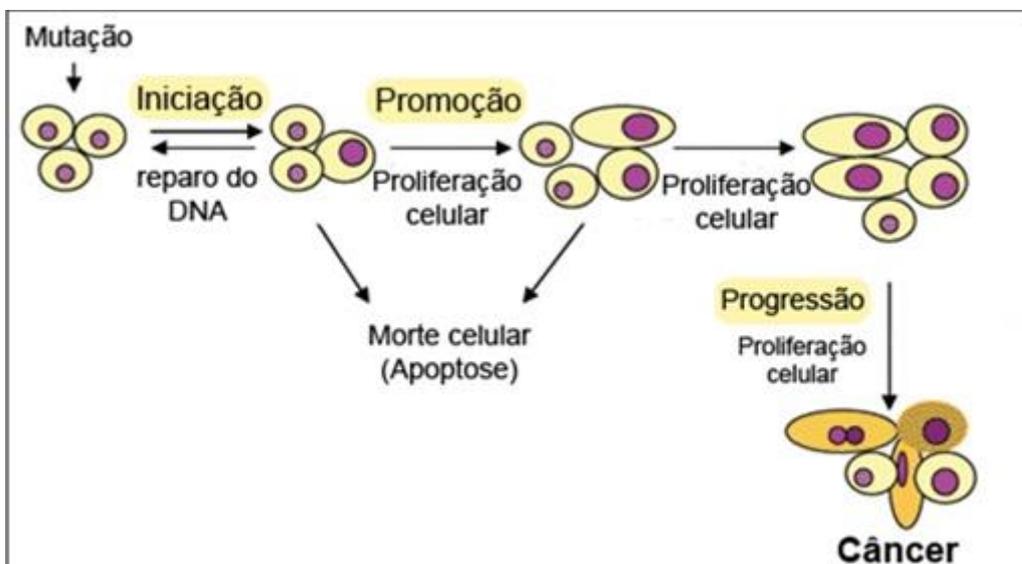
Os tumores benignos permanecem localizados no órgão onde se originou, podendo prejudicar aquele local onde se encontra, devido ao seu aumento de massa. Já os tumores malignos, são invasivos, se desprendem do tumor primário e invadem tecidos e órgãos através do processo chamado metástase (INCA, 2016).

O mecanismo do desenvolvimento dos tumores, processo de carcinogênese, pode ser explicado por três estágios: iniciação, promoção e progressão (Figura 1). No estágio de iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos que provocam modificações em alguns genes, porém

não é possível detectar nenhum tumor, assim as células se encontram 'preparadas' (iniciadas) para contribuir para a produção de células que serão futuros tumores (FARRELL, 2004).

No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos, classificados como promotores (componentes da alimentação, hormônios, etc.) transformando a célula de forma lenta e gradual. O último estágio, progressão, se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, tornando os tumores benignos em malignos (FARRELL, 2004).

Figura 1 - Esquema do processo de carcinogênese.



Fonte: Retirado e adaptado de <http://patoneoplasia.blogspot.com.br>.

O tratamento do câncer pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia   a opção escolhida quando o tumor está em estágio inicial e em condi es favoráveis para a sua retirada (INCA, 2016).

A radioterapia   o tratamento mais utilizado para tumores que não podem ser totalmente retirados por cirurgia ou tumores que retornam ao mesmo local após cirurgia, neste tratamento, se emprega a irradia o ionizante, que age bloqueando a divisão celular por lesão no DNA ou por destrui o direta das células, esta a o ocorre especialmente nas células que estão se dividindo em uma velocidade anormal, a radia o atua de forma indistinta sobre células

normais e anormais, no entanto, as células normais se recuperam com facilidade enquanto as modificadas têm baixa capacidade de se recuperar (INCA, 2016).

A quimioterapia tem como objetivo combater o câncer com o uso de drogas que atuam provocando a destruição das células tumorais, preservando, assim, as células normais. No entanto, assim como acontece na radioterapia, a maioria dos agentes quimioterápicos lesam tanto as células cancerosas, quanto as saudáveis, já que em sua maioria os fármacos existentes atuam de forma não específica (INCA, 2016).

A falta de especificidade afeta as células normais de crescimento rápido (capilares, gastrointestinais e do sistema imunológico), resultando em efeitos colaterais, como náuseas, perda de cabelo e maior suscetibilidade a infecções (INCA, 2016).

2.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são carboidratos de alto peso molecular, formados por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que se formam com eliminação de água (LEHNIGER, 1993). Monossacarídeos é o nome dado aos monômeros, menor unidade estrutural, dos carboidratos (INCA, 2016).

A unidade monossacarídica predominante, na maioria dos polímeros, é a D-glicose, porém são comuns os polissacarídeos de D-frutose, D-manose, D e L-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-fucose e L-ramnose (INCA, 2016).

Os polissacarídeos podem ser diferenciados pela natureza de suas unidades monossacarídicas, pelo comprimento de suas cadeias e pelo grau de ramificação (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

Sua classificação quanto aos monossacarídeos presentes na estrutura é dada por: homopolissacarídeos, quando formados por um único tipo de unidade monomérica e em heteropolissacarídeos, quando contém mais de um tipo de unidade monomérica. Dextrana, glicogênio, amido, pululana e levana são exemplos de homopolissacarídeos, enquanto xantana, fucana, alginatos, heparina, ácido hialurônico são heteropolissacarídeos típicos (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

As investigações da aplicação comercial de polissacarídeos são promissoras devido a por ser de fontes renováveis, possuem grande diversidade de propriedades e versatilidade. Os polímeros são largamente utilizados em diversos campos da indústria, e são produtos de alto valor comercial (CALAZANS, 1997).

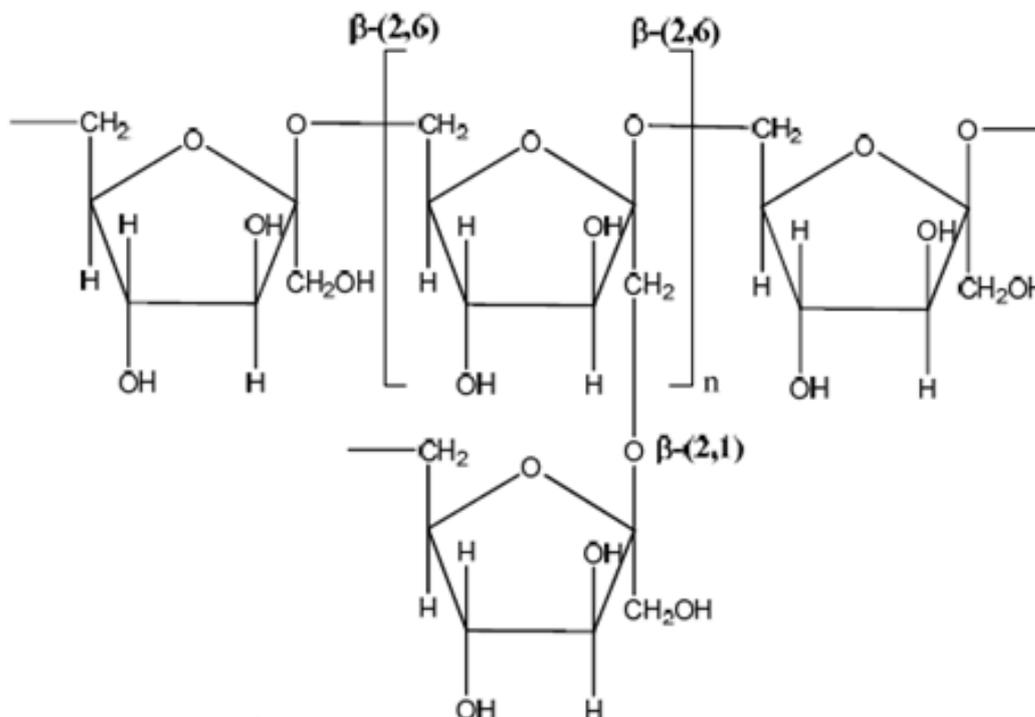
A indústria, em sua maioria, usa grandes quantidades de polissacarídeos de origem vegetal, mas nos últimos anos houve um direcionamento da produção de polissacarídeos por fermentação microbiana, devido às vantagens do suprimento de material de qualidade constante e não sujeito a variações sazonais, como ocorre com polissacarídeos obtidos de plantas e algas, vantagens essas que compensam quando se possui um elevado valor da produção principalmente quando o alvo final é a indústria de alimentos ou farmacêutica (CALAZANS, 1997).

Mas, também, existem muitos micro-organismos que produzem polissacarídeos em quantidades satisfatórias, tornando o processo do cultivo de microrganismos e da recuperação do polímero produzido econômico. Comercialmente, o mais importante exopolissacarídeo microbiano é a goma xantana, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*, que vem sendo usada há décadas em indústrias alimentícias e não-alimentícias (SUTHERLAND, 1998).

2.2.1 Levana

A levana é uma homopolissacarídeo que pode ser produzida naturalmente por plantas e micro-organismos (SRIKANTH, 2015). É composto por resíduos D-frutofuranosil unidos entre si por ligações β -(2, 6) na cadeia principal e por ligações β -(2, 1) nos pontos de ramificações (Figura 2). A enzima levanasucrase é responsável pela formação de levana por microrganismo usando sacarose como substrato. Esta enzima cliva moléculas de sacarose e liga os resíduos de frutose gerados na clivagem para construir a cadeia polimérica da levana (ONER, 2016).

Figura 2 - Estrutura química da Levana.



A levana é um subproduto da fermentação para produção de etanol e em consequência disso, vem crescendo o incentivo à pesquisas, para a identificação de novos microrganismos produtores e para processos que visem a otimização de produção em escala industrial, pois se ganhará com a produção da matéria-prima (etanol) e com a do subproduto, já que a levana possui diversas aplicações (REISS; HARTMEIER, 1990; KEITH et al, 1991; TANO; BUZATO, 2003).

Existem vários usos práticos da levana para diferentes propósitos como, por exemplo, para complexo biologicamente ativo, substituto do plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, preparação de frutose altamente purificada para uso médico (MAYS; DALLY, 1988), agente hipocolesterolêmico (reduz o colesterol) (YAMAMOTO, 1999) e como imunomodulador e anticarcinogênico (CALAZANS et al., 1997).

A levana pode ser produzida por diferentes tipos de bactérias, como as *Acetobacter suboxydans*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbícola*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

polymyxa, *Pseudomonas syringae* e *Zymomonas mobilis* (BOBBIO; BOBBIO, 1989), sendo esta última utilizada neste trabalho.

O interesse por *Zymomonas mobilis* tem sido crescente, pois é uma alternativa promissora não só para a produção de etanol como também para a produção de levana (SWINGS; DELEY, 1977).

A produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* é favorecida em um meio de cultura contendo sacarose, pois quando a fermentação acontece em alta concentração de sacarose a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo dos seus monossacarídeos. Acumulando-se no caldo de fermentação e favorecendo a formação de subprodutos, como a levana e o sorbitol, reduzindo, assim, o rendimento do etanol produzido no sistema (KANNAN, 1993).

São poucas as informações sobre as condições de cultivo e dos processos fermentativos que privilegiam a produção de levana. Além disso, os dados disponíveis a respeito do assunto demonstram divergências entre autores com respeito à temperatura e o pH ideal para a produção de levana por *Zymomonas mobilis*. As condições ideais para o crescimento e a produção do polissacarídeo, em meio de cultura, também são afetadas pela proporção entre o volume de ar e o volume de meio, presença ou ausência de agitação, quantidade do inóculo, além dos nutrientes usados (LEHNIGER, 1993).

Neste trabalho, a levana será a matriz polimérica estudada que sofrerá algumas modificações químicas, incluindo a coordenação dos íons platina II. Sua escolha se deve à estrutura polimérica que nos proporciona incorporação de vários centros ácidos em sua estrutura após modificação da matriz de acordo com a afinidade química da platina.

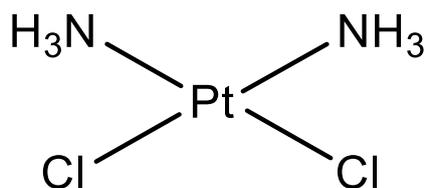
Outro motivo de sua escolha é a alta atração/afinidade dos tumores por carboidratos, trazendo, assim, a expectativa que o composto sintetizado futuramente será direcionado mais eficientemente ao alvo desejado na quimioterapia.

2.3 COMPLEXOS DE PLATINA

Os complexos de platina apresentam propriedades relevantes com relação a suas atividades terapêuticas, especificamente no tratamento de câncer. Um dos fármacos mais consolidados no tratamento de câncer é a *cis*-diaminodichloroplatina(II), comumente chamado de “cisplatina” ou cddp (Figura 3).²⁹

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina desencadeou testes biológicos, para verificar a atividade citotóxica, em milhares de análogos e uma investigação completa em outros elementos pertencentes ao mesmo grupo da platina na tabela periódica (KELLAND, 2007).

Figura 3 - Fórmula estrutural da Cisplatina.



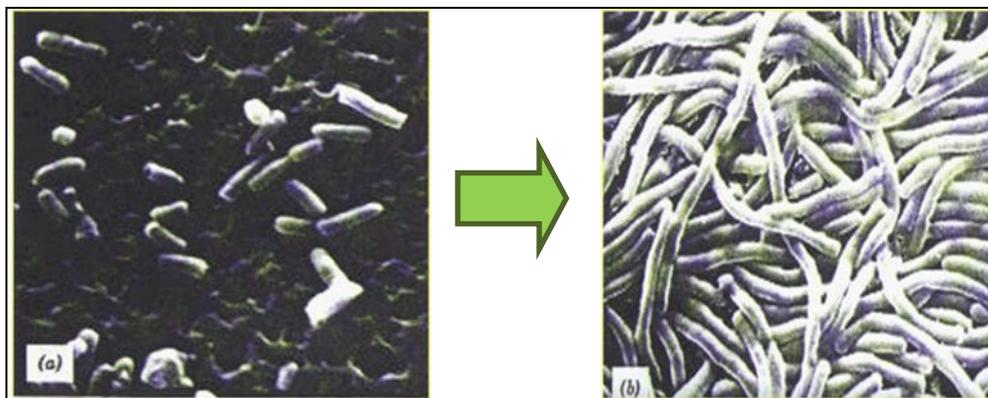
A descoberta casual de diferentes complexos de platina se deu durante a década de 60, por *Rosenberg* e colaboradores, enquanto estudavam o crescimento de uma colônia de *Escherichia coli* na presença de um campo elétrico (ROSENBERG et al, 1965; ROSENBERG et al., 1967).

Em seus experimentos, *Rosenberg* e sua equipe, após aplicar o campo elétrico durante duas horas, observaram que o meio se tornou turvo, devido ao crescimento das bactérias, que antes tinham a forma de bastonetes e após a aplicação do campo assumia um aspecto filamentosos (Figura 4) (SWINGS; DELEY, 1977; ROSENBERG et al., 1965).

Observou-se, também, que não ocorreu reprodução das bactérias devido à supressão mitótica, futuramente, esta observação colaborou para a hipótese que os complexos presentes no sistema interrompiam completamente

a divisão celular, agindo como eficazes agentes citotóxicos (SWINGS; DELEY,1977; ROSENBERG et al., 1965).

Figura 4 - Meio de cultura contendo a bactéria *Escherichia coli* antes (a) e depois (b) da aplicação do campo elétrico.



Fonte: Retirada de <http://www.chemcases.com>

Entre os compostos liberados durante a eletrólise pelos eletrodos de platina, destacou-se a cisplatina como o mais ativo agente antitumoral frente aos testes realizados em camundongos inoculados com tumores malignos do tipo Sarcoma 180 (LIPPERT, 1999). Assim, depois de diversos testes clínicos realizados em 1971, a cisplatina foi aprovada para o tratamento do câncer de próstata somente em 1978, com o nome comercial Platinol®. No Brasil, a cisplatina é comercializada pela empresa Quiral Química do Brasil S.A. com o nome Platiniil® (Figura 5) (HIGBY et al., 1974).

Figura 5 - Cisplatina produzida no Brasil - Platiniil®.



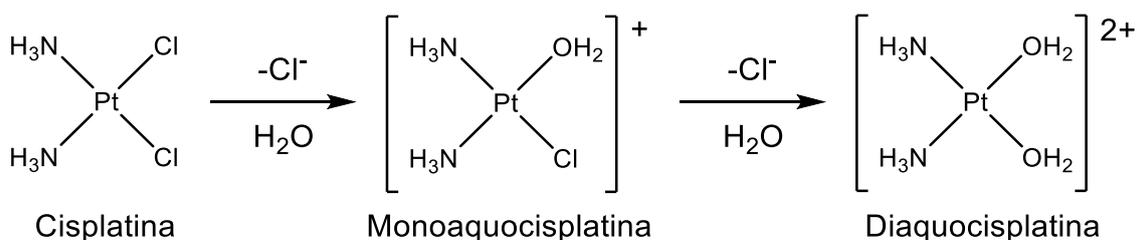
Fonte: <http://qnint.sbg.org.br> – Acessado em Dezembro de 2016.

A cisplatina se apresenta altamente eficaz no tratamento de câncer de ovário, podendo também ser utilizada em outros tipos de câncer como os de esôfago, colorretal, pulmão, linfoma, melanoma, entre outros (JAMIESON; LIPPARD, 1999; WONG; GIANDOMENICO, 1999). Embora tenha descoberto sua atividade antineoplásica apenas em 1964, a cisplatina já era conhecida desde 1845, como cloreto de Peyrone, nome que faz alusão ao químico italiano Michele Peyrone, que a sintetizou pela primeira vez (KAUFFMAN, 2010).

2.3.1 Mecanismo de Ação da Cisplatina

A cisplatina ao entrar na célula, via processo difusional, sofre modificações em sua estrutura através da substituição nucleofílica dos cloretos por água, gradativamente (Figura 6). Essas reações não ocorrem fora da célula, no plasma sanguíneo devido à alta concentração de íons cloreto (cerca de 100 mmol L^{-1}) mantendo, assim, a estrutura da cisplatina, minimizando suas reações com biomoléculas presentes como a cisteína, a metionina, a glutatona e a albumina, que possuem a probabilidade de formar ligações, provocando assim sua desativação (CEPEDA, 2007; WANG; GUO, 2007). No interior da célula, as reações de substituição têm início devido às baixas concentrações de íons cloretos, cerca de 4 mmol L^{-1} , formando espécies altamente reativas, as diaquocisplatina (LIPPERT, 1999; KLEIN; HAMBLEY, 2009).

Figura 6 - Etapas das reações de substituição nucleofílica na cisplatina após sua difusão celular, com a saída de cloretos e entrada de uma e duas moléculas de água.

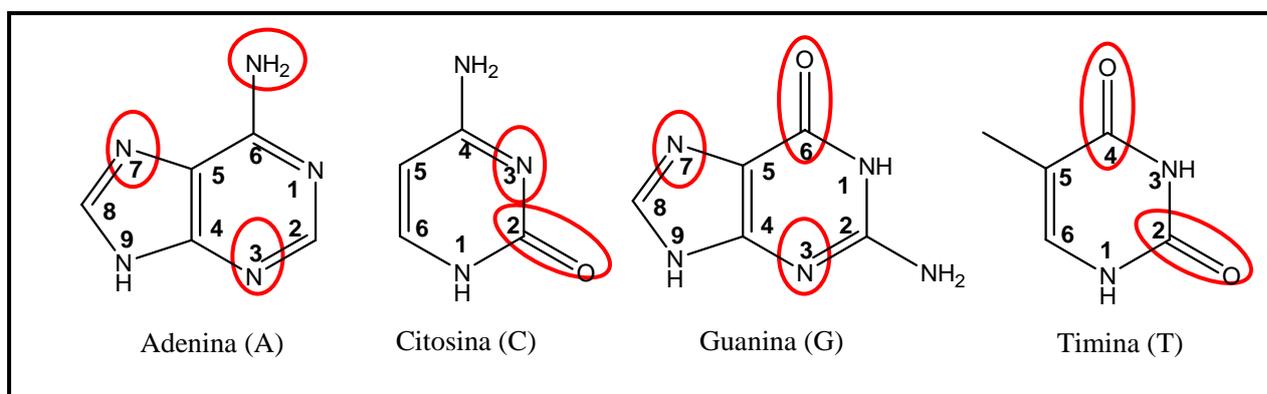


No início, uma questão a ser respondida era “qual seria o alvo biológico” já que existiam diferentes componentes celulares (ácido desoxirribonucléico - DNA, ácidos ribonucléicos – RNA, proteínas) que poderiam reagir com a platina (II). Com o tempo, houve um consenso de que o alvo principal da cisplatina era o DNA nuclear (nDNA) (KELLAND, L. R.; FARREL, 2000).

A platina (II) liga-se coordenativamente as bases nitrogenadas e os principais centros de coordenação (Figura 7) são os grupos N-3, N-7 e NH₂ da adenina; N-7, N-3 e C(6)=O da guanina; N-3 e C(2)=O da citosina; e C(2)=O e C(4)=O da timina (KELLAND, L. R.; FARREL, 2000).

Quando os complexos de platina se ligam ao DNA esta ligação ocorre preferencialmente pelos átomos de nitrogênio presentes nas bases (centros mais básicos). A interação mais estável é com o nitrogênio da guanina, devido à possibilidade de ligações de hidrogênio do grupo amônia da cisplatina com o átomo de oxigênio da guanina (KELLAND, L. R.; FARREL, 2000).

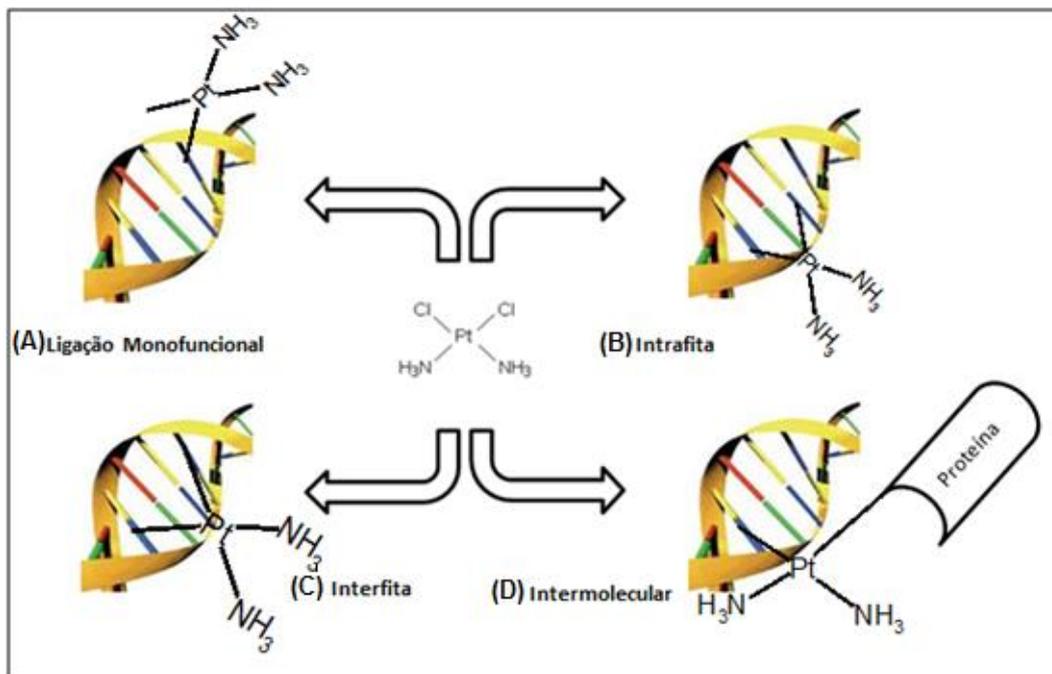
Figura 7 - Sítios mais susceptíveis a formação da ligação coordenativa com a platina.



A ligação formada entre o complexo de platina e o DNA é uma ligação coordenativa. Essa ligação coordenativa pode ser formada de diversas formas, sendo as principais:

- Monofuncional quando cada íon de platina faz apenas uma ligação com o DNA (Figura 8A).
- Bifuncional quando cada íon de platina se liga em duas regiões do DNA (Figura 8B, 8C e 8D).

Figura 8 - Principais complexos cisplatina-DNA formados. (A) Ligação monofuncional, (B) ligação bifuncional Intrafita, (C) ligação bifuncional Interfita e (D) Ligação bifuncional Intermolecular.



As ligações coordenativas bifuncionais podem ocorrer de três formas: *intrafita*, na qual as duas ligações ocorrem na mesma fita do DNA (Figura 8B); *interfita*, quando o complexo se liga em fitas diferentes (Figura 8C); e *intermolecular*, quando uma das ligações é realizada com o DNA e a outra com uma proteína ou um aminoácido (Figura 8D). Para a cisplatina, a ligação coordenativa que se forma em maior quantidade é o que corresponde à ligação *intrafita*, que envolve bases guaninas adjacentes.³³

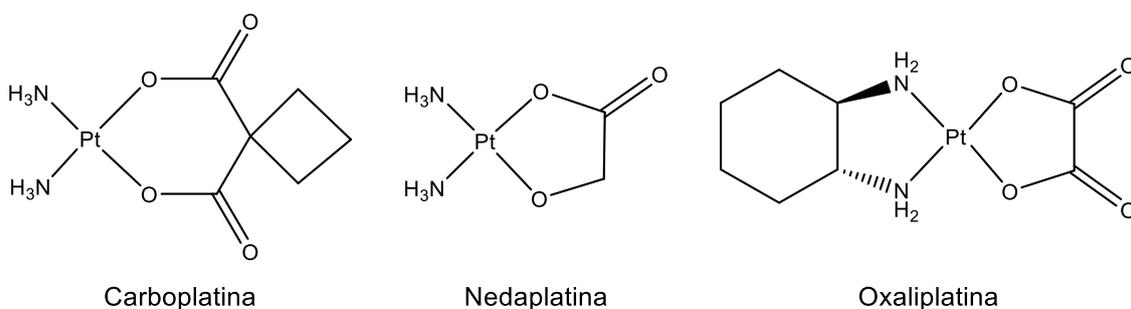
As distorções (lesões) causadas na estrutura do DNA quando este se liga à cisplatina interfere no seu funcionamento normal, ou seja, os processos de replicação e transcrição são comprometidos, fazendo com que a divisão celular e produção de proteína não aconteçam de forma eficiente. Assim, como no caso da cisplatina, qualquer agente que interferir nesses processos pode ser eficaz como citotóxico, pois a inibição da replicação do DNA sugere que o composto poderia causar a morte das células cancerosas ao interromper sua síntese de novas moléculas de DNA, usadas na divisão celular (LIPPERT, 1999).

Com relação aos mecanismos bioquímicos envolvidos na entrada da cisplatina no meio celular ainda se encontram em investigação. Porém, alguns estudos, assinalam a influência da difusão ativa, que consiste na passagem pela membrana celular com auxílio de transportadores que facilitarão a entrada da cisplatina (YAMAMOTO et al., 1999; LIPPERT, 1999; SAFAEI; HOWELL, 2005) No entanto, por muito tempo a difusão passiva foi considerada, o principal mecanismo pelo qual o fármaco transpõe a membrana celular (YAMAMOTO et al., 1999; WANG; GUO, 2007; FUERTES et al., 2003)

As limitações no uso da cisplatina abrangem desde efeitos colaterais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade; até a resistência adquirida à droga após determinado tempo de administração. Muitos fatores são atribuídos à resistência adquirida ao fármaco, entre estes, a desativação da molécula por proteínas e peptídeos contendo enxofre no plasma, diminuindo o acúmulo na célula e o aumento do efluxo - saída da célula (YAMAMOTO et al., 1999; WONG; GIANDOMENICO, 1999; KLEIN; HAMBLEY, 2009).

Diante destas limitações, vêm crescendo a busca por complexos análogos, como a carboplatina, a oxaliplatina e nedaplatina (Figura 9) - denominados como fármacos de segunda e terceira gerações (PASSETO et al., 2006). Além do surgimento de complexos denominados não tradicionais, alvo desta pesquisa, como os complexos de platina com geometria trans (MUSSETTI et al., 2011), compostos polinucleares de platina (II) (FARRELL, 2004) e complexos híbridos (WANG; GUO, 2008).

Figura 9 - Estruturas de compostos de platina (II) disponíveis no mercado como fármacos antitumorais: carboplatina, nedaplatina e oxaliplatina.



2.3.2 Complexos de Platina “Não-tradicionais”

Os complexos de platina não tradicionais têm sido amplamente explorados como uma alternativa aos complexos “tradicionais”, cisplatina e seus análogos (KOSTOVA, 2006). Dentre os compostos não tradicionais de platina (II) destacam-se os de geometria *trans*.

Devido à falta de citotoxicidade do isômero *trans*-diaminodicloroplatina (transplatina), os complexos análogos à geometria *cis*, são bem mais estudados do que os complexos com geometria *trans* (COLUCCIA; NATILE, 2007) (Figura 10). Porém, a partir dos anos 90, diferentes trabalhos na literatura vêm mostrando que complexos de platina *trans* também podem exibir atividade, quebrando o paradigma que apenas os complexos análogos à cisplatina são ativos (KELLAND et al., 1994). No entanto, os ligantes cloretos em posição *trans* entre si, são mais reativos que aqueles em posição *cis*, contribuindo para a ocorrência de reações indesejadas com as biomoléculas existentes no plasma (FARRELL, 2004).

Os complexos de geometria análoga ao da transplatina que têm mostrado citotoxicidade elevada quando comparadas a própria transplatina, são os complexos que contêm ligantes heterocíclicos aromáticos nitrogenados (piridina, quinolina, imidazol), aminas alifáticas e ligantes heterocíclicos não planos (piperidina e piperazina) (ARIS et al., 2007; KALINOWSKA-LIS, 2008).

Os complexos com ligantes nitrogenados, por exemplo, podem ligar-se ao DNA formando uma variedade de ligações coordenativas, entre estas, ligações cruzadas intrafita, interfita, monofuncionais e com o DNA e uma proteína, dependendo do tipo do ligante nitrogenado e do efeito estérico (ARIS; FARRELL, 2009).

A eficácia dos complexos híbridos foi comprovada por diversos experimentos nos quais demonstraram a capacidade de se coordenar ao nDNA, através da platina (II) de modo monofuncional, porém causando mudanças conformacionais na estrutura do nDNA mais significativas que as da cisplatina, isto resulta no aumento da atividade citotóxica do complexo híbrido (BARUAH et al., 2004; BROW et al., 2002). Por outro lado, existem resultados na literatura que embora o híbrido seja mais ativo do que a cisplatina, este não foi mais citotóxico do que o ligante livre (HOLMES et al., 2001).

Os complexos polinucleares de platina (II) são compostos que contêm mais de um íon de platina em sua estrutura. Devido a isso, podem interagir com o nDNA de forma mais rápida e mais ativa do que os complexos mononucleares (MANGRUM; FARRELL, 2010). Além disso, o nDNA pode ser submetido a mudanças conformacionais distintas daquelas induzidas pela cisplatina e seus análogos, podendo assim, ser uma alternativa viável no combate aos tumores resistentes à cisplatina.(BRABEC et al., 1999; QU et al., 2004).

O exemplo mais consolidado é um complexo trinuclear de platina (Figura 12) que foi testado em ensaios clínicos de fase II que consiste em administrar medicamento experimental em um grande número de pessoas que possuem a enfermidade ou condição em particular, para determinar a eficácia e a segurança do fármaco (WHEATE et al., 2010).

Este complexo trinuclear de platina mostrou uma atividade excelente contra cânceres de mama, pulmão, pâncreas e contra linhagens de células cancerosas de ovário que se mostravam resistentes à cisplatina. E para os cânceres de ovário e melanoma foi pelo menos 20 vezes mais eficiente do que a cisplatina (MANZOTTI et al., 2000).

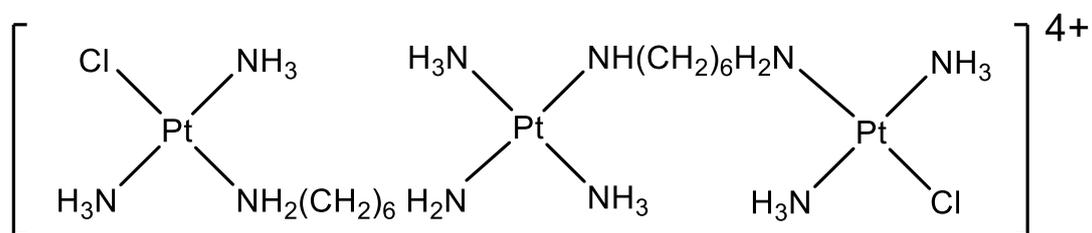
Como pode ser observado na Figura 12 dois dos três centros presentes no complexo têm ligantes cloretos que é um bom grupo abandonador, sendo assim, facilmente substituídos pelas bases do nDNA no interior da célula, devido a isso cada molécula desse complexo é capaz de gerar duas ligações coordenativas monofuncionais com o nDNA (ARIS et al., 2007).

Este complexo liga-se no sulco maior, podendo formar ligações cruzadas flexíveis intra e interfitas de longo alcance, sendo esta última a principal destas (QU et al., 2003). As interações deste complexo polinuclear de platina, causa

leves distorções na molécula de nDNA, que fazem estas ligações coordenativas não serem reconhecidas por algumas proteínas do sistema biológico (ARIS et al., 2007).

Quando ocorre do complexo polinuclear não possuir cloretos em sua estrutura, ou seja, não conseguir formar ligações covalentes, este poderá interagir de modo não-covalente, através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, que também causam distorções no nDNA (BROW et al., 2004; HARRIS et al., 2006). Além disso, a ausência de ligantes abandonadores impede reações com tióis e proteínas celulares (WHEATE et al., 2010).

Figura 12 - Complexo trinuclear de platina BBR3464.



Fonte: Adaptado de Harris, et al, 2006.

Diante do histórico da atividade dos compostos de platina frente a tumores, este trabalho objetiva incorporá-los na matriz polimérica da levana, sendo necessário para tanto a adição de agrupamentos amino, pois os íons platina têm mais afinidade pelo átomo de nitrogênio do que pelo oxigênio que já existia na matriz.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes foram obtidos comercialmente com pureza P.A.: dicloreto de hidrazina (Vetec®), ácido clorídrico (Vetec®), ácido nítrico (Vetec®), cloreto de potássio (Vetec®), etanol (Dinâmica®), acetona (Dinâmica®), agar bacteriológico (Vetec®), peptona de carne (Himedia®), extrato de carne (Himedia®), D-Glicose Anidra (Nuclear®), extrato de levedura (Himedia®), Sacarose (Vetec®), Diidrogeno Fosfato de Potássio (Vetec®), Sulfato de Magnésio Heptahidratado (Vetec®), Sulfato de amônio (Vetec®), periodato de potássio (Vetec®), Metanol (Dinâmica®), 2,4-dinitrofenilhidrazina (Aldrich®), hidróxido de potássio (Vetec®), glutaraldeído (Aldrich®), Etilenodiamina (Aldrich®), borohidreto de sódio (Aldrich®), glicina (Aldrich®), 3-amino-1,2-propanediol (Aldrich®), *p*-dimetilaminobenzaldeído (Vetec®).

3.2 SÍNTESES DOS COMPLEXOS DE PLATINA PRECURSORES

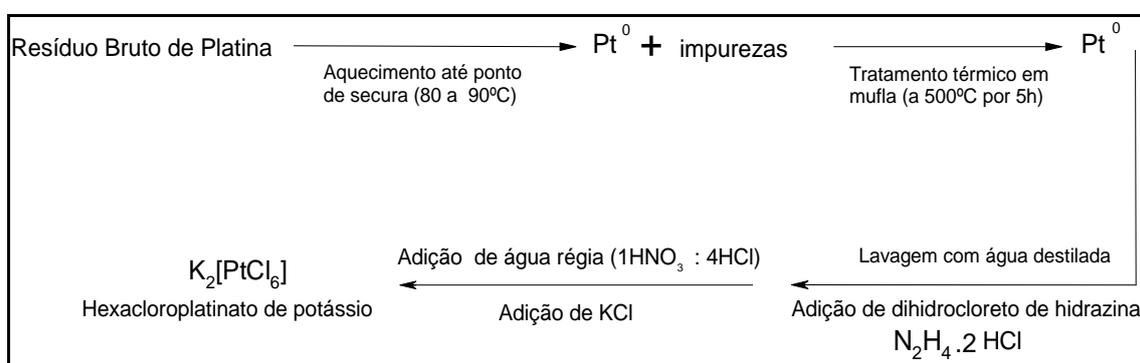
3.2.1 Síntese do Hexacloroplatinato de Potássio Através da Recuperação do Resíduo de Platina

O composto hexacloroplatinato de potássio foi produzido através da recuperação de resíduos de platina (KAUFFMAN; TETER, 1963) - existentes no Laboratório de Análise Química Inorgânica e Sensores (LAQIS), evitando o descarte inadequado e/ou o acúmulo deste resíduo no laboratório. A recuperação de resíduos químicos proporciona a reutilização dos materiais oriundos de rejeitos dos procedimentos experimentais realizados nos laboratórios e acarreta na minimização das agressões causadas ao meio ambiente, como a poluição. Após a síntese, o hexacloroplatinato de potássio foi caracterizado por difração de Raios-X.

Em um béquer foi adicionado cerca de 300 mL de resíduo de platina, controlou-se a temperatura, em uma chapa aquecedora, entre 80 e 90 °C até ponto de secura. Foi adicionado cerca de 3 mL de água destilada para

solubilizar o resíduo e facilitar na transferência deste para um cadinho. O cadinho foi levado a mufla por 5 h a 500 °C, após o tempo completado foi adicionado dicloreto de hidrazina em excesso, lavou-se o precipitado por 7 vezes com água destilada e em seguida fez-se o tratamento com água régia a quente até a solução se tornar límpida. Assim, foi adicionado KCl para forma um precipitado de hexacloroplatinato de potássio ($K_2[PtCl_6]$) (Figura 13). Filtrou-se com água destilada e etanol gelados, esperando chegar a ponto de secura.

Figura 13 - Esquema da metodologia empregada para recuperar resíduos de platina.



3.2.2 Síntese do Tetracloroplatinato de Potássio

O sal tetracloroplatinato de potássio (Figura 14) foi sintetizado a partir do hexacloroplatinato de potássio, seguindo a metodologia de síntese descrita segundo a referência (PEYRONE, 1844; RAMBERG, 1913).

Figura 14 - Esquema da metodologia empregada para recuperar resíduos de platina.



Em um béquer de 250 mL foi colocado 1,00 g (2,056 mmol) de hexacloroplatinato de potássio dissolvido em água destilada. Dada a estabilização da temperatura entre 50 e 60 °C, com uma pipeta de Pasteur, foi adicionado 0,1081 g (1,028 mmol) de uma solução aquosa de dicloreto de

hidrazina gota-a-gota entre o período de 5 a 10 minutos para que não houvesse redução drástica de Pt^{4+} para Pt^0 .

Com a adição de dicloreto de hidrazinha a solução torna-se vermelha, cor característica do tetracloroplatinato de potássio ($K_2[PtCl_4]$). Para completar a reação, mantêm-se a síntese entre 50 e 60 °C por duas horas, dado o término deste tempo, elevou-se a temperatura na faixa de 80 a 90 °C, deixando chegar até o ponto de secura, momento no qual se percebeu a formação de cristais em forma de agulhas. Os cristais formados foram lavados com acetona P.A., secados a vácuo e caracterizados por difratometria de Raios-X.

3.3 PRODUÇÃO DE LEVANA

3.3.1 Micro-organismos

Foi utilizada uma linhagem de *Zymomonas mobilis* codificada como ZAG-12, e registrada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com o número UFPEDA 241. A Coleção UFPEDA encontra-se cadastrada no “*World Federation Culture Collections -World Data Center on Microorganisms*”, com o número 114. A ZAG-12 foi uma cultura obtida artificialmente pela fusão de esferoplastos oriundos de outras linhagens de *Zymomonas mobilis* da Coleção UFPEDA codificadas como ZAP e Ag11 (CALAZANS et al., 1989).

3.3.2 Preparo dos Meios de Cultura

3.3.2.1 Agar Nutritivo

Foi preparado 100 mL do meio agar nutritivo (AN), adicionando todos os componentes em um béquer e dissolvendo-os em água destilada até completar o volume desejado. Foi verificado o pH (faixa desejada 6,7-7,2) do meio AN que foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Após autoclavação, distribuiu-se o meio AN em quatro placas de Petri, sendo uma dessas usada para o controle do teste, isto é, sem inóculo. Após solidificação do meio, semearam-se as placas utilizando o procedimento de estriamento. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e logo após este período fez-se observações. Na Tabela 1, estão dispostos os compostos utilizados no meio AN.

Tabela 1 - Composição do Meio Agar Nutritivo

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Extrato de Carne	3,0
Peptona de Carne ou Caseína	5,0
Agar Bacteriológico	15,0-20,0

3.3.2.2 Meio de Cultura Sabouraud Líquido (SDL)

Foram preparados 90 mL do meio SDL, adicionando todos os componentes em um béquer e dissolvendo-os até completar o volume desejado. Distribuiu-se 90 mL em dez tubos de ensaios, recebendo cada um 9 mL de meio SDL. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Após retirar da autoclave foi preciso testar a esterilidade da estufa, então, colocou-se os tubos em um suporte, esperando esfriar para medir o pH (faixa desejada 6,5-7,0) e por fim levou até a estufa a 30 °C por 24 h.

Validando a esterilidade da estufa, partiu-se para o procedimento de inoculação do microrganismo no meio SDL. Para isto, foi utilizada uma linhagem de *Zymomonas mobilis* codificada como ZAG-12, e registrada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, como descrito anteriormente.

Sob a chama do bico de Busen e com auxílio de pipetas semi-automáticas colocou-se 1 mL das linhagens e inoculou-se os dez tubos de ensaio que continham meio SDL. As condições para o crescimento do microrganismo são colocar em estufa a 30 °C por 48 h. Após observações, separaram-se dois tubos para inoculação no meio de pré-fermentação e o restante foi acondicionado a 4 °C. Estes se mantêm em condições ótimas de

uso por dois meses, podendo se estender esse período para três meses no máximo. Decorrido esse período, deve-se fazer novo semeio em meio de conservação SDL com os mesmos critérios de esterilidade. Na Tabela 2, estão dispostos os compostos utilizados para o preparo do meio SDL.

Tabela 2 - Composição do Meio de Cultura SDL

Composto	Quantidade (g L⁻¹)
Glicose D. Anidra	20,0
Extrato de Levedura	5,0

3.3.2.3 Meios de Pré-Fermentação

Fez-se uma estimativa para obter 2 L de meio para fermentação principal, então é indicado que a quantidade do inóculo colocado em um meio de cultura qualquer represente 10 % do volume final do sistema. Assim, para 2 L de meio para fermentação, inoculou-se 200 mL de meio de pré-fermentação. Logo, a mesma observação é válida para o meio de pré-fermentação que receberá um inóculo do meio SDL de 20 mL. Sabendo disso preparou-se 180 mL do meio de pré-fermentação, em vez de 200 mL, pois este volume será completado após inóculo.

Foram preparados 180 mL do meio de pré-fermentação, separando os componentes do meio de cultura em três distintos erlenmeyers. No primeiro erlenmeyer colocou-se a sacarose, no segundo colocou-se o extrato de levedura e no último, os sais. Os erlenmeyers foram tamponados, levados a autoclave a 121 °C por 15 minutos e em seguida, após resfriamento, juntou-se a sacarose, o extrato de levedura e os sais em um único erlenmeyer, verificou-se o pH (faixa desejada entre $5,8 \pm 0,2$) e sob a chama do bico de Bunsen adicionou-se 20 mL do meio de conservação SDL que continha a *Zymomonas mobilis* crescida. O meio foi incubado a 30 °C por 48 horas, esta etapa é conhecida como a “Etapa de Crescimento de Biomassa”. Na Tabela 3 estão descritos os componentes utilizados no meio de pré-fermentação:

Tabela 3 - Composição do Meio de Pré-fermentação.

Composto	Quantidade (g L⁻¹)
Sacarose	100,0
Extrato de levedura	2,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0

3.3.2.4 Meios de Fermentação

Foram preparados 1800 mL do meio de pré-fermentação, separando os componentes do meio em três distintos erlenmeyers. No primeiro erlenmeyer colocou-se a sacarose, no segundo colocou-se o extrato de levedura e no último, os sais. Os erlenmeyers foram tamponados, levados a autoclave a 121 °C por 15 minutos e em seguida, após resfriamento, juntou-se a sacarose, o extrato de levedura e os sais em um único erlenmeyer e sob a chama do bico de Bunsen adicionou-se 200 mL do meio de pré-fermentação que continha a *Zymomonas mobilis*. O meio foi incubado a 30 °C por 72 h. Na Tabela 4 estão dispostos os compostos utilizados no meio de fermentação.

Tabela 4 - Composição do Meio de Fermentação.

Composto	Quantidade (g L⁻¹)
Sacarose	200,0
Extrato de levedura	2,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0

3.3.3 Centrifugação e Filtração do Meio de Fermentação

Após 72 h de fermentação, realizaram-se os procedimentos de centrifugação e filtração do meio de fermentação para que houvesse a

remoção das células contidas no sistema. A Centrifugação foi realizada a 4 °C, utilizando uma rotação de 13500 g por 15 min. E a filtração foi feita em um sistema de filtração à vácuo com membrana de 0,22 µm.

3.3.4 Fracionamento de Levana Produzida por Precipitação

Abaixo segue uma explanação dos cálculos realizados nos procedimentos de fracionamento. Para se fracionar a levana na concentração etanólica de interesse utilizou-se a Equação 1:

$$V_A \cdot C_A + V_F \cdot C_F = V_M \cdot C_M \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

V_M = Volume da Mistura = representa o volume total do sistema (solução aquosa de levana + volume de etanol presente no sistema ou volume de etanol a ser acrescentado).

C_M = Concentração da Mistura = representa a concentração etanólica desejada (a ser preparada).

V_A = Volume do Álcool = representa o volume de etanol a ser adicionado para atingir a concentração desejada.

C_A = Concentração do Álcool = representa a concentração de etanol P.A. (neste caso 98%).

V_F = Volume do Meio Filtrado = representa o volume do sistema antes da adição de etanol.

C_F = Concentração do Meio Filtrado = representa a concentração de etanol do sistema antes de adicionar qualquer volume de etanol.

Dessa forma, calcularam-se os volumes que seriam utilizados para produzir o polissacarídeo que precipita nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50%, codificadas de F10, F20, F30, F40 e F50, respectivamente. Lembrando que as cadeias precipitadas em diferentes concentrações de etanol possuem a mesma unidade mínima repetitiva, diferenciando apenas no peso molecular. É importante salientar que as cadeias de maior peso molecular precipitam em

concentrações menores de etanol e o inverso é verdadeiro para as moléculas de pesos moleculares menores, que precipitam em concentrações maiores.

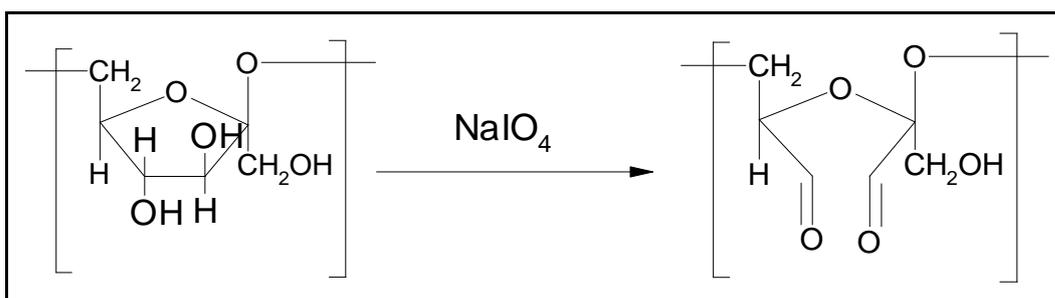
Então para a fração codificada de F10, colocou-se 227,27 mL de etanol (baseado na Equação 1), esperou-se decantar, retirou-se a solução sobrenadante e a reservou para o próximo fracionamento (F20). O sólido decantado foi solubilizado em água deionizada, congelado, liofilizado e codificado como F10. O mesmo procedimento fez-se para as frações F20, F30 e F40.

Por fim, pegou-se todo o volume sobrenadante obtido na fração F40, fizeram-se os cálculos e adicionou-se ao sistema 4487,17 mL de etanol, esperou-se decantar e descartou-se a solução sobrenadante. O sólido decantado foi solubilizado em água deionizada, congelado, liofilizado e codificado como F50. A levana da fração 50 foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , além da técnica bidimensional de RMN COSY.

3.4 OXIDAÇÃO DA LEVANA

A reação (Figura 15) procedeu-se em um balão colocando 20 mL de água deionizada, 0,1412 g (0,083 mmol) de levana e 0,018 g (0,087 mmol) de periodato de potássio. Foi colocado em agitação constante durante sete horas. As carbonilas presentes no composto oxidado foram quantificadas pelo método colorimétrico de determinação de aldeído. O composto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho.

Figura 15 - Reação de oxidação da levana.



3.4.1 Avaliação Quantitativa de Carbonila na levana Oxidada

O teste foi realizado através do método colorimétrico de determinação de aldeído (LAPPIN; CLARK, 1951) na levana considerando as soluções oxidadas a 10% e a 25%, para realização do teste foi necessário preparar as seguintes soluções:

- *Solução de Metanol Livre de Carbonila*

Adicionou-se 5g de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNH) a 500 mL de metanol, adicionaram-se algumas gotas de ácido clorídrico e destilou-se.

- *Solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (Saturado)*

Em um béquer, colocou-se em torno de 20 mL de metanol destilado e DNH até saturar a solução.

- *Solução de Hidróxido de Potássio*

Pesou-se aproximadamente 10 g de hidróxido de potássio e dissolveu-se em 20 mL de água destilada, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol destilado, até o menisco.

- *Solução de Glutaraldeído*

A partir da solução comercial de glutaraldeído de 25%, fizeram-se diluições entre as concentrações de 10^{-3} a 10^{-7} mol L⁻¹.

Após a preparação das soluções citadas anteriormente, em tubos de ensaios foi colocado 1 mL da solução de levana oxidada ou da solução de

glutaraldeído (para fazer a curva de calibração), 1 mL da solução saturada de DNH e 1 gota de ácido clorídrico concentrado.

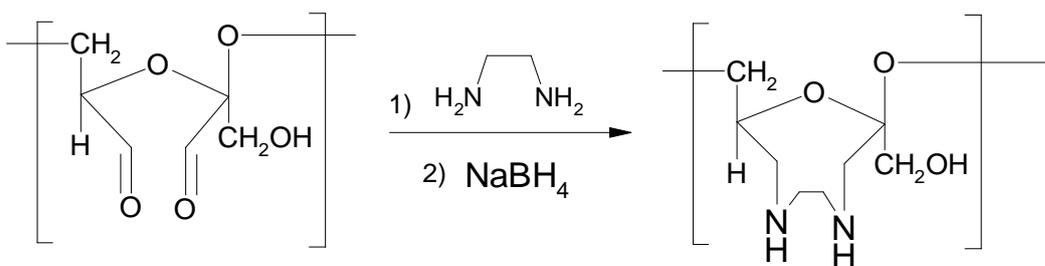
Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por cinco minutos. Em seguida resfriou-se e adicionou-se 5 mL de hidróxido de potássio. Realizando assim a espectroscopia de absorção eletrônica monitorando o máximo de absorção em 480 nm.

3.5 MODIFICAÇÕES NA MATRIZ DA LEVANA OXIDADA

3.5.1 Modificação da Levana Oxidada I (Utilizando etilenodiamina)

A reação (Figura 16) procedeu-se em um balão colocando 1 g (aproximadamente 6 μmol) de levana oxidada, 103,4 μL (1543,5 μmol) de etilenodiamina e deixou-se em um sistema de agitação por 24 h, após o tempo decorrido adicionou-se borohidreto de sódio deixando reagir por mais 12 h sob agitação constante. O produto final foi liofilizado e armazenado em geladeira com o código Levoxietileno. O composto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Figura 16 - Reação de Modificação da Levana Oxidada I.

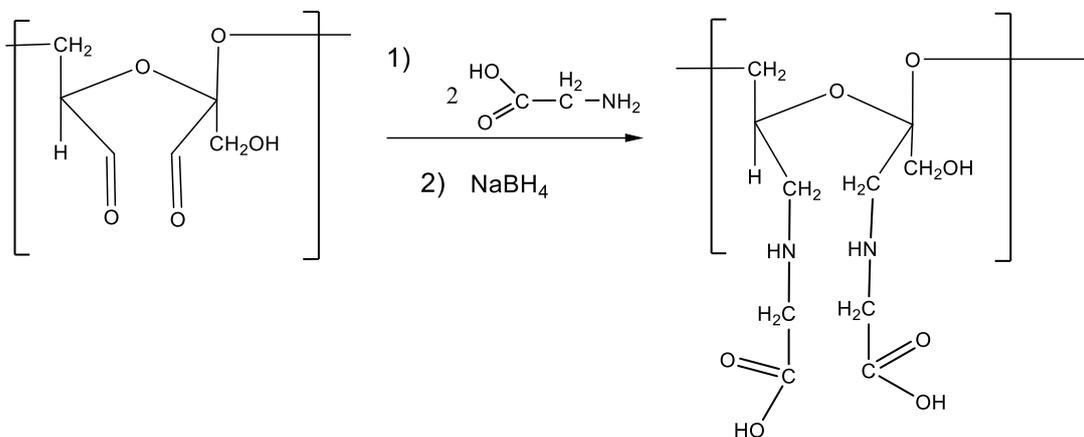


3.5.2 Modificação da Levana Oxidada II (Utilizando glicina)

A reação (Figura 17) procedeu-se em um balão colocando-se 1 g (aproximadamente 6 μmol) de levana oxidada, 0,23 g (3080,0 μmol) de glicina e deixou-se em um sistema de agitação por 24 h, após o tempo decorrido adicionou-se borohidreto de sódio deixando reagir por mais 12 h sob agitação constante. O produto final foi liofilizado e armazenado em geladeira com o

código Levoxiglicina. O composto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

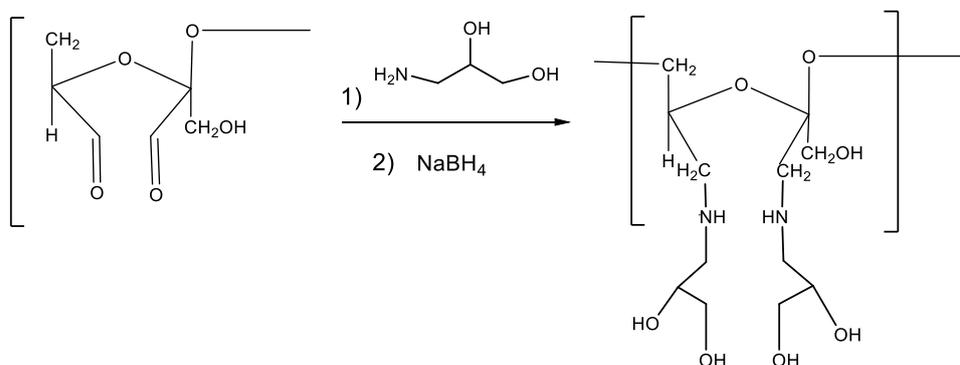
Figura 17 - Reação Modificação da Levana Oxidada II.



3.5.3 Modificação da Levana Oxidada III (Utilizando 3-amino-1,2-propanediol)

A reação (Figura 18) procedeu-se em um balão colocando-se 1 g (5,88 μmol) de levana oxidada, 120 μL (3080,0 μmol) de 3-amino-1,2-propanediol e deixou-se em um sistema de agitação por 24 h, após o tempo decorrido adicionou-se borohidreto de sódio deixando reagir por mais 12 h sob agitação constante. O produto final foi liofilizado e armazenado em geladeira com o código Levoxiamino. O composto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Figura 18 - Reação Modificação da Levana Oxidada III.



3.6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE AMINA

Para os compostos que foram submetidos às modificações dos compostos Levoxietileno, Levoxiglicina e Levoxiamino foram realizados os testes de avaliação qualitativa de amina. Preparou-se uma solução de 2% de *p*-dimetilaminobenzaldeído (revelador de amina) em 98 % de metanol (m/m). Em tubos de ensaios colocou-se 0,5 mL do composto avaliado e 0,5 mL de solução reveladora e observou se houve mudança de coloração pra a cor amarela.

3.7 INCORPORAÇÃO DOS ÍONS Pt^{2+} A MATRIZ DO LEVANA MODIFICADA

3.7.1 Incorporação dos Íons Pt^{2+} a Matriz do LEVOXIETILENO

Em um balão colocou-se 5,88 μ mol de Levoxietileno e 1543,5 μ mol de tetracloroplatinato de potássio sob agitação por 3 horas, a reação foi realizada em água com temperatura ambiente. O produto foi dialisado, congelado e liofilizado. O composto foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética. O mesmo procedimento foi utilizado para a incorporação de platina nos ligantes Levoxiglicina e Levoxiamino.

3.8 CARACTERIZAÇÃO

3.8.1 Difractometria de Raios-X

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em equipamento Difract ACT, série 100-Siemens, utilizando a linha de cobre $K\alpha$, com passo de 0,02 e varredura de 10° a 60° .

3.8.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais dos compostos foram obtidos a partir da técnica de pastilha de KBr. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro

com transformada de Fourier, Bruker, modelo IF66, abrangendo a região de 4000 a 400 cm^{-1} , cuja resolução espectral foi de 4 cm^{-1} .

3.8.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C

As análises de RMN foram feitas no equipamento VARIAN Unity Plus 300, com frequência de 300 MHz para ^1H e de 75 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão (ppm) em relação aos picos residuais de H_2O .

3.8.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{195}Pt

As análises de RMN foram feitas no equipamento VARIAN Unity Plus 300. Na espectroscopia de RMN no que se refere à platina, o isótopo ^{195}Pt , apresenta-se razoavelmente sensível quanto à sua detecção, devendo soluções, com concentrações iguais ou superiores a 10 mmol L^{-1} , serem suficientes para adquirir um sinal, sem maiores dificuldades devido à abundância natural de 33,8% (ISMAIL et al., 1980).

A janela espectral para os deslocamentos químicos de ^{195}Pt ($\delta^{195}\text{Pt}$) é relativamente grande (amplitude de 15000 ppm), sendo extremamente dependente do estado de oxidação (Pt^0 , Pt^{II} ou Pt^{IV}) e do ambiente químico presentes na primeira esfera de coordenação do núcleo de platina (STILL et al., 2007)

3.8.5 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV/Visível

Os espectros de absorção dos compostos foram obtidos em solução aquosa, com concentrações em torno de 10^{-5} mol L^{-1} . O espectrofotômetro utilizado foi o Perkin Elmer modelo Lambda 6, operando com lâmpada de tungstênio (faixa de 800-340 nm) e com lâmpada de deutério (faixa 350-190 nm).

3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.9.1 Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais

Foram utilizadas linhagens de células HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão humano), MCF-7 (câncer de mama humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal) e Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640 no Departamento de Antibióticos da UFPE.

Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. As amostras testadas foram Levoxietileno, LevoxietilenoPt, Levoxiamino, LevoxiaminoPt, Levoxiglicina e LevoxiglicinaPt, Levoxi e Levana, sendo dissolvidas em água com concentração de 5 mg ml⁻¹.

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY, 1988; MOSMANN, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, as amostras, dissolvidas em água foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg mL⁻¹) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism7.0*.

3.9.2 Avaliação de Atividade Antimicrobiana

O potencial antimicrobiano da matriz de levana, da levanas aminadas e da levana oxidada foi avaliado frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) e bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), bem como para os fungos *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Candida utilis* (UFPEDA 1009), *Candida krusei* (UFPEDA 1002).

As bactérias e fungo foram provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A Concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através da técnica de microdiluição em multiplacas com 96 poços (PESSOA et al., 2014). Os meios de cultura empregados foram o Ágar Sabourand Líquido (para fungo) e Ágar Muelle-Hinton (para bactérias). O Metronidazol (2,5 µg/mL) e Fluconazol (2,5 µg/mL) foram usados como controle positivo, enquanto o álcool etílico como controle negativo. As análises foram realizadas em triplicata e as microplacas foram cultivadas a 37 °C por 18-24 h para bactérias e 30 °C por 48-72 h para o fungo. Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com a adição de 10 µL da solução de risazurina a 0,01% e incubadas por 3 h. (CLSI, 2010; BEZERRA et al., 2017). A CMI foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo, com concentração final de 2500 µg mL⁻¹.

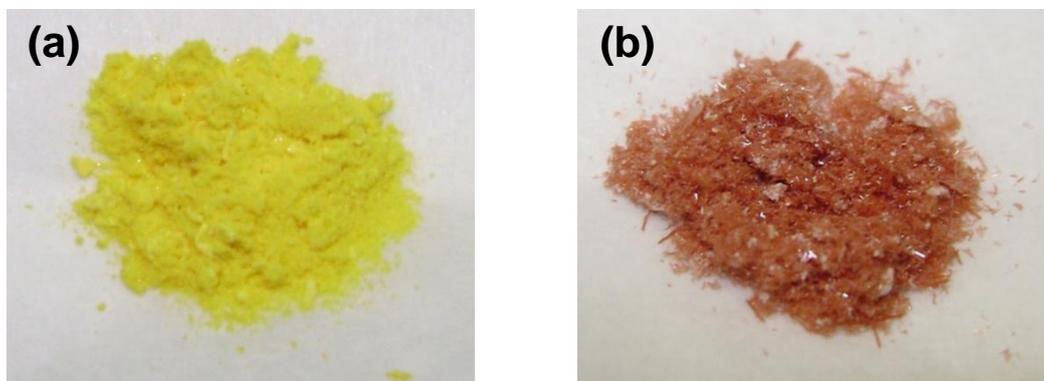
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NA SÍNTESE DOS COMPLEXOS: HEXACLOROPLATINATO E TETRACLOROPLATINATO DE POTÁSSIO.

4.1.1 Aspecto físico

Os complexos tetracloroplatinato de potássio (K_2PtCl_4) (composto precursor na síntese dos demais complexos) e hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) foram produzidos com sucesso. O complexo hexacloroplatinato de potássio sintetizado através da recuperação de resíduos de platina foi obtido sob a forma de cristais de cor amarela (com rendimento de 98%) (Figura 19.a) e o complexo tetracloroplatinato de potássio se apresentou na forma de cristais agulha de cor avermelhada, a reação teve rendimento de 90% (Figura 19.b).

Figura 19 - (a) Cristais de hexacloroplatinato de potássio e (b) cristais de tetracloroplatinato de potássio.



4.1.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

O hexacloroplatinato e o tetracloroplatinato de potássio foram caracterizados por difratometria de raios-X (DRX), obtendo um difratograma com picos característicos dos complexos formados e condizente com os existentes no banco de dados do JCPDS (do inglês: *Joint Committee on Powder Diffraction Data*) (Figuras 20 e 21), inferindo, portanto, a formação dos compostos desejados.

Figura 20 - Difratoograma de raios-X do hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) - dados experimental e do banco de dados sobrepostos.

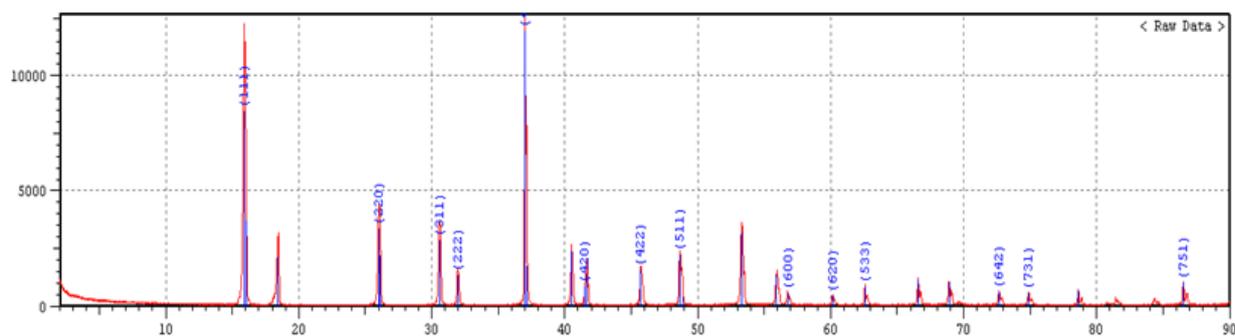
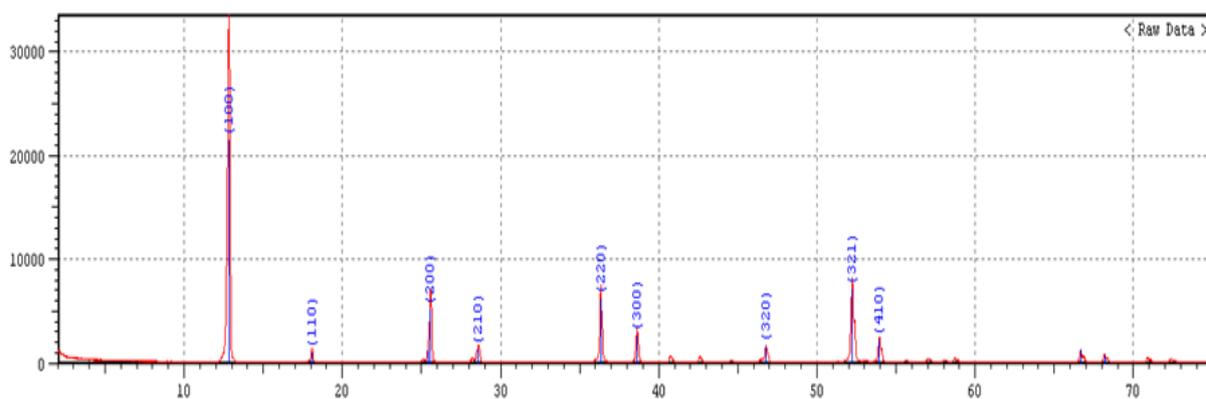


Figura 21 - Difratoogramas de Raios-X do tetracloroplatinato de potássio (K_2PtCl_4) - dado experimental e do banco de dados sobrepostos.



4.2 NA PRODUÇÃO DE LEVANA

4.2.1 Eficiência das etapas na produção e aspecto físico

Os ensaios realizados com o meio de cultura Agar Nutritivo com finalidade de verificação de contaminação durante os processos de crescimento e fermentação não apresentaram crescimento de microrganismos. É importante salientar que *Zymomonas mobilis* não cresce em meio de Agar Nutritivo, então se houvesse o crescimento este deveria ser atribuído a uma contaminação, ou seja, presença de outro tipo de microrganismo, indicando

que o procedimento não estava sendo estéril e que não poderia dar continuidade às próximas etapas.

A inoculação no meio de cultura SDL, que tem como função proporcionar o desenvolvimento e posterior conservação do microrganismo, se procedeu de forma eficiente e estéril, ocorrendo o desenvolvimento do microrganismo observado pela turbidez do meio e a formação de espuma.

O meio de pré-fermentação tem como finalidade multiplicar as bactérias existentes (crescidas) no meio para que a fermentação principal seja mais intensa, este possui os mesmo componentes do meio de fermentação, meio que ocorre a produção do polissacarídeo, diferenciando apenas na quantidade de sacarose utilizada.

Assim, o crescimento de *Zymomonas mobilis* aconteceu em 24 horas, sendo bem sucedidas as etapas de pré-fermentação e a fermentação nos tempos propostos na metodologia aplicada. Na Figura 22 (A), foi apresentada a imagem do meio de pré-fermentação antes da inoculação e sua mudança física após 24 horas, mostrada na Figura 22 (B); onde é perceptível a turbidez que indica o crescimento do microrganismo no sistema.

Figura 22 - Meio de pré-fermentação: antes da inoculação (A) e após 24 horas de inoculação (B).



A levana total produzida e liofilizada apresentou-se na forma de um sólido esponjoso de coloração branca [Figura 23 (B)]. Na Figura 23 (A), também se pode observar o meio de fermentação após adição de etanol

apresentado a coloração branca referente à levana no momento do fracionamento.

Figura 23 - (A) Levana fracionada (F50) e (B) liofilizada.



As frações obtidas têm peso molecular específico para cada concentração de etanol (SILVA, 2010). Este fracionamento serviu como um método de purificação da levana para obter a fração desejada e permite a obtenção de diferentes faixas de massa molecular desse biopolímero (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa molecular viscosimétrica média, para a levana, obtida em cada uma das etapas de fracionamento etanólico (SILVA, 2010).

Fração de levana	Massa Molecular Viscosimétrica Média (g.mol⁻¹)
F10	313.940
F20	230.851
F30	217.202
F40	210.897
F50	170.100
F60	75.650
F70	33.854

A fração precipitada com 50% de etanol (F50) apresenta-se predominante com uma contribuição de 80% da massa total obtida na

produção do polímero utilizando *Zymomonas mobilis*, assim como mostra a Tabela 6, encontrada na literatura, que apresenta os percentuais de massa de levana obtidos nas distintas frações obtidas no fracionamento. Assim, a escolha da fração F50 para a síntese do composto final contendo platina é dada devido à grande produção desta por parte do microorganismo (sob condições mencionadas).

Na Tabela 6 também se pode observar as frações F60 e F70 que não foram fracionadas no procedimento deste trabalho, pois assim como as frações F10, F20, F30 e F40 não havia interesse nas frações devido os pequenos valores de massa produzida, porém, mesmo diante dos baixos percentuais as frações iniciais foram fracionadas, por necessidade, no intuito de purificar a matriz até conseguir a fração F50.

Tabela 6 - Frações de levana obtidas a partir dos percentuais de etanol (SILVA, 2010).

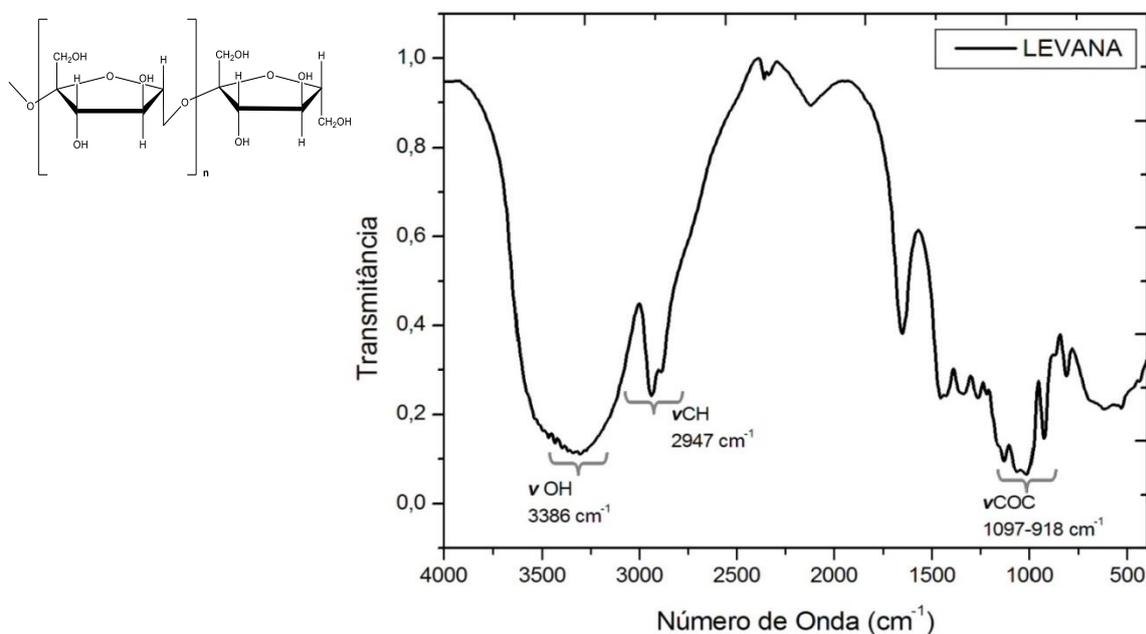
Código das frações	Percentual de levana	Percentual de Etanol
F10	1,1	10
F20	~1,0	20
F30	1,1	30
F40	6,6	40
F50	80	50
F60	4,5	60
F70	2,3	70

4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

No espectro na região do infravermelho da levana F50 (Figura 24) foi possível observar todas as transições características de polissacarídeos (POLI et al., 2009). No espectro, o estiramento de forte intensidade na região de 3386 cm^{-1} evidencia a presença dos grupos OH e a banda em 2947 cm^{-1} é referente ao estiramento vibracional C – H presentes em polissacarídeos (SARILMISER et al., 2015).

Em 1647 cm^{-1} foi observado uma banda, associada ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ comum em carboidratos.⁸¹ As vibrações de estiramento pertencente às ligações glicosídicas $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ (entre $1120 - 1020\text{ cm}^{-1}$) provinda do anel furano também são observadas no espectro de polímeros do tipo levana.⁸² Neste trabalho, foi possível observar a presença desses picos entre $1097 - 918\text{ cm}^{-1}$ sendo o de maior frequência atribuído ao grupo éter do anel furanosídico, enquanto o de menor frequência refere-se ao da ligação glicosídica (ALLEY, 1988).

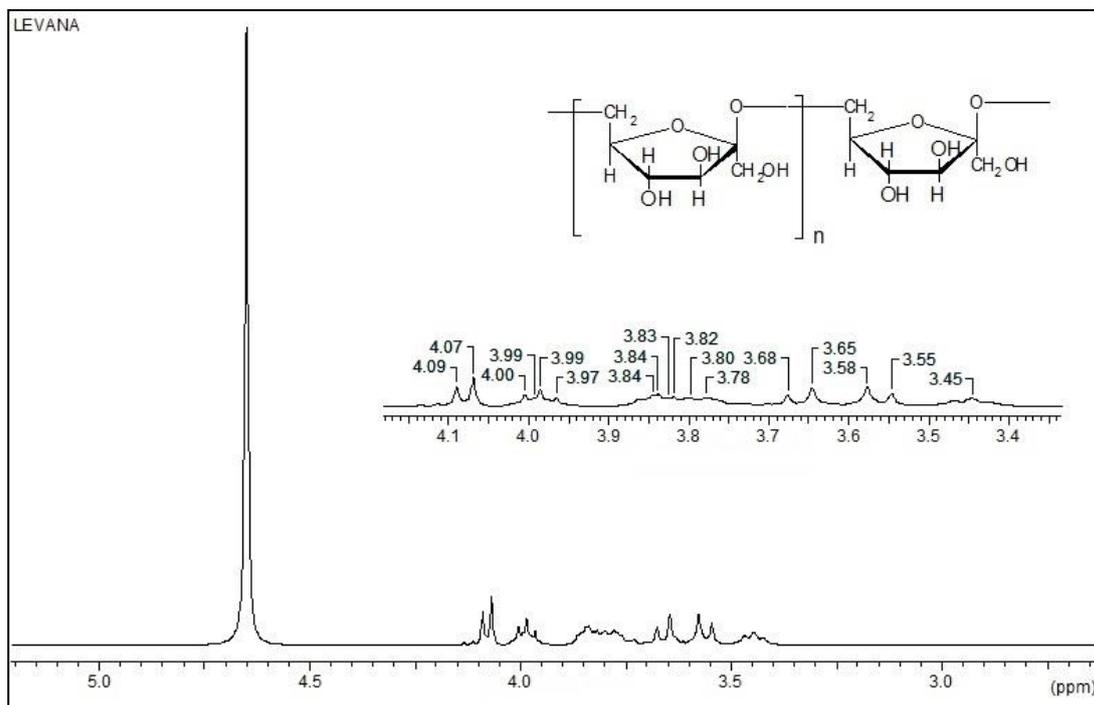
Figura 24 - Espectro de infravermelho da levana F50.



4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

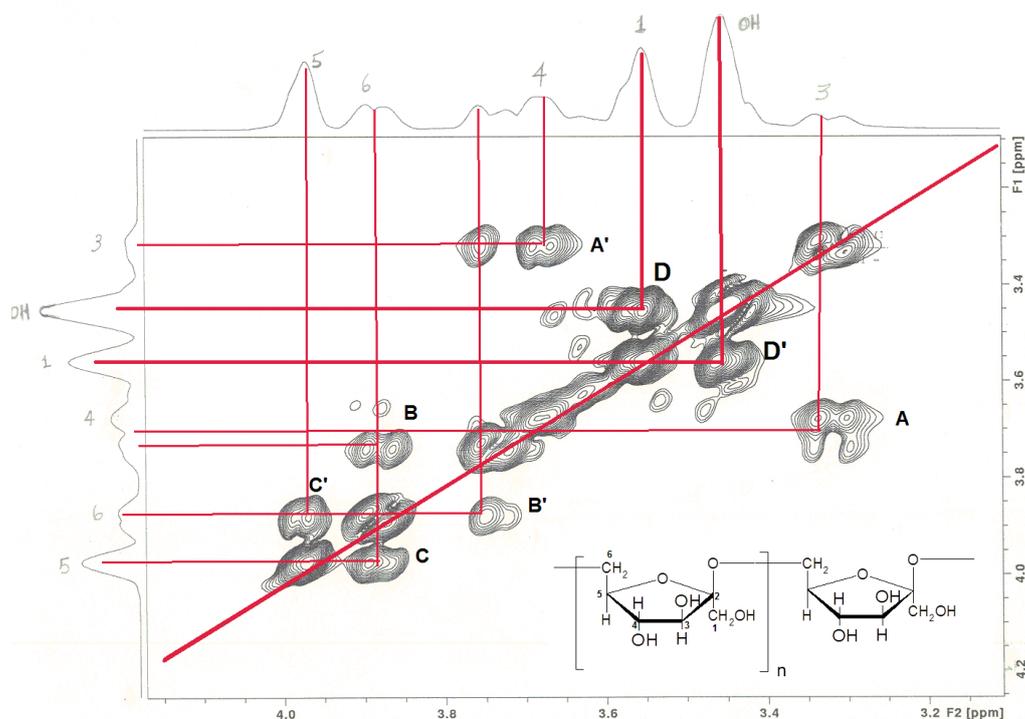
Para uma completa caracterização da matriz em estudo foram realizadas medidas de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . A Figura 25 apresenta o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da F50.

Figura 25 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em D_2O , da levana F50.



Após a análise do espectro de RMN ^1H da levana F50 é possível observar sinais entre 4.2 – 3.2 ppm, referentes aos sete prótons presentes na estrutura da levana (ALLEY, 1988; AMMAR et al., 2002). Para elucidar o acoplamento dos hidrogênios da estrutura fez-se uma análise de correlação homonuclear bidimensional (^1H - ^1H) denominada COSY (do inglês: *Correlation Spectroscopy*) que identifica os hidrogênios acoplados. Nesta análise, foi possível observar as interações entre os hidrogênios dos dois grupos metina (**3** e **4**) em **A**; correlações entre os hidrogênios pertencente ao carbono da ligação glicosídica **6** e os hidrogênios metileno **5** e **4** em **C** e **B**, respectivamente; e as correlações entre os hidrogênios do carbono **1** e os hidrogênios da hidroxila em **D** (Figura 26).

Figura 26 - Espectro de RMN bidimensional (COSY) para a levana F50, em D₂O com a correlação (¹H - ¹H) em linhas vermelhas.



O espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C da levana F50 está mostrado na 27. O espectro de RMN ¹³C apresentou seis picos característicos da matriz de levana quando comparados ao da literatura,⁷⁵ com valores em ppm bem próximos aos citados em Silva (2010), neste trabalho, as atribuições dos picos foram baseadas no deslocamento apresentado em comparação ao descrito na literatura, assim os picos encontrados foram:

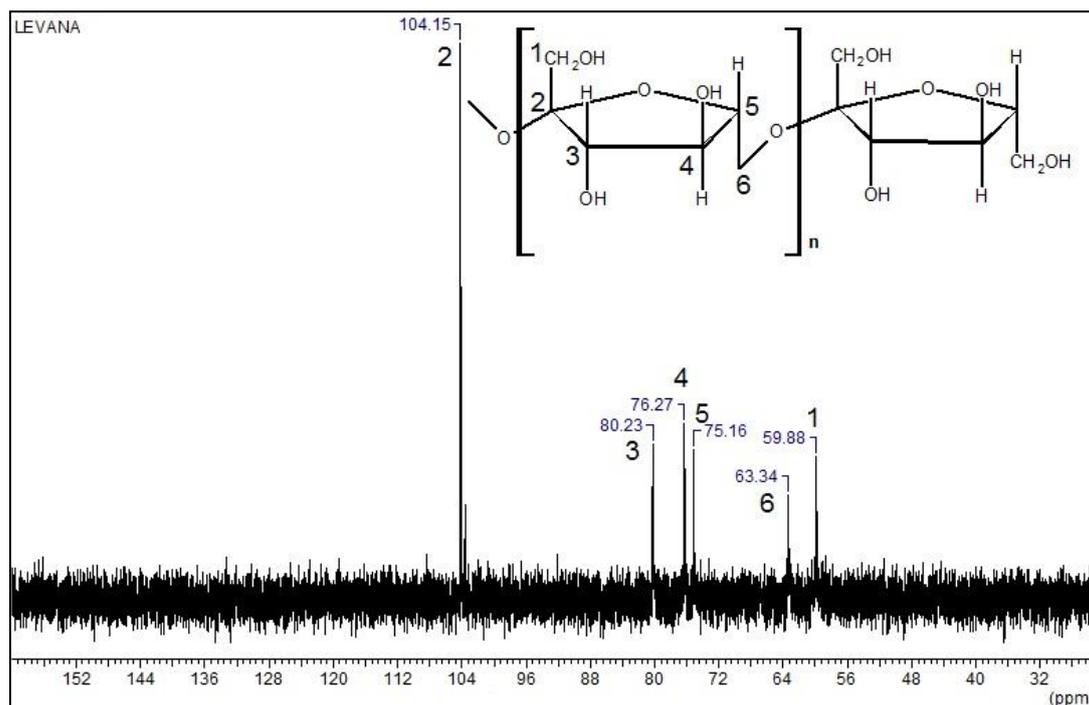
C1 → δ 59,88; referentes ao carbono que apresenta maior blindagem sendo deslocado para a direita.

C2 → δ 104,15; referente ao carbono anomérico (ligado diretamente a dois átomos de oxigênio).

C3, C4 e C5 → δ 76,27, 75,16 e 80,23; referentes aos carbonos do anel furanosídico.

C6 → δ 63,34; referente ao carbono lateral que forma ligação glicosídica.

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) em D_2O , da levana F50.



4.3 NA OXIDAÇÃO DA LEVANA

4.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho da LEVOXI

A oxidação da levana foi realizada com o intuito de facilitar as próximas modificações e foram feitas a 10 e 25%, isto significa que apenas essas percentagens da matriz foram modificadas pela reação de oxidação. Esta precaução é tomada para que não haja uma desativação da atividade biológica da levana, pois caso isso aconteça poderia não haver aquele desejado direcionamento ao tumor, além disso, mantendo a atividade temos a possibilidade de aperfeiçoar o sistema final. A levana utilizada nas modificações com as aminas foi a levana oxidada a 25%.

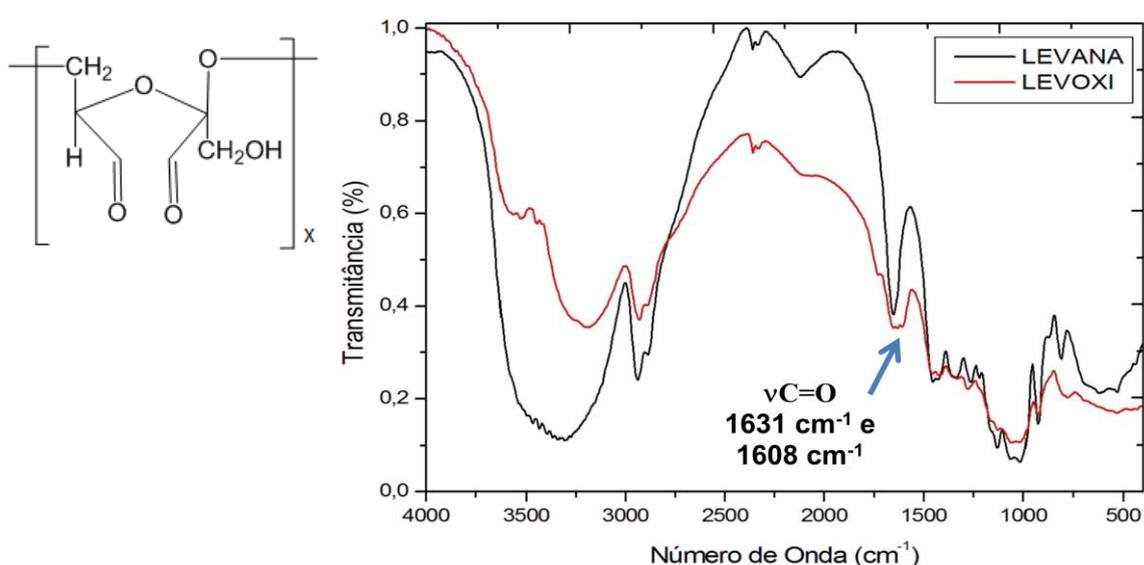
A levana oxidada (LEVOXI) apresentou ainda absorções características da levana, conforme ilustrado na Figura 28, como o estiramento na região de 3207 cm^{-1} decorrente da presença dos grupos OH, a banda em 2923 cm^{-1} referente ao estiramento vibracional C–H, e ainda as vibrações de estiramento pertencente às ligações glicosídicas C–O–C aproximadamente entre $1120 -$

1020 cm^{-1} provinda do anel furano também são observadas no espectro de polímeros do tipo levana (PESSOA et al., 2014).

Na reação de oxidação da levana com o periodato de potássio ocorre a cisão seletiva de ligações químicas entre átomos de carbono das hidroxilas vicinais no anel da frutose, resultando na formação de dois grupos de aldeídos reativos (SARILMISER; ONER, 2014). Assim, na Figura 29, podem ser percebidas duas novas bandas em 1631 e 1608 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo funcional C=O de aldeído que já era esperado em decorrência da oxidação.

Ainda no espectro de infravermelho da LEVOXI / LEVANA, observa-se que o perfil da banda de O–H mudou significativamente, assim pode-se supor que provavelmente a banda antes que foi atribuído apenas às hidroxilas da levana (em 3368 cm^{-1}) era composta de duas absorções distintas, a primeira, localizada próximo a 3200 cm^{-1} referente às hidroxilas da levana (PESSOA et al., 2014) e a segunda associada às ligações de hidrogênio intramolecular (em 3583 cm^{-1}). Assim, com a oxidação essas ligações de hidrogênio se mostraram com absorções menos intensas visualmente nos espectros sobrepostos da Figura 29.

Figura 28 - Espectros de infravermelho da levana F50 e da levana oxidada (LEVOXI) em sobreposição.



4.3.2 Avaliação Quantitativa de Carbonila

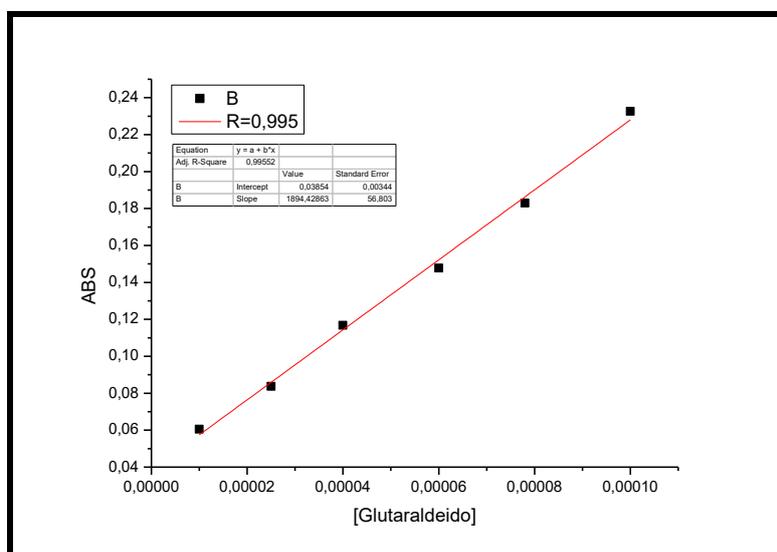
Para a determinação do grau de oxidação das unidades frutósílicas foi utilizado o método colorimétrico de determinação de aldeído, também conhecido por método 2,4-dinitrofenil hidrazina (2,4-DNH), para quantificação espectrofotométrica de carbonilas. Com a finalidade de traçar a curva de calibração foram utilizadas soluções de glutaraldeído com concentrações de 10^{-4} até 10^{-5} mol L⁻¹ (Tabela 7), e medidos seus respectivos espectros de absorção, neste caso foram coletados os máximos em 480 nm.

Tabela 7 - Concentrações das soluções de glutaraldeído e seus respectivos máximos de absorção (ABS) em 480 nm.

[] = concentração da solução de glutaraldeído	ABS
10^{-4}	0,232564
$7,8 \times 10^{-5}$	0,182959
6×10^{-5}	0,147620
4×10^{-5}	0,116741
$2,5 \times 10^{-5}$	0,083634
10^{-5}	0,060449

Na Figura 29 é mostrada a curva de calibração com seu respectivo coeficiente de correlação, sugerindo que nestas concentrações a amostra tem comportamento linear.

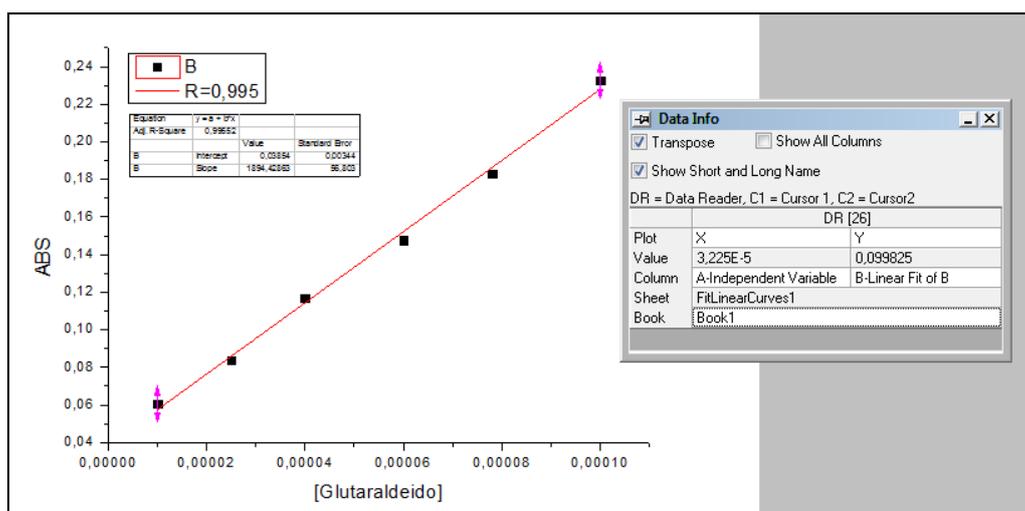
Figura 29 - Gráfico da concentração de glutaraldeído com sua absorbância, monitorada em 480 nm.



Para a quantificação das carbonilas presentes após a síntese de oxidação das unidades frutósídicas, preparou-se 4 amostras da levana oxidada a 25% e 10%. Após reação com a 2,4-DNH foram medidas as absorvâncias cujo máximo monitorado foi em 480 nm.

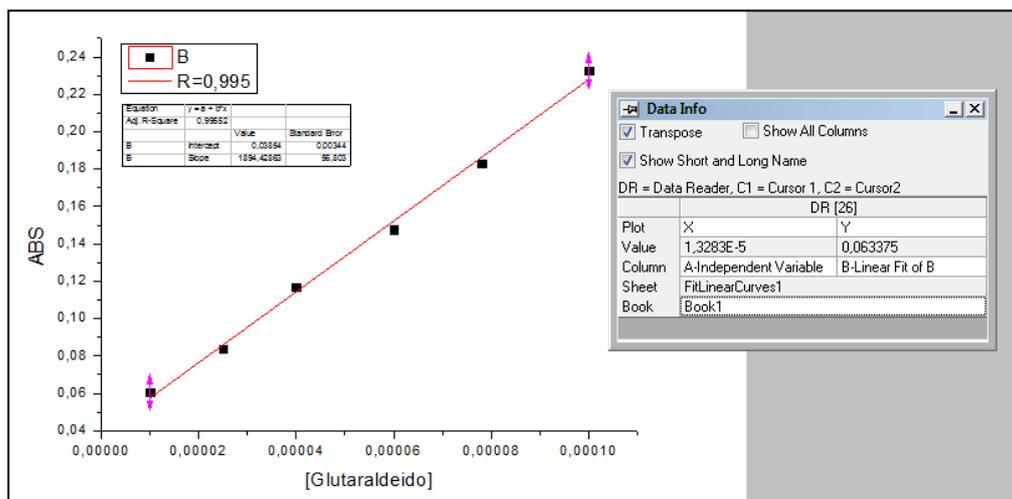
Na síntese a 25%, onde se utilizaram os seguintes parâmetros: 7h de reação, 4 amostras, concentração = $1,46972 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, foram medidos as seguintes absorvâncias: A1 = 0,0998; A2 = 0,0999; A3= 0,0997; A4= 0,0999, com média 0,099825. Este valor deve-se a uma concentração de carbonilas igual a $3,225 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 30). Assim, o percentual de oxidação da levana, partindo de uma reação a 25%, foi 22,025% de oxidação real, baseado no percentual de carbonilas obtidos a partir do método da 2,4-DNH.

Figura 30 - Gráfico de correlação indicando o valor correspondente a uma absorvância de 0,099825.



Para a síntese a 10% foram utilizados os seguintes parâmetros: 7h reação, 4 amostras, concentração = $1,46972 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, as seguintes absorvâncias foram obtidas: A1 = 0,0634; A2 = 0,0633; A3= 0,0635; A4= 0,0633 cuja média foi 0,063375 (Figura 31). Assim, o percentual de oxidação da levana, partindo de uma reação a 10% é de 8,9969% de oxidação real baseado no percentual de carbonilas obtidos a partir do método da 2,4-DNH.

Figura 31 - Gráfico de correlação indicando o valor correspondente a uma absorvância de 0,063375.



4.4 NAS MODIFICAÇÕES NA MATRIZ DA LEVANA OXIDADA COM AMINAS

Foi necessário fazer modificações além da oxidação para que a matriz da levana e a platina (II) tivessem mais afinidade. Sendo assim, foram testadas três modificações utilizando como fonte do agrupamento amino às substâncias: etilenodiamina, glicina e 3-amino-1,2-propanediol.

A levana oxidada modificada com agrupamentos amino foi avaliada qualitativamente através do revelador de amina *p*-dimetilaminobenzaldeído obtendo resultados positivos para os três compostos. E ainda foi caracterizada pelas espectroscopias de infravermelho e ressonância magnética nuclear.

A seguir serão apresentados os resultados individuais das três modificações, codificadas por Levoxietileno, Levoxiglicina e Levoxiamino. Lembrando que, espera-se que as modificações apresentem modos vibracionais característicos da levana, por se tratar de uma modificação parcial de 25% da matriz polimérica.

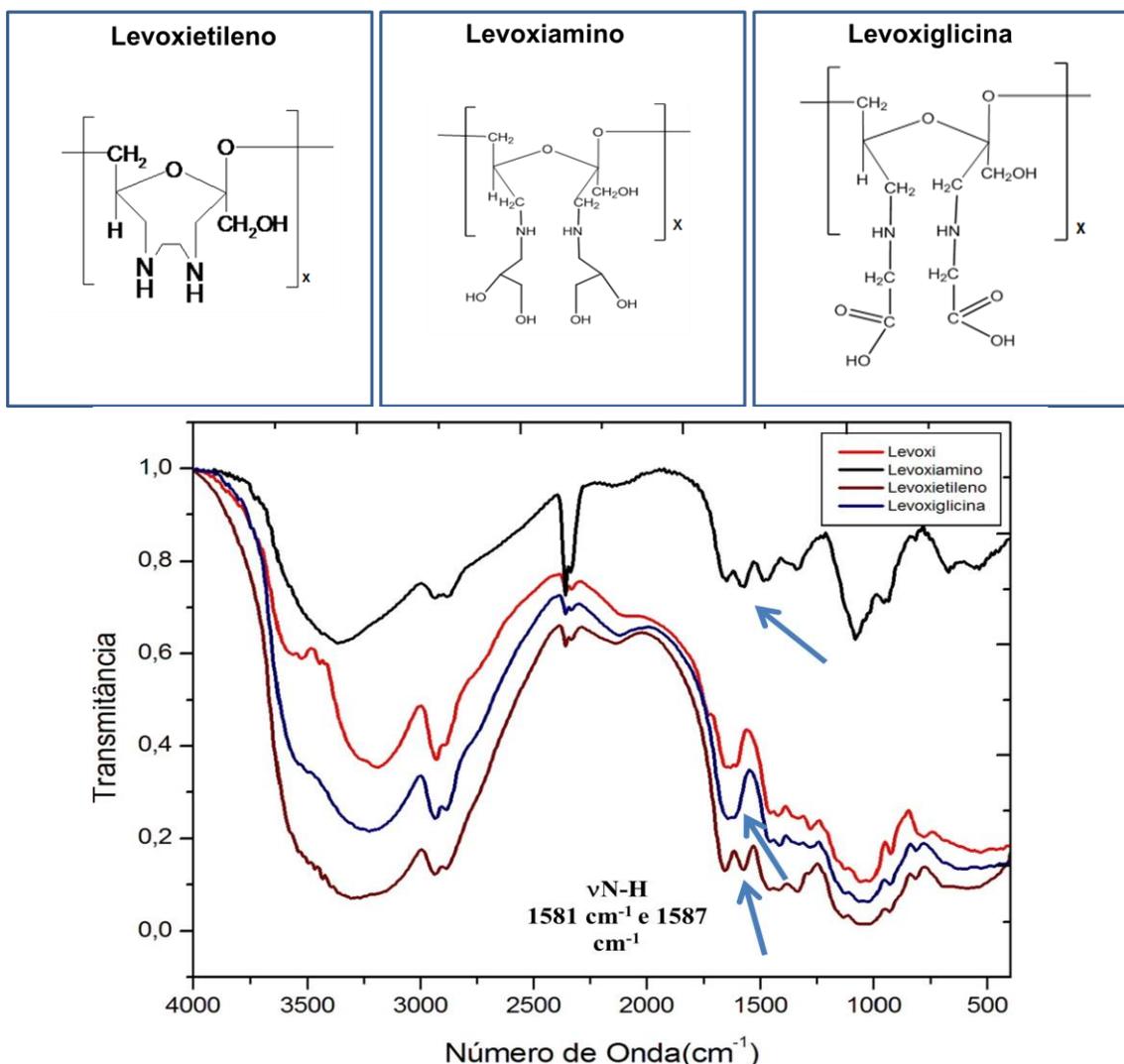
4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho: Levoxielileno, Levoxiciglicina e Levoxiamino

No espectro do Levoxielileno (linha marrom) da Figura 33 esperava-se que o espectro apresentasse algum modo vibracional ativo no infravermelho referente ao grupo amino adicionado na matriz. E de fato foi possível observar uma nova banda em aproximadamente 1587 cm^{-1} que pode ser atribuída ao dobramento N – H e outra banda na faixa de $3497\text{-}3669\text{ cm}^{-1}$ estiramento simétrico e assimétrico N – H. Observa-se ainda uma nova banda entre $1000\text{ - }1114\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída à vibração da ligação C – N, indicando à incorporação de nitrogênio a matriz de levana oxidada (PAVIA et al., 2010; ANTONINO, 2007).

No espectro do Levoxiciglicina (linha azul) da Figura 33, observaram-se uma nova banda na faixa de $3470\text{-}3626\text{ cm}^{-1}$ estiramento simétrico e assimétrico N – H. Na Figura 33 observa-se mais nitidamente uma nova banda entre $1000\text{ - }1149\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída à vibração da ligação C – N, corroborando para a hipótese de incorporação de nitrogênio a matriz de levana oxidada (POLI et al., 2009; SARILMISER et al., 2015).

Ainda na Figura 33, no espectro do Levoxiamino (linha preta) foi observado o surgimento de algumas bandas em $\sim 3387\text{ cm}^{-1}$ estiramento simétrico e assimétrico N – H também foi possível observar uma banda em $\sim 1581\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuída ao dobramento N – H. Pode-se ainda atribuir ao estiramento observado em $\sim 1081\text{ cm}^{-1}$ a vibração da ligação C – N indicando à incorporação de nitrogênio a matriz de levana oxidada (POLI et al., 2009; SARILMISER et al., 2015).

Figura 32 – Espectro de infravermelho do Levoxietileno, Levoxiamino e Levoxiglicina com estruturas químicas.



4.4.2 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos compostos: Levoxietileno, Levoxiglicina e Levoxiamino.

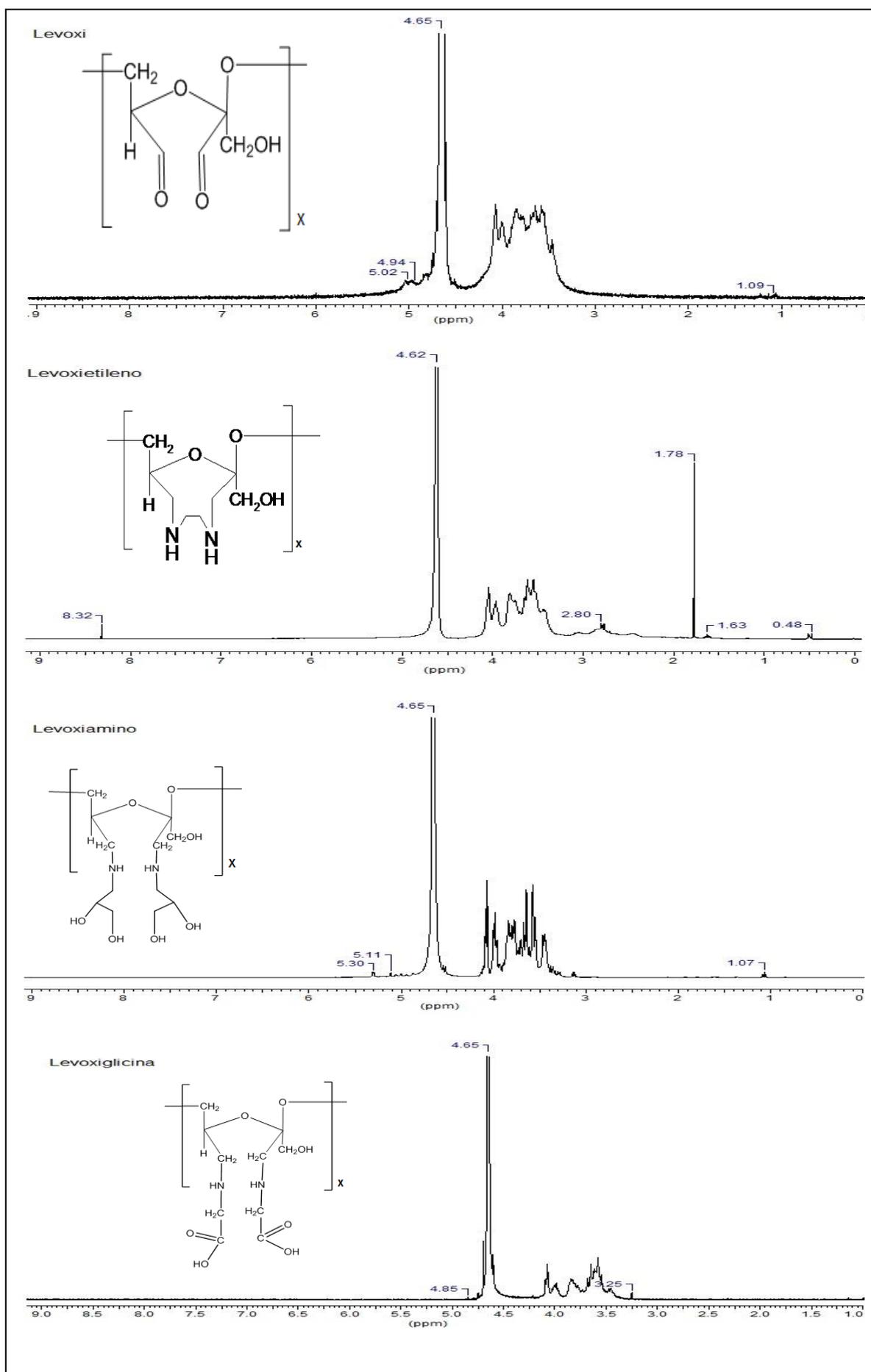
Analisando os espectros de RMN ^1H , na Figura 34, para os compostos modificados com agrupamentos amino, foi possível observar que alguns sinais permaneceram com o mesmo valor de deslocamento químico (4.2-3.2 ppm) que possuía antes modificação. Porém, sabe-se que mesmo se essa área do espectro não aparentar alterações, pode haver novos sinais superpostos nessa região. Então, a estratégia foi selecionar novos sinais do espectro com deslocamento químico diferentes dos existentes na matriz oxidada pra realizar atribuições dos prótons de interesse baseado na literatura.

O espectro de RMN ^1H do Levoxieleno, apresentou alguns sinais novos com deslocamento de 1,78 ppm, que podem ser associados aos prótons do CH_2 provindos da antiga molécula de etilenodiamina e um sinal em 8,32 ppm que podem ser associados aos prótons do grupo amino (RICARDO, 2005).

O espectro de RMN ^1H do Levoxi-amino também apresentou um sinal bastante deslocado característico dos prótons de CH_2 , com valor próximo ao valor de deslocamento químico mostrado na literatura⁸³, provavelmente o grupo que está ligado entre as hidroxilas da levana aminada modificada com 3-amino-1,2-propanediol. No deslocamento químico 5,30 ppm pode-se supor que seja os sinais do próton do grupo amina que podem apresentar deslocados do seu valor apresentado na literatura (GABANO et al., 2006) devido o ambiente químico repleto de hidroxilas.

O espectro de RMN ^1H do Levoxiclicina contém poucas informações se tornando difícil a associação de sinais, já que os valores dos sinais de prótons apresentaram semelhantes ao da matriz oxidada.

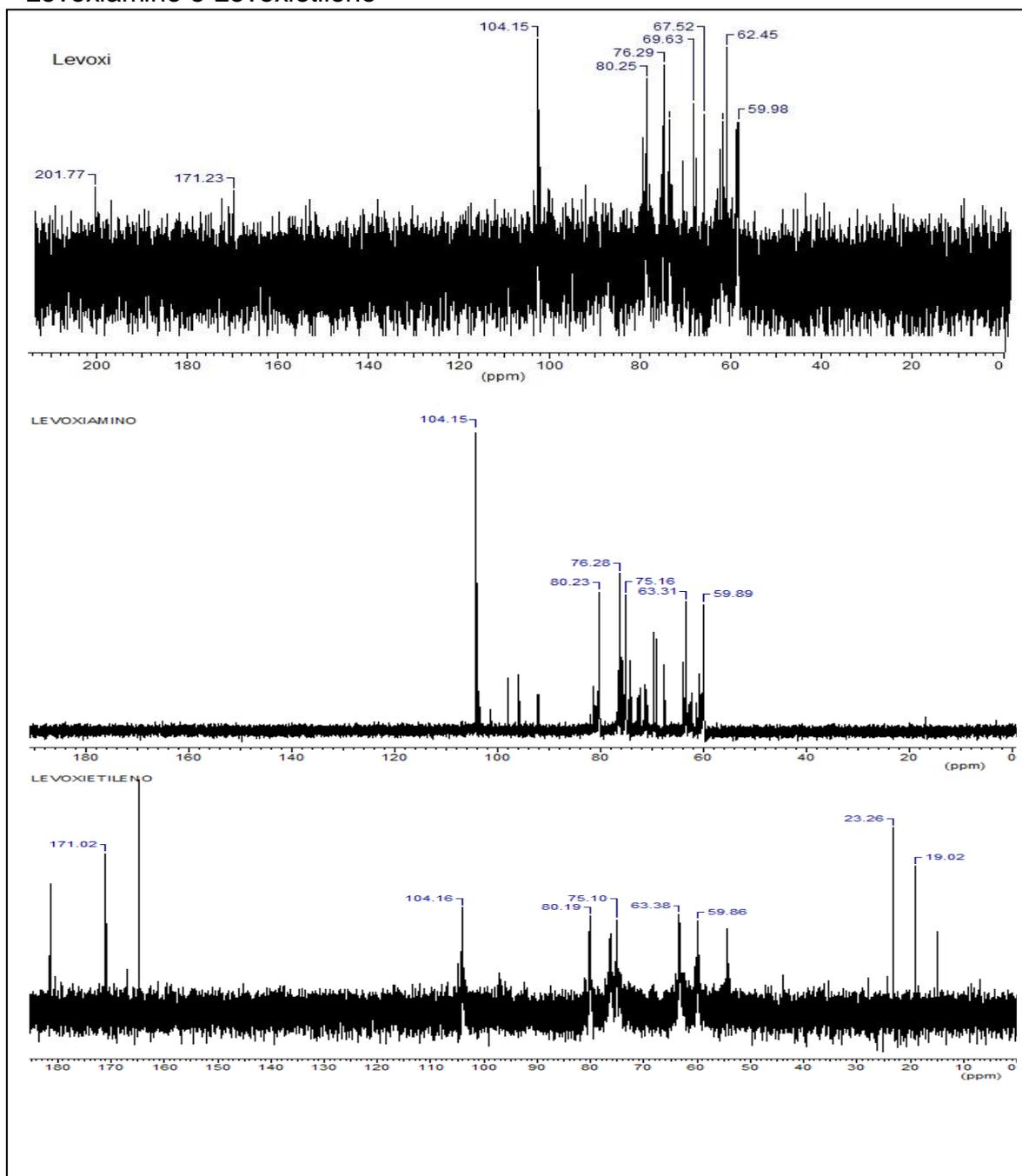
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em D_2O , da levana modificada: Levoxi, Levoxi-etileno, Levoxi-amino e Levoxi-glicina.



4.4.3 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C dos compostos: Levoxietileno, Levoxiglicina e Levoxiamino.

Assim, como espectro de RMN ^1H , os espectros de RMN de ^{13}C , apresentaram-se com sinais referentes à matriz original e novos sinais que podem ser atribuídos a matriz modificada (Figura 34). Sendo os sinais da matriz original podendo ser identificado pelos valores dos deslocamentos, aproximadamente: δ 59,88, δ 104,15, δ 76,27, δ 75,16, δ 80,23 e δ 63,34⁷⁵. Neste trabalho não foi apresentado o RMN ^{13}C do LEVOXIGLICINA, pois o mesmo mostrou-se muito ruidoso, em diferentes análises realizadas.

Figura 34- Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz) em D_2O , da levana modificada Levoxiamino e Levoxietileno



4.5 NA INCORPORAÇÃO DOS ÍONS Pt^{2+} A MATRIZ DO LEVANA MODIFICADA

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^{195}Pt dos compostos: LevoxielilenoPt, LevoxiciglicinaPt e LevoxiaminoPt

Analisando os espectros dos compostos LevoxielilenoPt, LevoxiciglicinaPt e LevoxiaminoPt, encontrados na Figura 35 observou-se que todos apresentaram um pico próximo ao deslocamento de -1600 ppm, possivelmente referente ao pico de íons Platina II que ressonam em baixas frequências (Figura 36). Infere-se que houve deslocamento de frequência após complexação dos íons platina e as levana aminadas, sendo provável também uma mudança no ambiente químico deduzido pelo valor encontrado dos deslocamentos químicos que se refere à platina II quando ligados a grupos amino e água (SARILMISER; ONER, 2014; BANCROFT et al., 1990). Assim, pode-se inferir que a platina foi incorporada a matriz polimérica.

Figura 35 - Espectro de RMN ^{195}Pt em D_2O , da levana modificada LevoxiaminoPt, LevoxietilenoPt e LevoxiglicinaPt.

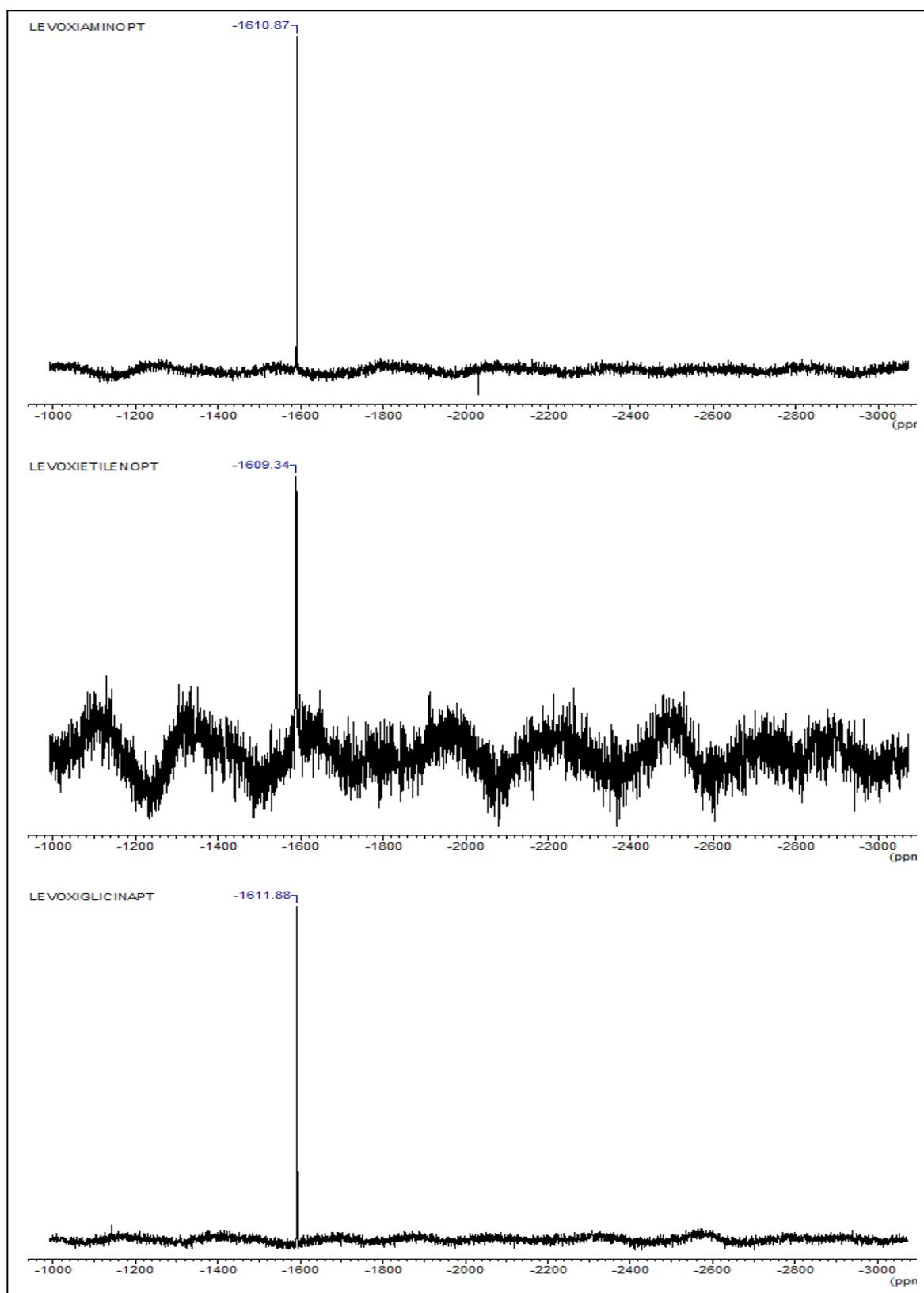
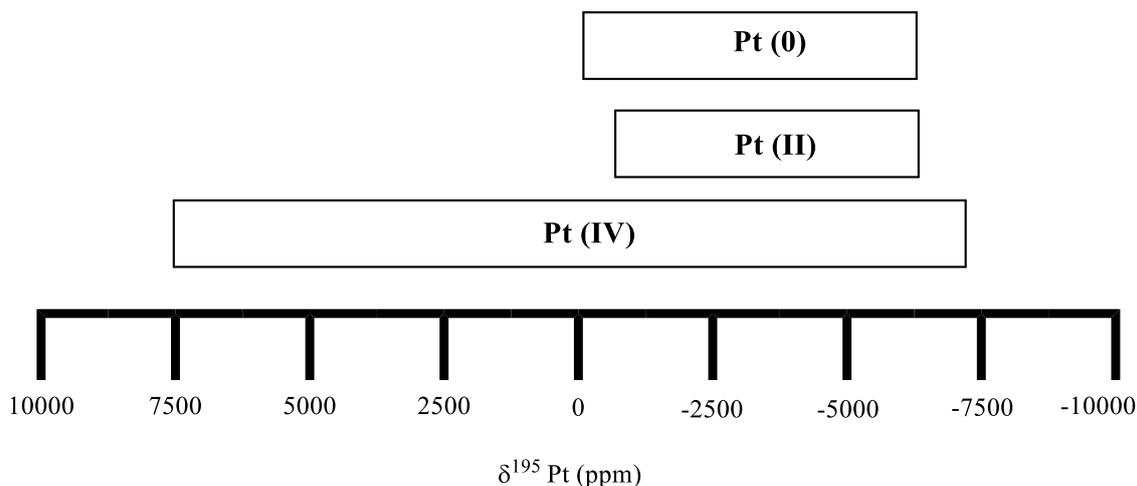


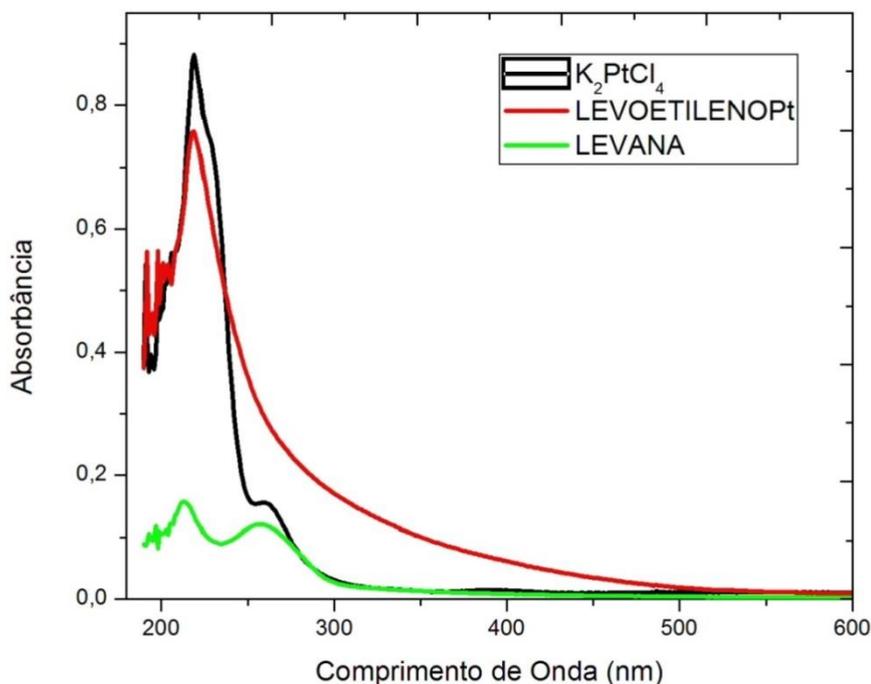
Figura 36 - Janela espectral aproximada para os deslocamentos químicos de ^{195}Pt , em diferentes estados de oxidação (ISMAIL et al., 1980).



4.5.2 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV-Vis do LevoxielienoPt

A espectroscopia de absorção eletrônica tem uma vasta aplicação para identificação e determinação de inúmeras espécies inorgânicas e orgânicas. A absorvância de uma solução é geralmente estudada no comprimento de onda no qual ela é máxima. Na Figura 37, o espectro de absorção eletrônica do tetracloroplatinato de potássio, da matriz de levana e do complexo de platina LevoxielienoPt estão sobrepostos. Pode-se observar que houve uma mudança no perfil das bandas do LevoxielienoPt tanto quando há a comparação com o espectro da matriz da levana quanto com relação ao tetracloroplatinato de potássio. Além do desaparecimento das bandas características da levana e do tetracloroplatinato de potássio na região de 270 nm (aproximadamente), também houve um deslocamento da banda mais intensa do complexo sugerindo uma possível complexação.

Figura 37 - Espectro de absorção eletrônica da matriz da levana, do hexacloroplatinato e do complexo LEVOXIETILENOPt.



4.5.3 Espectroscopia de Absorção Atômica do LevoxietilenoPt

A espectroscopia de absorção atômica é um tipo de análise utilizada para determinar qualitativa e quantitativamente a presença de metais em uma determinada amostra, tem como princípio a absorção da radiação ultravioleta por parte dos elétrons, devidamente excitados por uma fonte de energia. Para a determinação quantitativa de platina contida na amostra, foi preciso construir uma curva analítica (Figura 38) com soluções padrão de platina (0, 10, 50, 75 e 100 ppm), para cada concentração foi obtido um valor de absorbância, monitorado em 265,9 nm, correspondente como mostrado na Tabela 8.

Figura 38 - Gráfico da concentração de soluções padrão de platina (0, 10, 50, 75 e 100 ppm) com sua absorvância, monitorada em 265,9 nm.

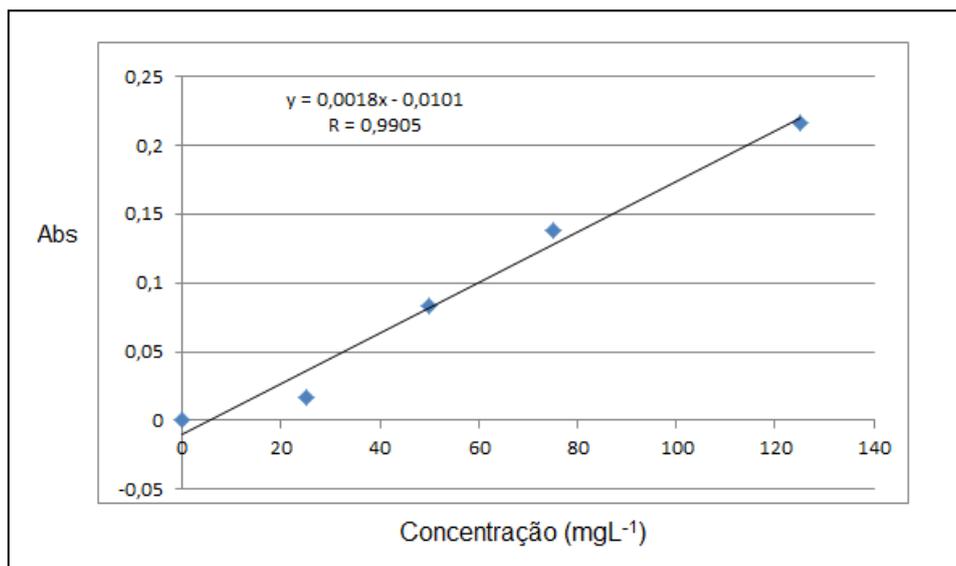


Tabela 8 - Valores de concentração dos padrões usados e das absorvâncias obtidas na medida de espectroscopia de absorção atômica.

Concentração (ppm)	Absorvância
0	0
10	0,0167
50	0,0837
75	0,1386
100	0,2167

Para a solução contendo o complexo LevoxietilenoPt foram obtidas as seguintes absorvâncias: A1=0,1503 e A2=0,1495 cuja a média foi 0,1499 e a concentração correspondente a média foi de 88 mol L⁻¹, sendo correspondente a 2,17% de Pt²⁺ no composto sintetizado sendo esperado 3,85% em massa de platina II no composto.

4.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho do LevoxielilenoPt, LevoxiaminoPt e LevoxiclicinaPt

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho foi realizada com o intuito de percebermos se houve alguma mudança espectral que nos sugerisse uma complexação entre o ligante Levoxielileno e o íon Pt^{2+} . Na Figura 39 foi percebido que o espectro do Levoxielileno (linha preta) possuía uma banda em 1587 cm^{-1} característico do estiramento $C=N$ e que este estiramento sofreu um sensível deslocamento para a direita após a reação com os íons Pt^{2+} , sugerindo que houve uma complexação.

Na Figura 40, analisou-se a forma espectral do LevoxiaminoPt e do Levoxiamino e percebeu-se que uma banda em 1592 cm^{-1} que provavelmente pode ser associada ao estiramento $C=N$ que deve ter se deslocado por ter se complexado aos íons platina. E por fim, na Figura 39, não foi encontrado mudanças relevantes que ajude a hipótese de complexação.

Figura 39 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxielilenoPt e do ligante Levoxielileno.

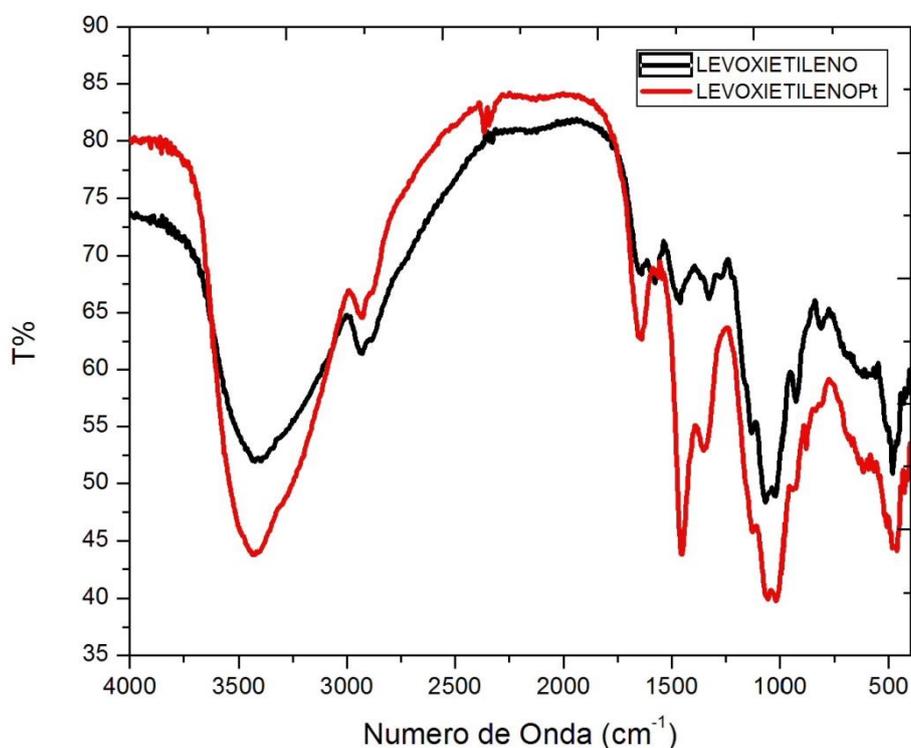


Figura 40 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxiaminoPt e do ligante Levoxiamino.

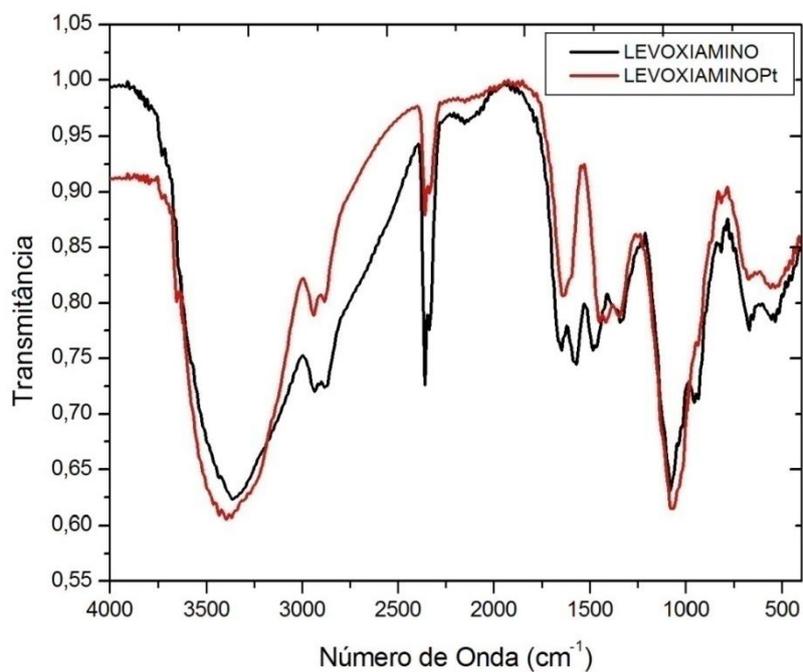
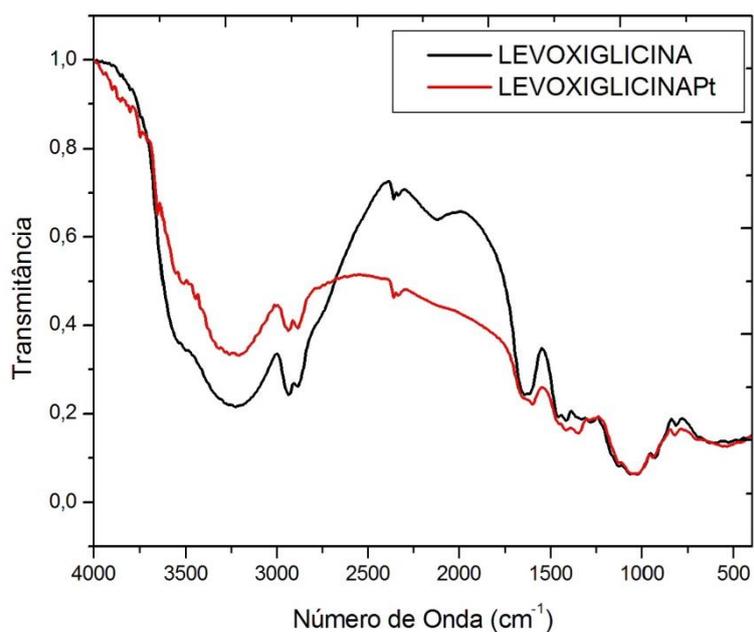


Figura 41 - Sobreposição dos espectros de infravermelho do complexo LevoxiglicinaPt e do ligante Levoxiglicina.



4.6 NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.6.1 Avaliação da Citotoxicidade em Células Tumorais

Baseando-se em Rodrigues et. al., 2014, o potencial das amostras testadas pode ser avaliado em uma escala de Citotoxicidade. Então, as amostras com atividade, apresentam 95 a 100 % de inibição de crescimento celular, as amostras com atividade moderada, apresentam inibição variando de 70 a 90% e amostras sem atividade, apresentam inibição de crescimento menor que 50 % (RODRIGUES, 2014).

Foi avaliado o potencial de inibição de crescimento celular de oito amostras listadas na Tabela 9, frente às linhagens de células: HEP-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão humano), MCF-7(câncer de mama humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT- 116 (carcinoma colorretal) e Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda).

Foi testado em várias concentrações (0,098 – 25µg/mL) para a determinação da concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo (CI_{50}). A doxorubicina (0,009 - 1.25 µg/mL) foi utilizada como padrão. A CI_{50} e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPadPrism7.0*.

Os compostos testados não apresentaram efeito citotóxico. A maior porcentagem de inibição de crescimento celular foi apresentada pelo Levoxietileno (55,3%) (Tabela 9), frente às células de leucemia promielocítica aguda. Apesar de não possuir atividade alta ou moderada alguns compostos modificados apresentaram uma porcentagem de inibição maior do que a matriz pura, indicando que a modificação química pode contribuir com um aumento de inibição desse sistema frente a células tumorais.

Tabela 9 – Porcentagem de inibição de crescimento celular das amostras avaliadas.

Amostras	Células / % de inibição					
	HL-60	NCI-H292	HCT-116	Molt-4	Hep-2	MCF-7
Levana	15,7	27,6	0,0	10,8	-	-
Levoxí	0,0	26,3	0,0	28,5		
Levoetileno	33,9	31,7	17,8	13,1	13,7	9,8
Levoxi-etilenoPt	55,3	39,6	0,0	14,2	43,7	25,14
Levoxi-amino	0,0	10,1	6,6	0,0	-	-
Levoxi-aminoPt	0,0	17,7	7,0	10,5	-	-
Levoxi-glicina	0,0	13,5	24,9	-		
Levoxi-glicinaPt	12,5	24,8	0,0	22,3	-	-
Doxirrubicina	97,5	71,2	25,1	95,3	52,6	73,2

4.6.2 Avaliação de Atividade Antimicrobiana

Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) estão apresentados na Tabela 10. Apenas os compostos Levoxi-amino e Levoxi-etileno apresentaram concentrações capazes de inibir o crescimento de bactérias, 625 e 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para a avaliação da CMI feita para os fungos, os resultados foram bastante satisfatórios. Os compostos Levoxí, Levoxi-etileno, Levoxi-amino e Levoxi-glicina apresentaram-se capazes de inibir o crescimento dos fungos com CMI variando entre 78,1 a 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os compostos modificados que apresentaram melhores resultados quando comparados a matriz de levana pura foram o Levoxi-etileno que inibiu o fungo *Candida albicans* com uma concentração de 78,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já os Levoxí, Levoxi-amino e Levoxi-glicina inibiram eficientemente a *Candida Krusei* ambos com a concentração de 78,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim, revelando-se antimicrobianos em potencial.

Tabela 10 – Concentração mínima inibitória da levana e das levanas modificadas.

		Concentração Mínima Inibitória – CMI (µg/mL)				
Microrganismos		Levana	Levoxil	Levoxiamino	Levoxietileno	Levoxiglicina
Bactérias Gram Positivas	<i>S.aureus</i>	2500	2500	2500	2500	2500
	<i>B subtilis</i>	2500	2500	2500	2500	2500
	<i>E.faecalis</i>	2500	2500	2500	2500	2500
Bactéria Gram Negativas	<i>P. aeruginosa</i>	2500	2500	2500	2500	2500
	<i>E. coli</i>	2500	2500	625	1250	2500
Fungos	<i>C. albicans</i>	2500	2500	156,2	78,1	2500
	<i>C. utilis</i>	2500	2500	312,5	312,5	2500
	<i>C. krusei</i>	2500	78,1	78,1	1250	78,1

5 CONCLUSÕES

- Os complexos de hexacloroplatinato e tetracloroplatinato de potássio foram caracterizados por difratometria de raios-X apresentando coerência nos perfis difratométrico das substâncias contidas no banco de dados do equipamento.
- A levana foi produzida, fracionada e caracterizada por infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C apresentando bandas e picos característicos à estrutura do polissacarídeo.
- A oxidação da levana ocorreu de forma reprodutível e através do teste de determinação de aldeído na levana foi possível identificar o percentual real de oxidação, quando se avaliou a reação a 25 %, tivemos aproximadamente 22 % de oxidação real na matriz polimérica e para uma síntese a 10 % obteve-se um percentual de oxidação real de aproximadamente 9 %.
- A modificação da levana foi bem sucedida nas três modificações, os produtos das modificações foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho obtendo mudanças perceptíveis no espectro de infravermelho e por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C apresentando novos sinais sugerindo a incorporação dos grupos de interesse.
- Os complexos de platina foram caracterizados com RMN ^{195}Pt apresentando um pico coincidente em todos os espectros em aproximadamente ~1600 ppm referente a íons platina II.
- Os compostos foram submetidos a ensaios biológicos pra avaliar possíveis atividades biológicas, foram feitos avaliação de citotoxicidade em células tumorais e determinação da concentração mínima inibitória – CMI para inibição de células de bactérias e fungos. Obtendo resultados satisfatórios para ambos os testes.
- Assim, no teste *in vitro* de citotoxicidade de células tumorais, o LevoxietilenoPt apresentou a maior inibição de crescimento (55,3%), frente às células de leucemia promielocítica aguda.
- Com relação aos testes de avaliação antimicrobiana os melhores resultados foram oriundos do Levoxi, Levoxiamino e Levoxiglina que inibiram eficientemente a *Candida Krusei* ambos com a concentração de 78,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6 PESPECTIVAS

- Realizar a **quantificação** de platina nos complexos: LevoxiclicinaPt e Levoxi-aminoPt.
- Realizar teste de **toxicidade aguda**.
- Realizar teste ***in vivo*** nos complexos sintetizados para avaliar seu comportamento frente a tumores.

REFERÊNCIAS

- ALDERDEN, R. A.; MELLOR, H. R.; HAMBLEY, T. W. CALLAGHAN, R. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 71, 1136.
- ALLEN, P.Z.; BOWEN, W.H. *Archives of Oral Biology*, v. 35, n.1, p. 55-62, 1990.
- ALLEY, M. C. et al. *Cancer Research*, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- AMMAR, Y.B., MATSUBARA, T., ITO, K., IIZUKA, M., LIMPASENI, T., PONGSAWASDI, P., MINAMIURA, N. *J. of biotechnology* 99 (2002) 111-119.
- ANTONINO, N.A., Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. 2007. 15f Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.
- ARIS, S. M.; FARRELL, N. P. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009, 1293.
- ARIS, S. M.; GEWIRTZ, D. A.; RYAN, J. J.; KNOTT, K. M.; FARRELL, N. P. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1749.
- B. M. STILL, P. G. A. KUMAR, J. R. A. WRIGHT, W. S. *Price, Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 665-667
- BANCROFT, D.P., LEPRE, C. A., LIPPARD, S. J.. *J. Am. Chem. SOC.* 1990, 11 2, 6860-687.
- BARUAH, H.; BARRY, C. G.; BIERBACH, U. *CURR. Top. Med. Chem.* 2004, 4, 1537.
- BEZERRA, GISELLE B., ARAÚJO, JANETE M., BELIAN, MÔNICA F., SILVA, WAGNER E. DA RAMOS, CLÉCIO S.. *Quim. Nova*, Vol. 40, No. 9, 998-1002, 2017.
- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. *Introdução á Química de Alimentos*, 2 ed., cap. 1. São Paulo, Varela Ltda. 1989.
- BRABEC, V.; KASPARKOVA, J.; VRANA, O.; NOVAKOVA, O.; COX, J. W.; QU, Y.; FARRELL, N. *Biochemistry* 1999, 38, 6781.
- BROW, J. M.; PLEATMAN C. R.; BIERBACH, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 2953.

- CALAZANS, G. M. T. Produção de levana para uso clínico. Tese de Doutorado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.
- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANCA, F. P. *Biotechnology Letters*, London, v. 19, n. 1, p. 19-21, 1997.
- CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O.; SOUSA, M. F. V. Q.; MARÇAL, S. F.; LOPES, C. E. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 32 (1989) 4:631-636.
- CEPEDA, V.; FUERTES, M. A.; CASTILLA, G.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PÉREZ, J. M. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2007, 7, 3.
- Clinical and Laboratory Standards Institute; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.
- COLUCCIA, M.; NATILE, G. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2007, 7, 111.
- FARRELL N. *Met. Ions. Biol. Syst.* 2004, 42, 251.
- FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. *Chem. Rev.* 2003, 103, 645.
- GABANO, E., MARENGO E., BOBBA, M., ROBOTTI, E., CASSINO, C., BOTTA, M., OSELLA D. *Coordination Chemistry Reviews* 250 (2006) 2158–2174.
- GLINSKY, G.V., PRICE, J.E., GLINSKY, V.V., MOSSINE, V.V., KIRIAKOVA, G., METCALF, J.B. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5319-24.
- HAN, Y.W. *Advances in Applied Microbiology*, v. 35, p. 171-194, Academic Press, inc. 1990.
- HARRIS, A. L.; RYAN J. J.; FARRELL, N. *Mol. Pharmacol.* 2006, 69, 666.
- HIGBY, D. J.; WALLACE, H. J.; ALBERT, D. J.; HOLLAND, J. F. *Cancer* 1974, 33, 1219.
- HOLMES, R. J.; MCKEAGE, M. J.; MURRAY, V.; DENNY W. A.; MCFADYEN, W. D. *J. Inorg. Biochem.* 2001, 85, 209.
- http://patoneoplasia.blogspot.com.br/2013_06_01_archive.html - Acessado em Dezembro de 2016.
- <http://qnint.sbg.org.br> – Acessado em Dezembro de 2016.
- <http://www.chemcases.com> – Acessado em Dezembro de 2016 (Adaptado).

- <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> - Acessado em Dezembro de 2016.
- ISMAIL, I. M., KERRISON, S. J. S., SADLER, P. J.. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1980) 1261-1262.
- JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. *Chem Rev.* 1999, 99, 2467.
- KALINOWSKA-LIS, U.; OCHOCKI, J.; MATLAWSKA-WASOWSKA, K. *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 1328.
- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 5, n. 4, p. 265-270, 1993.
- KASPARKOVA, J.; ZEHNULOVA, J.; FARRELL N.; BRABEC, V. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 48076.
- KAUFFMAN, G. B. *Platinum Metals Rev.* 2010, 54, 250.
- KAUFFMAN, G. B.; TETER, L. A. *Inorg. Syn.* 1963, 7, 232-6.
- KEITH, J.; WILEY, B.; BALL, D.; ARCIDIACONO, S.; ZORFASS, D.; MAYER, J.; KAPLAN, D. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 38, n. 5, p. 557-560, 1991.
- KELLAND, L. *Nature Rev. Cancer* 2007, 7, 573.
- KELLAND, L. R.; BARNARD, C. F. J.; MELLISH, K. J.; JONES, M.; GODDARD, P. M.; VALENTI, M. BRYANT, A.; MURRER, B. A.; HARRAP, K. R. *Cancer Res.* 1994, 54, 5618.
- KELLAND, L. R.; FARRELL, N. P.; *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, 1^a ed., New Jersey, p. 3-4, 2000.
- KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. *Chem. Rev.* 2009, 109, 4911.
- KOSTOVA, I. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2006, 1, 1.
- LAPPIN, G. R.; CLARK, L. C. *Analytical Chemistry*. 1951.
- LEHNIGER, A.L. *Princípios da Bioquímica*, 8 ed.; Sarvier Editora, Ltda. São Paulo, 1993.
- LIPPERT, B.; *Cisplatin : chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Zürich, 1999, p. 478.
- MANGRUM, J. B.; FARRELL. N. P. *Chem. Commun.* 2010, 46, 6640.
- MANZOTTI, C.; PRATESI, G.; MENTA, E.; DI DOMENICO, R.; CAVALLETTI, E.; FIEBIG, H. H.; KELLAND, L. R.; FARRELL, N.; POLIZZI, D.; SUPINO, R.; PEZZONI, G.; ZUNINO, F. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6, 2626
- MAYS, T. D.; DALLY, E. L. *Patent U. S.*, n.4, p.769-254, 1988.

- MOSMANN, T. *J Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983
- MUSETTI, C.; NAZAROV, A. A.; FARRELL, N. P.; SISSI, C. *ChemMedChem* 2011, 6, 1283.
- Oner, E.T., Hernandez, L., Combie, J. *Biotechnology Advances*. Vol. 34, 2016, P. 827-844.
- PASETTO, L. M.; D'ANDREA, M. R.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006, 60, 59.
- PAVIA, D.L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. *Introdução a Espectroscopia*. 4ªed., São Paulo, Cengage Learning, 2010.
- PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D.; *Coord. Chem. Rev.* 2014, 301, 24.
- PEYRONE, M. *Ann.chim. et phys.* 1844, 12, 193.
- POLI, A., KAZAK, H., GÜRLEYENDAG, B., TOMMONARO, G., PIERETTI, G., ÖNER, E. T., NICOLAUS, B. *Carbohydrate Polymers* 78 (2009) 651–657.
- QU, Y.; SCARSDALE, N. J.; TRAN, M. -C.; FARRELL, N. P. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003, 8, 19.
- QU. Y.; HARRIS, A.; HEGMANS, A.; PETZ, A.; KABOLIZADEH, P.; PENAZOVA H.; FARRELL, N. *J. Inorg. Biochem.* 2004, 98, 1591.
- RAMBERG, L. *Z. anorg. Chem.* 1913, 88, 33.
- REISS, M.; HARTMEIER, W. *Food Biotechnology*, New York, v. 4, p. 69-75, 1990
- RICARDO, J. *Substituição Nucleofílica Aromática em 1,2-dicloro-4,5-dinitrobenzeno com aminas*. 2005. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.
- RODRIGUES, F. A. R. et al. *Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents*. *ChemBiol Drug Des* , v. 83, p. 126-131, 2014.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 1347.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. *Nature* 1965, 205, 698.
- SAFAEI, R.; HOWELL, S. B. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005, 53, 13.
- SARILMISER, H. K., ATES, O., OZDEMIR, G., ARGAS, K. Y., ONER, E. T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. VOL. 119 No. 4, 455e463, 2015.

- SARILMISER, H.K., ONER, E. T. *Biochemical Engineering Journal* 92 (2014) 28–34
- SILVA, W.E., Nova geração de agentes antineoplásicos conjugados. 2010. 96f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.
- SLOVIN, S. F., RAGUPATHI, G., ADLURI, S., UNGERS, G., TERRY, K., KIM, S., SPASSOVA, M., BORNMANN, W. G., FAZZARI, M., DANTIS, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:5710–5715.
- SRIKANTH, R., REDDY, C.H.S.S., SIDDARTHA, G. RAMAIAH, M. J., UPPULURI, K.B. *Carbohydrate Polymers.* Vol. 120, 2015, P. 102-114.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and establish application of microbial polysaccharides, *Trends in Biotechnology*, v.16, n.1, p.41-46, 1998.
- SWINGS, J.; DELEY, J. *Washington*, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. *Brazilian Journal of Microbiology*, Sao Paulo, v. 34, p. 242-244, 2003.
- TEMPLE, M. D.; MCFADYEN, W. D.; HOLMES, R. J.; DENNY W. A.; MURRAY, V. *Biochemistry* 2000, 39, 5593.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.. McGraw-Hill, New York, 1998
- WANG, X.; GUO, Z. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2007, 7, 19.
- WANG, X.; GUO, Z. *Dalton Trans.* 2008, 1521.
- WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. *Dalton Trans.* 2010, 39, 8113.
- WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2451.
- YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. *Journal of Nutritional Biochemistry*, New York, v. 10, n.1, p. 13-18, 1999.

APÊNDICE A – PATENTE DEPOSITADA

09/01/2018 870180002034
16:53

29409161710318499

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 000501 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 09/01/2018 às 16:53, Petição 870180002034

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24134488000108
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50670-901
País: BRASIL
Telefone: (81) 212 68001
Fax:
Email: pitt.positiva@ufpe.br

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 01263896002108
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Avenida Professor Luiz Freire, 01, Cidade Universitária
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50740-545
País: BRASIL
Telefone: (81) 333 47200
Fax:
Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/01/2018 às 16:53, Petição 870180002034

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA

Resumo: "LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA". A presente patente de invenção consiste no desenvolvimento de novos materiais com atividade fungicida; à base de levana modificada quimicamente com grupamentos $R_iNH(CH_2)_2NH_iR$; R_iNHCH_2COOH e $R_iNHCH_2CH(OH)CH_2(OH)$, onde R = levana; aplicados ao controle microbiológico de fungos nocivos ao ser humano. A avaliação do potencial fungicida foi feita frente aos fungos do gênero *Candida* e variáveis: *albicans*, *utilis* e *krusei*; e os resultados de concentração mínima inibitória para as levanas modificadas ficaram entre 78,1 – 1250 µg/mL; sendo consideradas ativas e moderadamente ativas. A presente invenção apresenta diversas soluções acerca dos problemas apresentados na maioria dos fungicidas comercial ou sintéticos, como, a toxicidade e solubilidade em água.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/01/2018 às 16:53, Petição 870180002034