



Universidade Federal de Pernambuco - UFPE  
Centro Acadêmico de Vitória - CAV  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e  
Plasticidade Fenotípica - PPGNAFPF



**MARIANA DE MELO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E  
DE DOSES REPETIDAS POR 28 DIAS DO COMPOSTO À BASE DE VANÁDIO  
(Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] – V15 – EM CAMUNDONGOS**

Vitória de Santo Antão

2022



Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Centro Acadêmico de Vitória - CAV

Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade

Fenotípica – PPGNAFPF



**MARIANA DE MELO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E  
DE DOSES REPETIDAS POR 28 DIAS DO COMPOSTO À BASE DE VANÁDIO  
(Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] – V15 – EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestra.

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira**

Vitória de Santo Antão

2022

Catálogo na Fonte  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB-4/2005

B238a Barbosa, Mariana de Melo.  
Avaliação da toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias do composto à base de vanádio (Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] - V15 - em camundongos/ Mariana de Melo Barbosa. - Vitória de Santo Antão, 2022.  
61 f.; il.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2022.  
Inclui referências e anexos.

1. Compostos de Vanádio. 2. Testes de Toxicidade Aguda. 3. Efeitos Colaterais e Reações Adversas Relacionados a Medicamentos. I. Lira, Eduardo Carvalho (Orientador). II. Título.

363.1791 CDD (23. ed.) BIBCAV/UFPE - 116/2022

**MARIANA DE MELO BARBOSA**

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DE DOSES REPETIDAS POR 28 DIAS DO COMPOSTO À BASE DE VANÁDIO (Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] – V15 – EM CAMUNDONGOS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra.

Área de concentração: Bases Experimentais e Clínicas da Plasticidade Fenotípica

Aprovada em: 31/05/2022

**Participação por Videoconferência**

---

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira  
Universidade Federal de Pernambuco**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Participação por Videoconferência**

---

**Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira  
Universidade Federal de Pernambuco**

**Participação por Videoconferência**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira  
Universidade Federal de Pernambuco**

**Participação por Videoconferência**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelly Cristiny Pereira  
Universidade Federal de Pernambuco**

Dedico este trabalho a Deus.  
E a minha família, por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita bondade me permitiu chegar até aqui, me deu força, coragem e guiou meus passos durante minha jornada acadêmica.

Aos meus pais, pelo apoio e suporte. Obrigada mãe, por toda dedicação, compreensão, conselhos e amor incondicional.

A minha irmã que sempre me incentivou e torceu por mim na conquista desse sonho.

A Roberto, que se dispôs a me acompanhar ao laboratório nos finais de semana e feriados. Obrigada pela companhia, parceria e suporte.

Ao Prof. Jeymesson Vieira e a Doutoranda Luzia Abílio, pela atenção e ajuda na preparação e análise da parte histológica.

Agradeço ao professor Leucio Duarte, que abriu as portas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal (LFFR) nos dando suporte para realização deste trabalho. Obrigada pela paciência, atenção e disponibilidade.

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo - LNEM pelo suporte para a realização desta pesquisa.

A Dr<sup>a</sup> Debbie C. Crans por disponibilizar o V15 para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Dr<sup>a</sup> Lidiane Lima, da UFRPE por toda ajuda no protocolo experimental, pela paciência e disponibilidade em me auxiliar.

Aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo (LNEM), Ângela, Elifrances, Eucilene e Júnior, com vocês com certeza a caminhada até aqui ficou mais leve.

Eucilene Batista, pela indispensável ajuda durante os experimentos, pela troca de conhecimento e por ser sempre solícita. Obrigada pela colaboração.

Ao meu orientador, Professor Doutor Eduardo Carvalho Lira, pela oportunidade concedida, por ter acreditado no meu potencial, pelas orientações, paciência e ensinamentos que foram cruciais para a realização deste trabalho e contribuíram para minha formação profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos, que possibilitou a realização desse trabalho.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por proporcionar um ambiente de aprendizagem que contribuiu para o meu desenvolvimento profissional.

Meus sinceros agradecimentos a todos que acreditaram em mim e contribuíram de forma direta ou indireta para concretização desse sonho.

## RESUMO

As atividades antidiabética, antibacteriana, antifúngica, anticâncer, antiparasitária, cardio e neuroprotetora do vanádio (V) têm sido extensamente documentadas. Entretanto, a toxicidade dos compostos limita o uso terapêutico. Neste sentido, a síntese de novos compostos de V que preservem os efeitos terapêuticos com redução da toxicidade é importante para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o combate a doenças de alta prevalência, como o diabetes e o câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias, de um novo composto a base de vanádio, o  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}]$  ou V15 em camundongos. Camundongos *Swiss* fêmeas, entre 06 e 09 semanas de vida, massa corporal ( $30 \pm 3\text{g}$ ), foram utilizados para avaliação da toxicidade oral aguda. Os animais foram divididos em grupo controle (C, n=3) tratado com salina 0.9% (1ml/100g), tratados com dose única oral de 50mg/kg de V15 (V15<sub>50</sub>, n=3), tratados com dose única oral de 300mg/kg de V15 (V15<sub>300</sub>, n=3) e dose única oral de 2000mg/kg de V15 (V15<sub>2.000</sub>, n=3). A massa corporal, o consumo hídrico e alimentar foram quantificados diariamente durante 14 dias. Ao término deste experimento, os animais foram eutanasiados para coleta sanguínea para análise do perfil bioquímico e quantificação do peso dos órgãos. Camundongos *Swiss* fêmeas (n=5 por grupo) e machos (n=5 por grupo), entre 06 e 09 semanas de vida, massa corporal ( $30 \pm 3\text{g}$ ) foram utilizados para avaliação da toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias. Os animais foram distribuídos em grupo controle (C, n=10) tratado somente com salina 0.9%, (1ml/100g), por via oral, por gavagem, diariamente. E tratados diariamente com V15, nas doses de 25mg/kg (V15<sub>25</sub>, n=10), 50mg/kg (V15<sub>50</sub>, n=10) e 300mg/kg (V15<sub>300</sub>, n=10), por via oral, por gavagem, dissolvida em salina 0,9% (1ml/100g). A massa corporal, o consumo hídrico e alimentar foram quantificados diariamente por 28 dias. Ao término deste experimento, os animais foram eutanasiados para coleta e quantificação do peso de órgãos e tecidos, coleta de sangue para dosagem de parâmetros hepáticos e renais, perfil bioquímico e hematológico. A cada 7 dias, a temperatura retal e a glicemia pós-prandial foram monitoradas. Amostras de tecido hepático e renal foram coletados e armazenadas em formalina para análise histopatológica. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via. Os ensaios de toxicidade oral aguda, não indicaram alterações comportamentais ou toxicidade nos animais nas doses avaliadas. Na toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias, o V15 provocou, transitoriamente, alterações na massa corporal, ingestão hídrica e alimentar. A exposição ao V15 provocou alterações estruturais a nível hepático e renal, também levou a alterações nos parâmetros bioquímicos com elevação de ALT (48,1%  $p \leq 0,05$ ) e (115%  $p \leq 0,05$ ) nos grupos de machos e fêmeas tratados com a dose de 50mg/kg. Ademais, o V15 induziu mortalidade e sinais de toxicidade em todas as doses administradas no estudo de toxicidade por doses repetidas por 28 dias. Em conclusão, o composto a base de vanádio -V15, apesar de agudamente parecer ser tolerável para o animal, no estudo de doses repetidas, mostrou-se tóxico. Em doses  $\geq 25\text{mg/kg}$  foram observados efeitos colaterais, mortalidade e prejuízos à função hepática nos animais em decorrência ao tratamento.

Palavras-chave: vanádio; toxicidade oral aguda; toxicidade por doses repetidas por 28 dias; polioxovanadatos; compostos de vanádio.

## ABSTRACT

The antidiabetic, antibacterial, antifungal, anticancer, antiparasitic, cardio and neuroprotective activities of vanadium(V) have been extensively documented. However, the toxicity of the compounds limits the therapeutic use. In this sense, the synthesis of new V compounds that preserve the therapeutic effects with reduced toxicity is important for the development of new pharmacological therapies to combat highly prevalent diseases such as diabetes and cancer. The objective of this work was to evaluate the acute oral toxicity and repeated doses for 28 days of a new vanadium-based compound, (Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] or V15 in mice. Female Swiss mice, between 06 and 09 weeks of age, body mass (30 ± 3g), were used to assess acute oral toxicity. The animals were divided into a control group (C, n=3) treated with 0.9% saline (1ml/100g), treated with a single oral dose of 50mg/kg of V15 (V1550, n=3), treated with a single oral dose of 300mg/kg of V15 (V15300, n=3) and a single oral dose of 2000mg/kg of V15 (V152,000, n=3). Body mass, water and food consumption were quantified daily for 14 days. At the end of this experiment, the animals were euthanized for blood collection for analysis of the biochemical profile and quantification of the weight of the organs. Female (n=5 per group) and male (n=5 per group) Swiss mice, between 06 and 09 weeks of age, body mass (30 ± 3g) were used to assess oral toxicity of repeated doses for 28 days. The animals were assigned to a control group (C, n=10) treated only with 0.9% saline (1ml/100g), orally, by gavage, daily. And treated daily with V15, at doses of 25mg/kg (V1525, n=10), 50mg/kg (V1550, n=10) and 300mg/kg (V15300, n=10), orally, by gavage, dissolved in 0.9% saline (1ml/100g). Body mass, water and food consumption were quantified daily for 28 days. At the end of this experiment, the animals were euthanized for collection and quantification of the weight of organs and tissues, blood collection for measurement of hepatic and renal parameters, biochemical and hematological profile. Every 7 days, rectal temperature and postprandial blood glucose were monitored. Liver and kidney tissue samples were collected and stored in formalin for histopathological analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance. Acute oral toxicity tests did not indicate behavioral changes or toxicity in animals at the doses evaluated. In oral toxicity of repeated doses for 28 days, V15 transiently caused changes in body mass, water and food intake. Exposure to V15 caused structural changes at the hepatic and renal level, also led to changes in biochemical parameters with elevation of ALT (48.1% p≤0.05) and (115% p≤0.05) in the male and females treated with a dose of 50mg/kg. In addition, V15 induced mortality and signs of toxicity at all doses administered in the 28-day repeat dose toxicity study. In conclusion, the vanadium-based compound -V15, despite acutely appearing to be tolerable for the animal, in the repeated dose study, V15, proved to be toxic, at doses ≥25mg/kg side effects, mortality and harm were observed. to liver function in animals as a result of treatment.

Keywords: vanadium; acute oral toxicity; twenty-eight days repeated dose toxicity; polyoxovanadates; vanadium compounds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação da estrutura da molecular do $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$ – V15 .....	17
<b>Figura 2</b> – Representação das formas mais comuns existentes de vanádio (V) .....	18
<b>Figura 3</b> - Representação da captação e distribuição de compostos de vanádio no organismo .....	19
<b>Figura 4</b> – Representação do desenho experimental da toxicidade oral aguda em camundongos, baseado no Guideline 423 (OECD, 2001) .....	27
<b>Figura 5</b> - Representação do desenho experimental da toxicidade oral por doses repetidas por 28 dias em camundongos, baseado no Guideline 407 (OECD, 2001) .....	28
<b>Figura 6</b> – Ganho de peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) em camundongos fêmeas tratados com V15 ao longo dos 14 dias de tratamento .....	33
<b>Figura 7</b> – Curva de sobrevivência dos animais tratados com V15 por gavagem no 28º dia do tratamento .....	35
<b>Figura 8</b> - Ganho de peso corporal (A, B), ingestão alimentar (C, D) e ingestão hídrica (E, F) em camundongos machos e fêmeas tratados com V15 ao longo dos 28 dias de tratamento .....	37
<b>Figura 9</b> – Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias sobre a glicemia (A, B) e temperatura (C, D) de camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas .....	42
<b>Figura 10</b> – Análise histopatológica do fígado de camundongos machos e fêmeas tratados com V15.....	44
<b>Figura 11</b> – Análise histopatológica dos rins de camundongos machos e fêmeas tratados com V15 .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Ganho de peso corporal total (g), ingestão de alimentos (g) e ingestão hídrica (ml) em camundongos fêmeas tratados com V15 ao longo dos 14 dias de tratamento .....	34
<b>Tabela 2</b> - Pesos relativos dos órgãos (mm/mg de peso corporal) de camundongos fêmeas tratados com V15 no 14º dia .....	34
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas tratados com V15 no 14º dia .....	35
<b>Tabela 4</b> - Ganho de peso corporal total (g), ingestão de alimentos (g) e ingestão hídrica (ml) em camundongos machos e fêmeas tratados com V15 ao longo dos 28 dias de tratamento .....	38
<b>Tabela 5</b> - Pesos relativos dos órgãos (mm/mg de peso corporal) de camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas tratados com V15 no 28º dia .....	38
<b>Tabela 6</b> - Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias nos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas .....	39
<b>Tabela 7</b> - Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias nos parâmetros hematológicos de camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas .....	40
<b>Tabela 8</b> - Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias sobre os parâmetros do estresse oxidativo de camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância;

CAT – Catalase;

CEUA – Comissão de ética no uso animal;

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média;

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

DM – Diabetes mellitus;

EPM – Erro padrão da média;

GSH – Glutathione reduzida;

GSSG – Glutathione oxidada;

Hb – Hemoglobina;

HCM - Hemoglobina corpuscular média;

HE – Hematoxilina-eosina;

Ht – Hematócrito;

I.P – Intraperitoneal.

LE – Leucócitos;

Kg - Quilogramas;

LYM - Contagem de linfócitos;

M – Média;

MDA – Malonaldeído;

Mg – Miligramas;

OCDE – Organização para cooperação e desenvolvimento econômico;

POVs – Polioxovanadatos;

RBC - Contagem de glóbulos vermelhos;

RDW - Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos;

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase;

TBA – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

V- Vanádio;

VCM - Volume corpuscular médio.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Vanádio: um breve histórico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Distribuição do vanádio na natureza</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Absorção e metabolismo dos compostos de vanádio</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 Aplicações e Efeitos Biológicos dos Compostos de Vanádio</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 Efeitos Tóxicos dos Compostos de Vanádio</b> .....	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1 Composto a base de Vanádio</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2 Animais e aspectos éticos</b> .....	<b>25</b>
<b>5.3 Desenho experimental toxicidade oral aguda</b> .....	<b>26</b>
<b>5.4 Desenho experimental toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias</b> .....	<b>27</b>
<b>5.4.1 Curva de sobrevivência</b> .....	<b>27</b>
<b>5.5 Avaliação da toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias</b> .....	<b>27</b>
<b>5.6 Análise do perfil bioquímico</b> .....	<b>29</b>
<b>5.7 Análise do perfil Hematológico</b> .....	<b>29</b>
<b>5.8 Análise dos Marcadores de Estresse Oxidativo</b> .....	<b>29</b>
5.8.1 Determinação da concentração de malonaldeído (MDA) .....	30
5.8.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	30
5.8.3 Determinação da Atividade da Catalase (CAT) .....	30
5.8.4 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e Razão glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG).....	31
5.8.5 Determinação dos Níveis de Nitrito .....	31
<b>5.10 Análises Histopatológicas</b> .....	<b>31</b>
<b>5.11 Análise estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6.1 Efeito da Toxicidade Aguda do Composto a base de Vanádio - V15 em camundongos</b> .....	<b>33</b>
<b>6.2 Efeito da Toxicidade por doses repetidas durante 28 dias do V15 em camundongos <i>swiss</i> machos e fêmeas</b> .....	<b>35</b>

<b>6.3 Efeito da toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias sobre a massa corporal, ingestão alimentar e hídrica de camundongos tratados com V15 .....</b>	<b>36</b>
<b>6.4 Análise histopatológica de tecido Renal e Hepático de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas tratados com V15.....</b>	<b>43</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) .....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos biológicos do vanádio (V), um metal de transição amplamente distribuído na natureza, são estudados desde o século XIX. Entretanto, após a descoberta da capacidade inibitória do V sobre diferentes classes de proteínas fosfatases em meados da década de 1980, as pesquisas biomédicas sobre os possíveis efeitos deste metal no tratamento do diabetes *mellitus* (DM) se intensificaram (LEVINA; LAY, 2017).

O V estimula a captação e a utilização de glicose em adipócitos isolados, assim como aumenta a glicogênese em diafragma e fígado de ratos, além de reduzir a neoglicogênese hepática em modelos murinos (SCHECHETER; KARLISH 1980), o que sugere um efeito semelhante à insulina (TOLMAN *et al.*, 1979). Além disso, animais diabéticos tipo II (DM2) tratados com V e insulina mostraram que o metal potencializa o efeito da insulina na melhora do perfil metabólico e no estado inflamatório (BIN-JALIAH *et al.*, 2018), assim como camundongos diabéticos tipo I tratados com oxovanádio melhoraram o perfil metabólico e previnem comorbidades induzidas pelo estresse glico-oxidativo típico do DM (BAYRAK *et al.*, 2021). Além destas ações, os efeitos antivirais, antiparasitários, antifúngicos, antibacterianos, antineoplásticos, cardio e neuroprotetores tem sido documentado em compostos derivados do vanádio, como os polioxovanadatos (POVs) (SCIBIOR *et al.*, 2020; AURELIANO; GUMEROVA; SCIORTINO *et al.*, 2021). Avaliações *in vitro* com linhagens tumorais como MGC803 (linhagem de tumor gástrico), MCF7 (linhagem de tumor de mama) e HepG2 (linhagem de hepatocarcinoma humano) incubadas com complexo de V mostraram efeito antitumorais animadores deste metal (LU *et al.*, 2019). Os efeitos antitumorais se correlacionam com a intensa produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo V, o que por sua vez estimula vias intracelulares responsáveis pela ativação das caspases e apoptose (KORBECKL *et al.*, 2012, PESSOA *et al.*, 2015, CUNHA-DE-PÁDUA *et al.*, 2017). Em conjunto, os compostos de V parecem promissores para o tratamento de doenças de alta prevalência como DM e câncer.

Infelizmente, o uso terapêutico do V e seus derivados é limitado pela toxicidade naturalmente presente nestes compostos. O primeiro relato de toxicidade em animais induzido pelo V é de 1876 (SCIBIOR *et al.*, 2020). Em determinadas condições, o V atua como uma agente fortemente oxidante, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e desintegração de membranas celulares, desnaturação de proteínas e degradação do DNA (SCIBIOR *et al.*,

2020). Além disso, o V pode reduzir o conteúdo de tióis e, portanto, prejudicar o estado antioxidante celular determinando alterações na disponibilidade de outros metais de transição que podem se acumular em órgãos como fígado e rins gerando hepato e nefrotoxicidade (SCIBIOR *et al.*, 2019). Além disso, são claras as demonstrações dos efeitos tóxicos deste metal de transição sobre as funções reprodutivas, como atrofia de testículos, epidídimos e vesícula seminal de animais tratados com metavanadato de amônio (200mg/kg) ou metavanadato de sódio (1mg/kg) (MORGAN; EL-TAWIL, 2003; VIJAYA *et al.*, 2015). Nas fêmeas essas repercussões são menos conhecidas, entretanto, Shirastava *et al* (2011) demonstraram que o uso de vanádio por ratos fêmeas lactantes causou degenerações importantes no útero e ovários.

Em altas concentrações, o V pode induzir apoptose celular (EVANGELOU *et al.*, 2002). Embora se compreenda que diferentes condições como composição da dieta, tipo de composto de V (inorgânico ou orgânico), ligantes associados, valência, dose e tempo de exposição, além de sensibilidade individual influenciam a toxicidade do V (SCIBIOR *et al.*, 2020), os mecanismos da toxicidade deste metal ainda não são totalmente conhecidos. Desta forma, é limitante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na química do V, o conhecimento da possível toxicidade do complexo de V proposto.

Considerando o potencial farmacoterapêutico dos compostos de vanádio, busca-se desenvolver novos compostos à base de vanádio com maior potência terapêutica e menor efeito adverso e/ou tóxico possível. Diante disto, o presente estudo busca avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias em camundongos, de um novo composto a base de vanádio, pertencente a classe dos polioxovanadatos, o (Me<sub>4</sub>N)<sub>6</sub>[V<sub>15</sub>O<sub>36</sub>Cl] ou V15, um vanadato de valência mista com possível potencial biológico como agente antineoplásico, mas de toxicidade ainda desconhecida.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Vanádio: um breve histórico

O vanádio foi descoberto pela primeira vez em 1801, no mineral vanadinita, pelo químico e mineralogista espanhol Don Andrés Manuel Del Río, no México (DEL CARPIO *et al.*, 2018; TRIPATHI; MANI; PAL, 2018; REHDER, 2016). Del Río, nomeou o metal recém encontrado de Pancrômio, pelo aspecto policromático de seus compostos, mais tarde passou a chama-lo, Eritônio, pela coloração vermelha de seus sais quando aquecido. Apesar de sua descoberta, o vanádio não foi identificado em 1801, pois, acreditava-se que, aquele metal era uma forma impura do cromo e não um novo elemento, como Del Río havia relatado (DEL CARPIO *et al.*, 2018; CINTAS, 2004).

Trinta anos depois, em 1831, foi redescoberto e identificado pelo químico sueco Nils Gabriel Sefstrom (IMTIAZ *et al.*, 2015; CINTAS 2004). Sefstrom, observou que quando estavam em solução, os compostos do metal apresentavam belíssimas cores, diante de tamanha beleza, foi lhe dado o nome de *Vanadis*, uma homenagem a deusa escandinava da juventude, beleza e fertilidade (PEIXOTO, 2006; CRANS; GAMBINO; ETCHEVERRY, 2019). O vanádio foi isolado pela primeira vez, em 1867, pelo químico inglês Henry Enfield Roscoe, que reduziu o dicloreto de vanádio ( $VCl_2$ ) com hidrogênio. Alguns anos depois, em 1925, foi a vez dos químicos americanos John Wesley Marden e Malcolm N. Rich que conseguiram reduzir o pentóxido de vanádio ( $V_2O_5$ ) com o cálcio, obtendo o vanádio considerado puro, cerca de 99,7% (MOTTA, 2006).

### 2.2 Propriedades Químicas do vanádio

O vanádio, número atômico 23, peso atômico 50,94, pertence ao grupo 5 da tabela periódica, é um metal de transição amplamente distribuído na natureza, sendo considerado o 22º elemento mais abundante na crosta terrestre (PESSOA *et al.*, 2015; ROY *et al.*, 2015; SHECHTER *et al.*, 2003). Os compostos de vanádio classificam-se em cinco categorias, as quais incluem os sais (como os metavanadatos, ortovanadatos e o sulfato de oxidovanádio), compostos de coordenação de oxidovanádio, complexos de peroxovanádio, compostos de coordenação conjugados e polioxovanadatos (TRIPATHI; MANI; PAL; 2018; LIMA *et al.*, 2021).

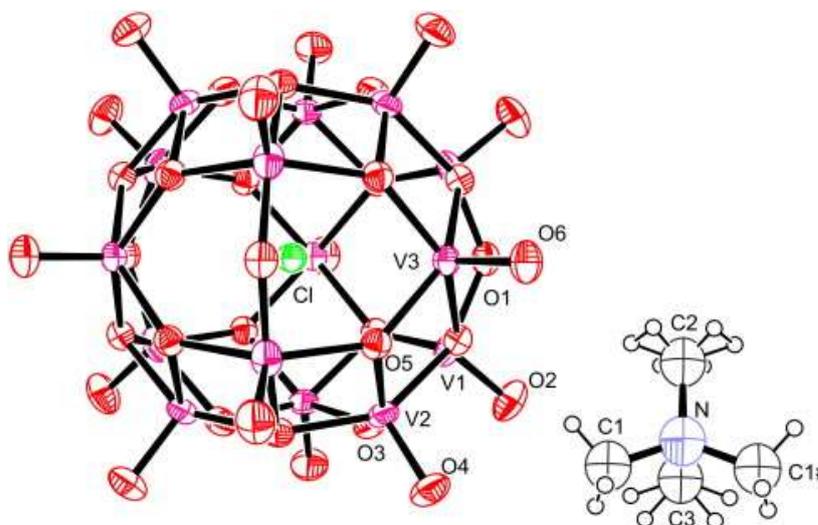
Segundo Lima *et al* (2021), os sais de vanádio, são compostos simples, formados por ligações iônicas entre si. Já os compostos de coordenação de oxidovanádio são mais complexos,

possuem o número de oxidação +IV e uma ligação de oxidovanádio ou vanadila (V=O) na estrutura. Os complexos de peroxovanádio (V), por sua vez, são compostos que possuem um número de oxidação +V. E por fim, os polioxovanadatos, íons poliatômicos carregados negativamente, que consistem em três ou mais oxoânions de vanádio ligados por oxigênio em ponte, geralmente, são provenientes das polimerizações entre os monovanadatos em meio ácido (LIMA *et al.*, 2021).

Os polioxovanadatos (POVs) são um subgrupo de polioxometalatos (POMs) que contém óxidos de vanádio. Os compostos POV de valência mista (MV-POV) expandem a química observada desta classe, apoiando especificamente a química redox que também pode facilitar uma gama mais ampla de efeitos biológicos (ALTHUMAIRY *et al.*, 2020). Os POVs podem ser homopolioxovanadatos com apenas óxidos de vanádio ou heteropolioxovanadatos nos quais os óxidos de vanádio são combinados com outros elementos (ALTHUMAIRY *et al.*, 2020; NUNES *et al.*, 2012). Em soluções aquosas, os POVs são formados em reação de condensação dependentes do pH, onde pequenos fragmentos  $[VO_n]^{n-}$  são agregados para formar variadas estruturas de cluster de alta e baixa nuclearidade com diversas geometrias de coordenação dos cátions de vanádio (MONAKHOV; BENSCH; KOGERLER, 2015). Os POVs possuem atividades antibacteriana, antiviral, antineoplásica e antidiabética. Os mecanismos envolvidos nestes efeitos ainda são completamente compreendidos, mas acredita-se que alterações na morfologia da célula, ativação de vias de apoptose, inibição da síntese de mRNA estejam envolvidas nesse processo (AURELIANO; GUMEROVA; SCIORTINO *et al.*, 2021).

O  $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}(Cl)]$  ou V15 pertence à classe dos polioxovanadatos, é descrito como um polioxoânion de coloração verde escura, solúvel em água, apresenta um cloreto encapsulado no centro do ânion e 15 centros de vanádio de cinco coordenadas, em três arranjos espaciais distintos ligados a 36 íons de óxido (NUNES *et al.*, 2012). Cada centro de vanádio tem uma geometria piramidal quadrada distorcida com um grupo vanádilo terminal na posição apical, como mostrado na figura 1 (NUNES *et al.*, 2012).

Figura 1 - Representação da estrutura da molecular de  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}(\text{Cl})]$  – V15.

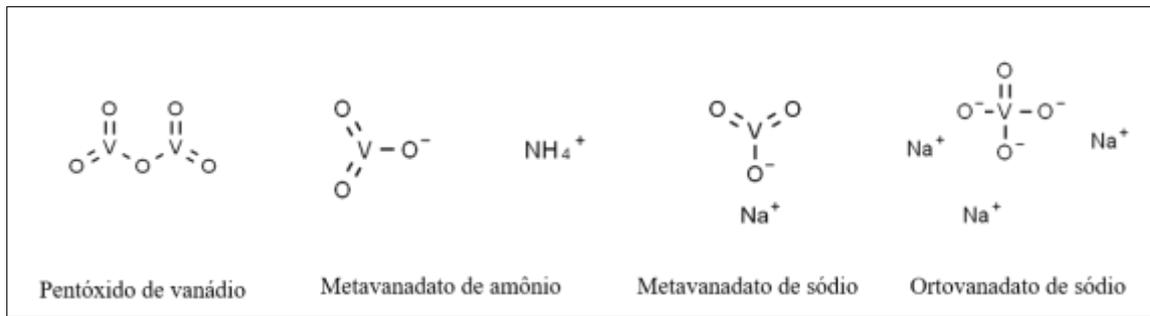


Fonte: G.G. Nunes et al. / Journal of Inorganic Biochemistry 108 (2012) 36–46

Nas últimas décadas, o vanádio tem se destacado devido a ampla gama de potenciais aplicações de seus compostos, sua química de coordenação e variedade de suas valências (ROY *et al.*, 2015). Esse metal pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação, podendo variar do  $-I$  ao  $+V$ , dentre os quais, as valências  $+III$ ,  $+IV$  e  $+V$ , são as mais comumente encontradas (FATOLA *et al.*, 2018; IMTIAZ *et al.*, 2015; MANNAZZU *et al.*, 1997). O pH e o estado de oxidação determinam as características químicas do vanádio, como a estabilidade e a solubilidade (DEL CARPIO *et al.*, 2018). Em pH ácido, o vanádio, ocorre na forma de vanadil ( $\text{VO}^{+2}$ ), no estado  $+IV$ , sendo considerada sua forma mais estável. Já em soluções básicas, o metal ocorre na forma de ortovanadato ( $\text{VO}_4^{-3}$ ), no estado trivalente ( $+III$ ), considerado um forte agente redutor (DEL CARPIO *et al.*, 2018; BARCELOUX, 1999).

A forma mais comum existente e utilizada do vanádio é o pentóxido de vanádio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), além desta, o Metavanadato de amônio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), metavanadato de sódio ( $\text{NaVO}_3$ ) e ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), cujas estruturas estão representadas na figura 2, também são consideradas comuns (IMTIAZ *et al.*, 2015; MUKHEERJEE *et al.*, 2004).

Figura 2 - Representação das formas mais comuns existentes de vanádio (V).



Fonte: Adaptado da Royal Society of Chemistry ©

### 2.3 Distribuição do vanádio na natureza

O vanádio está distribuído ubiquamente no solo, na água, ar e organismos vivos, nestes, participa como constituinte endógeno de tecidos e órgãos (PESSOA *et al.*, 2015; ROY *et al.*, 2015). No solo, o vanádio, está presente naturalmente em cerca de 65 minerais, dentre os quais a bravoita, carnotita, davidita, patronita, roscoelita e vanadinita, são considerados os mais importantes (PESSOA *et al.*, 2015; BAROCH, 2006). Tendo suas principais fontes mundiais localizadas na Austrália, Brasil, China, Finlândia, Índia, Nova Zelândia, Rússia, África do Sul, Suécia, EUA e Venezuela (DEL CARPIO *et al.*, 2018).

Na água, o vanádio está presente principalmente na forma de vanadato solúvel ( $H_2VO_4^-$ ) (REHDER, 2016). Com concentrações que podem variar entre 10 nM e 2,5  $\mu M$ , na água potável e em águas subterrâneas de áreas vulcânicas, e cerca de 35nM na água do mar (PESSOA *et al.*, 2015; REHDER, 2016). No ar, óxidos insolúveis como  $V_2O_5$ ,  $V_2O_4$  e  $V_2O_3$ , podem ser absorvidos e transportados pelo ar acoplados a partículas de poeira, o vanádio está presente especialmente nas cinzas volantes de emissões vulcânicas, nas proximidades de indústrias de processamento de carvão e petróleo bruto (REHDER, 2016).

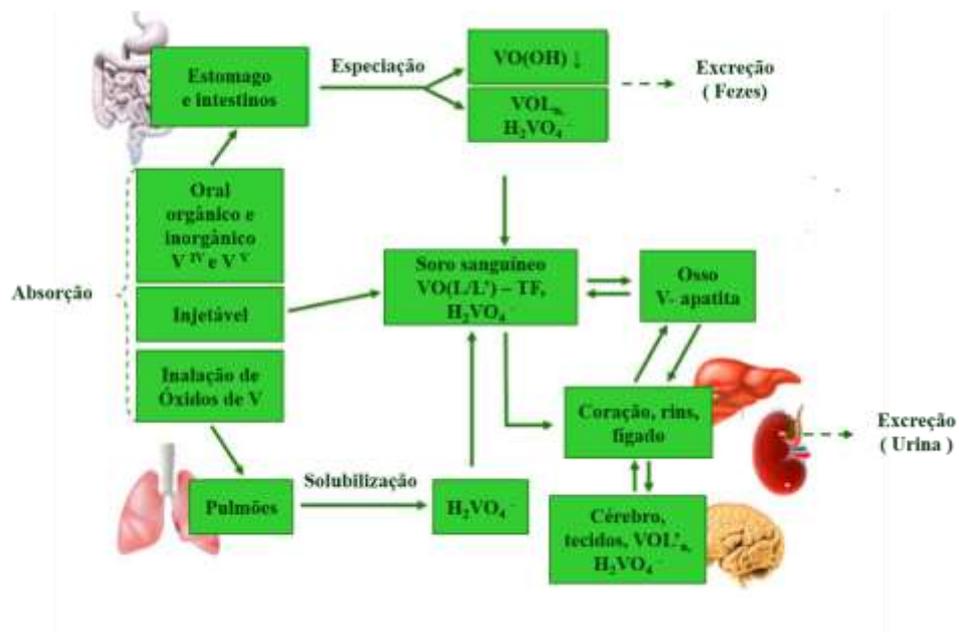
O vanádio também pode ser encontrado naturalmente em uma ampla gama de alimentos, como o óleo de soja e oliva, frutos do mar, cogumelos, cereais e leguminosas que contém entre 0,05 e 1,8 $\mu g$  de vanádio/g (ROY *et al.*, 2015; REHDER, 2013). Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição de V para os humanos, seu consumo diário através da alimentação pode ser estimado em cerca de 10  $\mu g$  a 20 mg/dia dependendo dos níveis ambientais de cada região (BISHAYEE *et al.* 2010; ROY *et al.*, 2015).

## 2.4 Absorção e metabolismo dos compostos de vanádio

O trato gastrointestinal (TGI) e respiratório, são considerados as principais vias de absorção de V, essa absorção é diretamente afetada pela forma em que os compostos se encontram, vanadato ( $V$ ;  $VO_4^{3-}$ ,  $V^{5+}$ ) e Vanadil ( $IV$ ;  $VO^{2+}$ ,  $V^{4+}$ ), os dois estados biologicamente mais estáveis do vanádio. A absorção também é afetada pela presença de cromo, proteínas, íon ferroso, cloreto e hidróxido de alumínio (TRIPATHI; MANI; PAL, 2018; VENKATARAMAN; SUDHA, 2005). Em humanos e animais apenas cerca de 10% de vanádio é absorvido pelo TGI, o vanadato é parcialmente reduzido no estômago, e em meio levemente alcalino dos intestinos precipita na forma de  $V^{IV}O(OH)_2$ . Assim, a maior parte do vanádio ingerido por fontes dietéticas e não absorvidos é eliminado nas fezes na forma de hidróxido de vanadil, considerado pouco solúvel (VENKATARAMAN; SUDHA, 2005; PESSOA *et al.*, 2015).

Além disso, os compostos de vanádio também podem entrar na corrente sanguínea através de injeção ou infusão, de forma intencional por via intravenosa e intraperitoneal ou de forma acidental quando presentes em soluções de infusão contaminadas (PESSOA *et al.*, 2015). Após absorção, os compostos de V são transportados no sangue, ligados a proteínas como albumina e transferrina, passam por especiação e seguem rotas distintas para serem armazenados nos órgãos alvo, como rins, fígado, testículos, baço, cérebro, coração, músculos e ossos. Ou excretados, nas fezes e urina como mostrado na figura 3.

Figura 3 - Representação da captação e distribuição de compostos de vanádio no organismo.



## 2.5 Aplicações e Efeitos Biológicos dos Compostos de Vanádio

Devido as suas características físico-químicas, o vanádio é extensamente utilizado na indústria, seu principal uso comercial é na fabricação de ligas de aço, com o objetivo de aumentar a dureza e a resistência à corrosão, além disso, seu uso também se aplica na fabricação de pesticidas, pigmentos e tintas (FATOLA *et al.*, 2019; SCHLESINGER; KLEIN; VENGOSH, 2017). Recentemente, uma aplicação crescente é o uso do vanádio no desenvolvimento e produção de tecnologias verdes e baterias de fluxo redox, como alternativa ao uso das baterias de íons de lítio, para armazenar energia limpa, produzida a partir de fontes renováveis (ZWOLAK, 2020; SCHLESINGER; KLEIN; VENGOSH, 2017).

O vanádio é um oligoelemento, que pode ser benéfico e possivelmente essencial em humanos (CRANS *et al.*, 2004). Tem sido amplamente estudado por seus potenciais efeitos terapêuticos, principalmente no tratamento do diabetes *mellitus* (DM), estudos *in vitro* em sistemas livres de células mostraram os efeitos dos derivados de vanádio na atividade de muitas enzimas, principalmente aquelas relacionadas às reações de fosfato. É bem conhecido que os íons de vanádio  $VO^{2+}$  e  $VO_2^+$  em concentrações fisiológicas e pH de 7,15 são eletronicamente e estruturalmente análogos ao fosfato, o que seria responsável pelos efeitos miméticos à insulina (HERNANDÉZ *et al.*, 2021; THOMPSON *et al.*, 2009; KORBECKI *et al.*, 2012).

Além das propriedades antidiabéticas, seu uso também possui efeitos antitumorais, antidislipidêmicos e antivirais (ZWOLAK, 2020; ROY *et al.*, 2015). Ademais, o uso do vanádio pode ser benéfico no tratamento da cárie dentária, anemia, desnutrição, sífilis e tuberculose (FATOLA *et al.*, 2019; MUKHEERJEE *et al.*, 2004; ŚCIBIOR *et al.*, 2020). Além disso Segundo Pessoa *et al* (2015) o vanádio possui efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular. Estimula a síntese de DNA em fibroblastos, comportando-se como um agente mimético do fator de crescimento levando a transição das células da fase G0 para G1 no ciclo celular (PESSOA *et al.*, 2015). Contudo, o uso clínico dos compostos à base de vanádio é limitado por sua toxicidade.

## 2.6 Efeitos Tóxicos dos Compostos de Vanádio

A toxicologia é a ciência estuda os efeitos nocivos das substâncias químicas e seus efeitos fisiológicos ou comportamentais em organismos vivos (LANGMAN; KAPUR, 2006). Através da toxicologia desenvolve-se métodos qualitativos e quantitativos para análise de substâncias tóxicas, em materiais biológicos e não biológicos, além do desenvolvimento de

procedimentos para o tratamento de envenenamento (LANGMAN; KAPUR, 2006). A toxicidade, é a capacidade inerente de uma substância para causar prejuízos, que está diretamente relacionada a dose administrada e duração da exposição a determinada substância (CLARK, 2013).

É bastante conhecido que os metais tem a capacidade de causar uma variedade de doenças e agravos a saúde e os mecanismos de sua toxicidade tem sido constantemente investigado (RANA, 2014). O vanádio é um metal naturalmente tóxico, que possui diferentes estados de oxidação (-I até +V) (REHDER, 2013). Esse metal entra em contato com o organismo através da inalação de suas partículas, através da pele, ou ingestão pelo trato gastrointestinal (WILK *et al.*, 2017). A principal fonte de exposição ao vanádio se dá através da alimentação, contudo, a intoxicação por V é improvável de acontecer em condições nutricionais normais (REHDER, 2016). A partir daí, os compostos de vanádio podem seguir rotas distintas para serem absorvidos e excretado através das fezes e da urina (PESSOA *et al.*, 2015).

Entretanto o uso crescente do vanádio pela indústria, tem contribuído para a contaminação da água potável e do solo (ZWOLAK, 2020). Como também, tem sido responsável pelo aumento da exposição ocupacional aos compostos desse metal (FATOLA *et al.*, 2019). De acordo com WOODIN *et al* (2000) essa exposição aumentada a partículas de vanádio pode trazer prejuízos à saúde humana, como o desenvolvimento de sintomas respiratórios agudos observados em fabricantes de caldeiras, além de disfunções pulmonares como bronquite, pneumonia e asma (REHDER, 2013).

Segundo Tsiani, (1997) a suplementação oral e intraperitoneal em modelos animais mostrou acúmulo de vanádio no cérebro, pâncreas, pulmão, testículos, coração, baço, fígado, rins e osso. Na literatura existem registros que V e seus compostos podem induzir lesões em órgãos e tecidos, toxicidade sanguínea, estresse ou dano oxidativo, toxicidade reprodutiva (IMURA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2017).

A toxicidade pode ser identificada a partir de sinais e sintomas como anorexia, desidratação, perda de massa corporal, hemorragia pulmonar, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (WEI *et al.*, 1982; IMURA *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2015; WILK *et al.*, 2017). Também são descritos os comprometimentos neurológicos como déficits de memória a depender da dose, via de contaminação e do tempo de exposição (AZEEZ *et al.*, 2016; FOLARIN *et al.*, 2016; FATOLA *et al.*, 2019).

Embora seja excretado pelo sistema urinário (WILK *et al.*, 2017), uma parte do vanádio se acumula em diversos órgãos e tecidos, principalmente no fígado, rim, baço, ossos e pulmões

(VALKO *et al.*, 2005). O acúmulo do vanádio no organismo pode levar a efeitos tóxicos tais como: lesões e inflamações gastrointestinais, diarreia, desidratação, perda ponderal, além dos efeitos nefro e hepatotóxico (IMURA *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2015). O que geralmente ocorre após a administração de altas doses e/ou exposições prolongadas a esses compostos (WILK *et al.*, 2017). Desse modo, os efeitos tóxicos do vanádio estão relacionados ao seu estado de oxidação ou valência, a dose administrada, a rota e a duração da exposição (ALLOWAY, 2013; ADEBIYI *et al.*, 2015).

Diversos estudos tem associado a exposição experimental ao vanádio com lesões estruturais nos pulmões, testículos e fígado de ratos neonatos (FATOLA *et al.*, 2019; MORGAN; EL-TAWIL, 2013; ROY *et al.*, 2015; WILK *et al.*, 2017). Como também, déficits comportamentais e danos aos oligodendrócitos em camundongos e ratos expostos ao vanádio durante a gestação e lactação (AZEENZ *et al.*, 2016). De acordo com Wilk *et al* (2017) o vanádio também parece afetar a fertilidade de camundongos e ratos machos e fêmeas, através da atrofia de estruturas reprodutivas, com conseqüente redução no número de gestação e na viabilidade fetal (MORGAN; EL-TAWIL, 2003).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias do composto à base de vanádio  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}] - \text{V15}$  em camundongos.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar o ganho ponderal, ingestão alimentar e hídrica;
- Determinar os marcadores bioquímicos de função hepática e renal;
- Quantificar os principais marcadores hematológicos;
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo no fígado;
- Realizar análise histopatológica do fígado e rim.

#### **4 HIPÓTESE**

O novo composto à base de vanádio  $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}Cl]$  – v15 – não tem efeitos tóxicos agudos e em doses repetidas por 28 dias em camundongos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Composto a base de Vanádio

O composto a base de vanádio  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}]$ , foi obtido do laboratório da professora Debbie C. Crans – *Chemistry Department - Colorado State University - EUA*. A escolha das doses administradas e as análises toxicológicas foram realizadas de acordo com as recomendações das diretrizes 423 e 407 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para o ensaio de toxicidade oral aguda e por doses repetidas por 28 dias respectivamente.

### 5.2 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas ( $30 \pm 3\text{g}$ ) da linhagem Swiss entre 06 e 09 semanas de vida, provenientes do biotério do departamento de fisiologia e farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em sala climatizada, sob ciclo claro-escuro de 12h12 horas e acesso livre à água. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais de biotério foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (CEUA) sob o número 0021/2021 (Anexo A).

Em todos os procedimentos cirúrgicos necessários à coleta de material biológico, os princípios da bioética e bem-estar animal foram empregados. De modo geral, antes do início da cirurgia, os reflexos dos animais foram verificados através de leve prensão da pata traseira, com o auxílio de uma pinça. Quando ainda havia resposta, foi utilizado algodão embebido em isoflurano, para auxiliar no aprofundamento da anestesia do animal. Os reflexos do animal foram monitorados no decorrer do procedimento e sempre que houve necessidade, o aprofundamento anestésico com isoflurano foi repetido para que não houvesse sofrimento, dor ou estresse do animal.

O manejo dos animais foi realizado em horário previamente fixado, durante o período da manhã. Após a eutanásia, a carcaça foi colocada em saco plástico branco identificado e armazenado em freezer próprio para este fim. Posteriormente, esse material foi recolhido por empresa especializada e incinerado fora das dependências da universidade em local protegido. Os pesquisadores fizeram uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs) necessários para

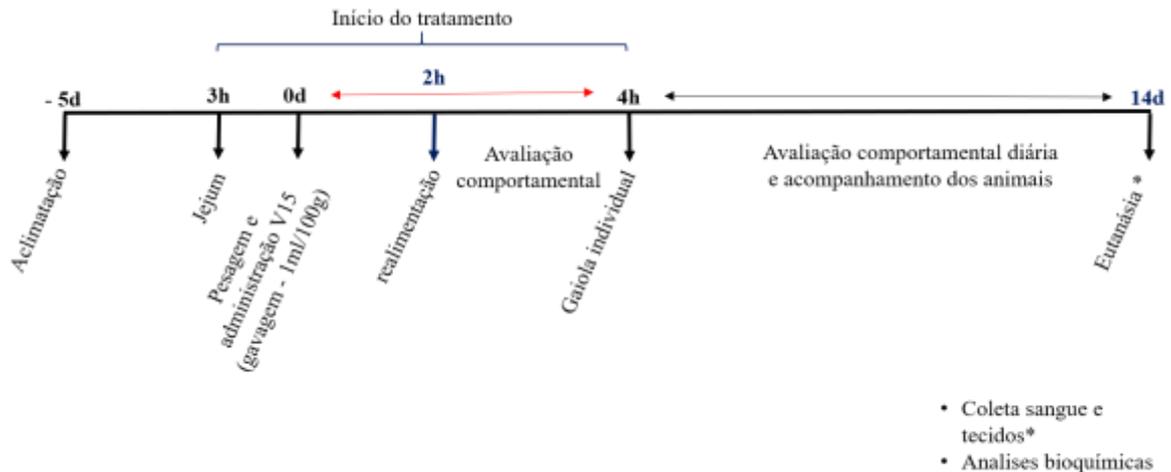
sua proteção e do animal durante todo o experimento, a saber: luva, touca, jaleco, óculos e máscara.

### 5.3 Desenho experimental toxicidade oral aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada com base nos métodos recomendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico - Guideline 423, figura 4 (OECD, 2001). Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, fêmeas (n=12) nulíparas e não grávidas foram utilizadas. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C, n=3); tratado com 50mg/kg (V15<sub>50</sub>, n=3), 300mg/kg (V15<sub>300</sub>, n=3) e 2.000mg/kg de V15 (V15<sub>2.000</sub>, n=3). O composto à base de vanádio – V15 foi dissolvido em solução salina 0,9% e administrado em dose única por via oral, por gavagem, nos animais do grupo tratado. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9% (1ml/100g). Os animais foram mantidos em gaiolas padrão de polipropileno e observados durante as quatro primeiras horas após a administração do composto e, diariamente durante 14 dias, para constatação de eventuais alterações comportamentais, cardiorrespiratórias e gastrintestinais. Os animais foram mantidos em gaiola padrão individualizada para determinação do ganho ponderal, ingestão hídrica e alimentar.

No 14º dia os animais foram anestesiados (xilazina 8mg/kg e cetamina 150mg/kg, i.p.) e mantidos sob anestesia profunda para coleta de sangue através do plexo orbital e punção cardíaca para dosagem sérica da alanina (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), albumina, proteínas totais e ureia, de acordo com as recomendações do fabricante (Labetst®). Em seguida coração, pulmões, fígado, rins e músculo tibial anterior foram coletados e pesados em balança analítica (Shimadzu®) para a comparação do peso relativo dos órgãos entre os grupos. Os resultados foram expressos em milímetros/miligramas (mm/mg) de animal.

Figura 4 - Representação do desenho experimental da toxicidade oral aguda em camundongos, baseado no Guideline 423 (OECD, 2001).



Fonte: Autor, baseado no Guideline 423 (OECD, 2001).

## 5.4 Desenho experimental toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias

### 5.4.1 Curva de sobrevivência

Os animais foram avaliados por 28 dias consecutivos. Alterações que sugerissem dor, sofrimento ou estresse, o animal foi imediatamente eutanasiado com excesso de anestésicos e necropsiado. A análise de sobrevivência foi realizada através da curva de Kaplan-Meier.

### 5.5 Avaliação da toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias

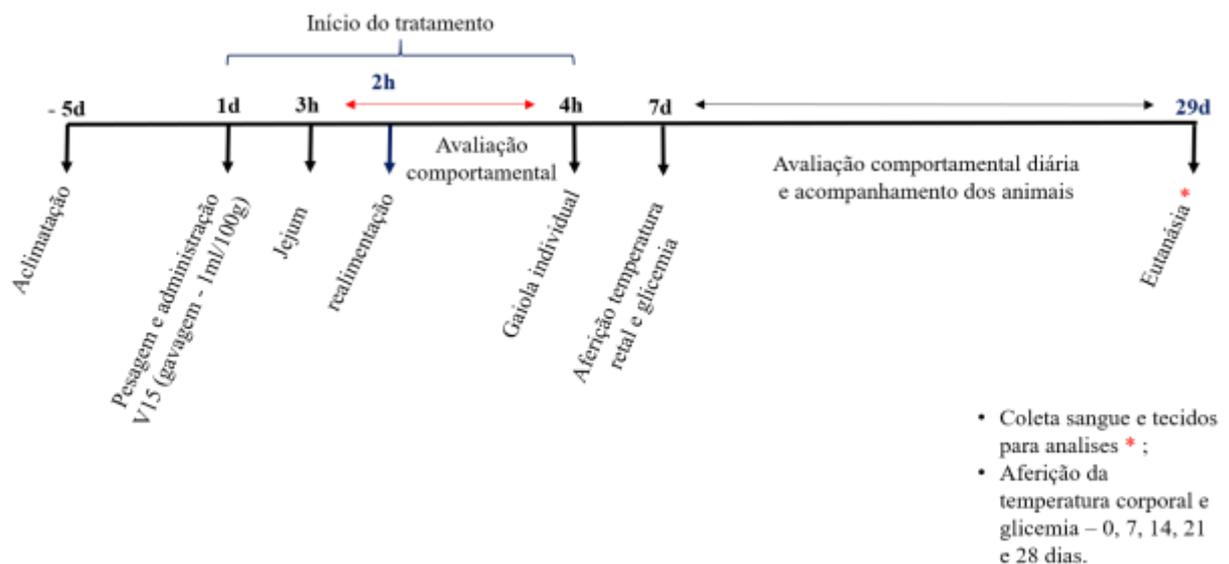
A avaliação da toxicidade oral por doses repetidas por 28 dias foi realizada com base na métodos recomendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico - Guideline 407, figura 5 (OECD, 2001). Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, machos (n=20) e fêmeas (n=20) nulíparas e não grávidas foram utilizadas. Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo 5 animais machos e 5 fêmeas para cada grupo respectivamente, a saber: controle (C, n=10); tratado com 25mg/kg (V15<sub>25</sub>, n=10), 50mg/kg (V15<sub>50</sub>, n=10) e 300mg/kg (V15<sub>300</sub>, n=10). Os animais foram tratados por via oral, por gavagem, nas doses previamente. Os animais do grupo controle receberam salina 0,9% (1ml/100g).

Os animais foram mantidos em gaiolas padrão, de polipropileno e observados durante as 4 primeiras horas no início do tratamento, para constatação de eventuais alterações

comportamentais, cardiopulmonares e gastrointestinais. Após esse período, os animais foram mantidos individualmente durante todo o experimento e, a cada 7 dias, foram aferidas a glicemia através de glicosímetro digital (método da glico-oxidase, On Call Plus®) e a temperatura retal como auxílio do termômetro clínico digital<sup>TS-101 PM</sup>, como também, o ganho ponderal, ingestão hídrica e alimentar.

Após 28 dias de experimento, os animais foram anestesiados (xilazina 8mg/kg e cetamiana 150mg/kg, i.p.) e mantidos sob anestesia profunda para coleta de órgãos, tecidos e sangue através do plexo orbital e punção cardíaca. Posteriormente, o coração, pulmão, fígado, rins, testículo e/ou ovário, útero, músculo tibial anterior e gastrocnêmio foram retirados e pesados em balança analítica (Shimadzu®). Uma porção do fígado foi coletada e armazenada a  $-80\text{ C}^\circ$  para posterior análise dos marcadores de estresse oxidativo, como também uma parte do fígado e rim foi separada e armazenada em formol tamponado a 10% para análise histológica.

Figura 5 - Representação do desenho experimental da toxicidade oral por doses repetidas por 28 dias em camundongos, baseado no Guideline 407 (OECD, 2001).



Fonte: Autor, baseado no Guideline 407 (OECD, 2001).

## **5.6 Análise do perfil bioquímico**

O sangue coletado através do plexo orbital e coração foi acondicionado em microtubos (Eppendorfs®) devidamente identificados e centrifugado a 2800 rpm por 20 minutos para obtenção de soro. Após obtenção, o soro foi separado em alíquotas de 50µl para a análise das transaminases hepáticas (alanina e aspartato aminotransferase). Para albumina, ureia, colesterol total e triglicérides foram utilizadas 10µl para cada análise. Já para as dosagens de ácido úrico, creatinina e proteínas totais reservou-se uma alíquota de 20µl para realização de cada análise. Para as análises bioquímicas foram utilizados kits de reagentes para bioquímica da Labtest® seguindo-se o protocolo do fabricante.

## **5.7 Análise do perfil Hematológico**

Foi coletado 80µl de sangue pelo plexo-orbital e armazenado em microtubo de 0,5ml para coleta sanguínea com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O sangue foi homogeneizado dentro do tubo para evitar possível coagulação, os tubos ficaram sob refrigeração até serem levados para análise em laboratório fora da Universidade. A determinação hematológica incluiu hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), contagem de glóbulos vermelhos (RBC), contagem de plaquetas, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de linfócitos (LYM) e leucócitos (LE).

## **5.8 Análise dos Marcadores de Estresse Oxidativo**

O tecido hepático foi homogeneizado com adição de tampão tris-base 50 mM e antiproteases (PMSF e ortovanadato) na concentração de 1mM. Após esse processo foi centrifugado a 0°C em 3600 rpm durante 10 minutos. Foram coletados 120µl do sobrenadante para analisar superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); para as análises de glutatona (GSH/GSSG) e nitrito foram utilizados 120µl e 100µl, respectivamente (WU et al., 2017). Além disso, foram separados 200µl para análise do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 20 µl para análise de proteínas pelo método de Bradford.

### 5.8.1 Determinação da concentração de malonaldeído (MDA)

A peroxidação lipídica nos homogenatos de fígado foi estimada por colorimetria através dos ensaios de TBARS, adaptado dos métodos de Ohkawa et al. (1979). Em resumo, 0,1 mL dos homogenatos foi misturado com 0,08 mL de SDS a 8,1%, 0,6 mL de ácido acético a 20% (pH 3,5), 0,6 mL de TBA a 0,8% e aquecida a 95 °C durante 60 minutos. Após o resfriamento até atingir temperatura ambiente, foram adicionados 0,6 mL de n-butanol misturado e centrifugado a 2500 G durante 10 minutos. Coletou-se 0,3 ml do sobrenadante e foram estimadas as absorvâncias a 532 nm. Já para a curva de calibração foi usado o padrão de malonaldeído (MDA).

### 5.8.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972). O fígado foi centrifugado e homogeneizado, do seu sobrenadante coletou-se 0,06 mL, que foi incubado com 0,920 mL de carbonato de sódio 0,1M, EDTA 0,1mM (pH10,2) a 37°C. Foi adicionado 30 milimoles por litro de epinefrina (em ácido acético a 0,05%) e a atividade de SOD a 37°C foi medida pela cinética de inibição da auto-oxidação de epinefrina a 480 nm, já o decaimento da absorvância foi acompanhado durante 90 segundos (MISRA E FRIDOVICH, 1972). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir a auto-oxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados são expressos em U/mg de proteína.

### 5.8.3 Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

Para medir a atividade da CAT foi coletado 0,06 ml do homogeneizado dos tecidos hepáticos de acordo com o método descrito por Aebi (1984). O qual se baseia na determinação da constante de velocidade (k) da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que em nossas condições de temperatura e pH foi definida como  $4,6 \times 10^7$ . A constante de velocidade da enzima pôde ser determinada medindo a variação na absorvância a 240 nm por minuto, durante 4 minutos a 30 °C (Aebi, 1984), em um meio de reação, contendo tampão fosfato 50mM (pH=7,0) amostra e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300mM). Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto em H<sub>2</sub>O. Os resultados são expressos em U/mg de proteína.

#### 5.8.4 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e Razão glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG)

Foi adicionado 0,05 ml do homogeneizado do tecido hepático ao tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) contendo EDTA 5 mM e incubado à temperatura ambiente com oftaldialdeído (OPT, 1 mg/mL) durante 15 minutos. A intensidade de fluorescência foi medida com excitação de 350 nm e comprimentos de onda de emissão de 420 nm, para a análise do GSSG utilizou-se a N-etilmaleimida para evitar que ocorra interferências da GSH na medição (HISSIN E HILF, 1976). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

#### 5.8.5 Determinação dos Níveis de Nitrito

Os níveis de óxido nítrico foram aferidos com base na estimativa de nitrito total obtida através da reação de Greiss, adaptada do método de Tiwari et al. (2011). Adicionou-se 100 µL de reagente de Greiss a 100µL do homogenato do tecido hepático e medidos em placas de 96 poços a 570 nm utilizando um espectrofotômetro. As concentrações de nitrito foram calculadas usando uma curva padrão com variação de 100 a 1,56 µM de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), e os níveis de nitrito expressos como µM.

### 5.10 Análises Histopatológicas

Amostras de fígado e rim de todos os grupos avaliados no experimento de doses repetidas por 28 dias foram coletadas para avaliação histopatológica. Os tecidos foram preservados em formalina a 10%, em seguida desidratados em álcool 70, 80, 90 e 100% e incluídos em parafina de baixo ponto de fusão. Ao término deste processo, as amostras foram cortadas em micrótomo automático (Laica<sup>®</sup>), em cortes de 5µM de espessura e montadas as lâminas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica por microscopia de luz. Com o auxílio do microscópio Eclipse Ni-U Nikon<sup>®</sup> foram feitas 5 fotografias de cada lâmina nos aumentos de 10X e 40X.

### 5.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (M±EP). O teste de normalidade selecionado foi o de Kolmogorov-Smirnov, em seguida foi aplicada a análise múltipla de dados, a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey e ANOVA de

duas vias para parâmetros que variam ao longo do experimento como peso, ingestão alimentar e hídrica e a glicemia. O nível de significância foi considerado maior ou igual a 95% ( $p < 0,05$ ). Para a análise estatística dos dados utilizou-se o software GraphPad Prism 6<sup>®</sup>.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito da Toxicidade Aguda do Composto a base de Vanádio - V15 em camundongos

Não foi observada mortalidade ou sinais de toxicidade nos grupos tratados com 50mg/kg, 300mg/kg e 2,000mg/kg de V15 por via oral nas 4 primeiras horas de exposição, assim como após 14 dias da administração. O V15 não alterou o ganho de massa corporal, assim como a ingestão alimentar total. Já a ingestão hídrica total dos grupos V15<sub>300</sub> e V15<sub>2.000</sub> aumentou em (20%,  $p<0,05$ ) e (21%,  $p<0,05$ ) respectivamente (tabela 1), embora tenha elevado estes parâmetros de ingestão transitoriamente ao longo do experimento nas doses avaliadas (Figura 6). O V15 provocou, somente na maior dose, aumento da massa hepática (tabela 2).

Figura 6 – Ganho de peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) em camundongos fêmeas tratados com V15 por via oral ao longo dos 14 dias de tratamento.

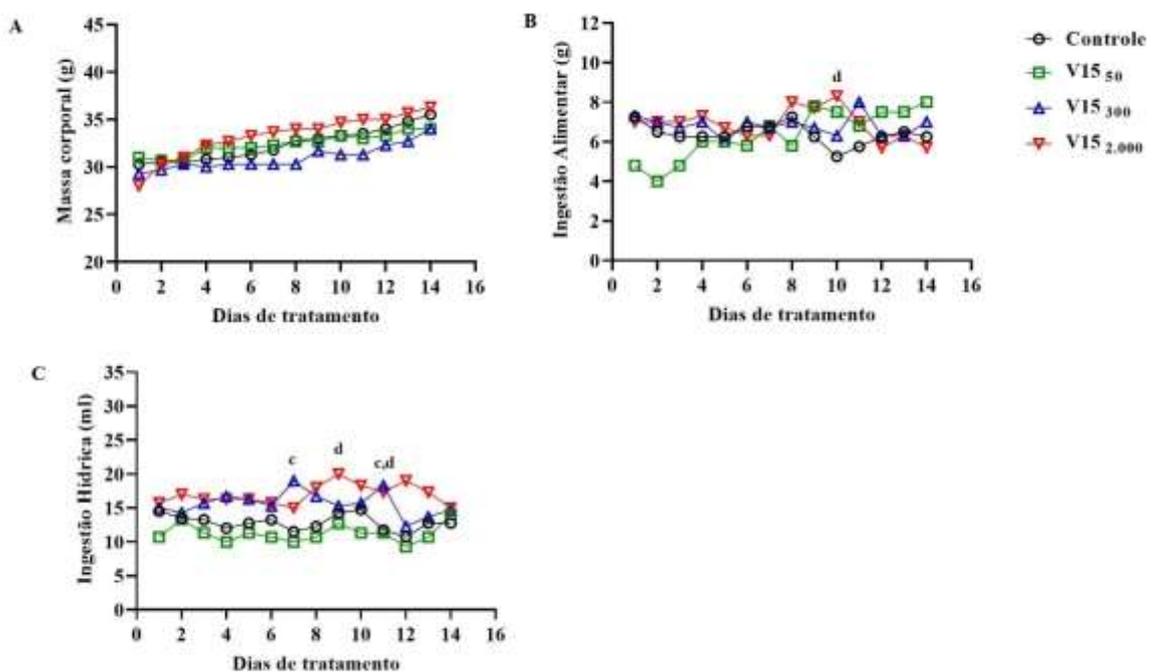


Figura 6. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ . Onde letras diferentes expressam resultados diferentes entre os grupos tratados vs. grupo controle.

'b' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 50mg/kg vs. Controle ( $p \leq 0,05$ ).

'c' existe diferença estatisticamente significativa entre 300mg/kg vs. Controle ( $p \leq 0,05$ ).

'd' diferença estatisticamente significativa entre 2.000mg/kg vs. Controle ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 1 - Ganho de massa corporal, ingestão de alimentos e ingestão hídrica totais em camundongos fêmeas tratados com V15 no 14º dia de tratamento.

Grupos	Peso corporal (g)	Ingestão alimentar (g)	Ingestão hídrica (ml)
Controle	480,3 ± 17,5	96,5 ± 3,8	194,0 ± 9,9
V15 <sub>50</sub>	484,3 ± 15,8	89,7 ± 4,1	169,3 ± 3,7
V15 <sub>300</sub>	463,0 ± 14,8	102,7 ± 4,2	234,0 ± 4,5 <sup>c, e</sup>
V15 <sub>2.000</sub>	503,0 ± 14,8	103,3 ± 1,9	235,0 ± 9,5 <sup>d, e</sup>

Tabela 1. Ganho ponderal, ingestão hídrica e alimentar total dos grupos controle, 50mg/kg, 300mg/kg e 2.000mg/kg.

‘b’ indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘c’ indica significância estatística entre o grupo 300mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘d’ indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘e’ indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. 50mg/kg e 300mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 2 - Pesos relativos dos órgãos (mm/mg de peso corporal) de camundongos fêmeas tratados com V15 no 14º dia.

Órgãos	Controle	V15 <sub>50</sub>	V15 <sub>300</sub>	V15 <sub>2000</sub>
Coração (mm/mg)	1,15 ± 0,55	0,72 ± 0,03	1,29 ± 0,31	1,12 ± 0,07
Pulmões (mm/mg)	1,02 ± 0,01	1,04 ± 0,10	1,44 ± 0,25	1,33 ± 0,09
Fígado (mm/mg)	11,42 ± 0,4	9,21 ± 0,09	10,25 ± 0,34	13,18 ± 0,43 <sup>e</sup>
Rins (mm/mg)	2,70 ± 0,08	2,31 ± 0,08	2,46 ± 0,18	2,60 ± 0,06
Tibial anterior (mm/mg)	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,39 ± 0,06

Tabela 2. Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

‘b’ indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘c’ indica significância estatística entre o grupo 300mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘d’ indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘e’ indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. 50mg/kg e 300mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

Curiosamente, o V15 induziu aumento (40%,  $p < 0,05$ ) das aspartato aminotransferase no grupo V15<sub>50</sub> e na alanina aminotransferase (30%,  $p < 0,05$ ) somente no grupo V15<sub>2000</sub> (tabela 03), sem alterações das transaminases nas demais doses avaliadas. Houve aumento nos níveis de proteínas totais (30%,  $p < 0,05$ ) nos grupos V15<sub>300</sub> e V15<sub>2000</sub>, entretanto nos grupos V15<sub>300</sub> e V15<sub>2000</sub> houve redução nos níveis de albumina (30%,  $p < 0,05$ ), sem alterações nos níveis de globulina e ureia (tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas tratados com V15 no 14º dia.

Órgãos	Controle	V15 <sub>50</sub>	V15 <sub>300</sub>	V15 <sub>2000</sub>
AST (U/L)	128,1 ± 7,0	180,5 ± 5,2 <sup>f</sup>	117,9 ± 15,4	139,7 ± 19,4
ALT (U/L)	126,2 ± 9,1	103,5 ± 1,1	141,6 ± 8,9	165,5 ± 14,4 <sup>d, e</sup>
Proteínas Totais (mg/dL)	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,1	5,0 ± 0,7 <sup>e</sup>	4,8 ± 0,4 <sup>e</sup>
Albumina (mg/dL)	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,03	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,04 <sup>e</sup>
Globulina (mg/dL)	2,5 ± 0,03	1,6 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4 <sup>e</sup>
Ureia (mg/dL)	67,50 ± 3,51	67,7 ± 0,6	67,71 ± 4,43	63,3 ± 2,6

Tabela 3. Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

'b' indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

'c' indica significância estatística entre o grupo 300mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

'd' indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

'e' indica significância estatística entre o grupo 2.000mg/kg vs. o grupo 50mg/kg e 300mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

'f' indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o grupo 300mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

## 6.2 Efeito da Toxicidade por doses repetidas durante 28 dias do V15 em camundongos *swiss* machos e fêmeas

A análise de sobrevivência foi realizada através da curva de Kaplan-Meier. A letalidade foi de 100%, 40% e 20% em camundongos fêmeas tratados com 300mg/kg, 50mg/kg e 25mg/kg, respectivamente, em comparação com aqueles que receberam apenas solução salina. No macho a mortalidade foi de 20%, apenas na dose de 25mg/kg. Uma vez que todos os camundongos fêmeas tratados com 300mg/kg morreram, esta dose não foi avaliada no macho (figura 7).

Figura 7 - Curva de sobre vida dos animais tratados com V15 por gavagem no 28º dia do tratamento.

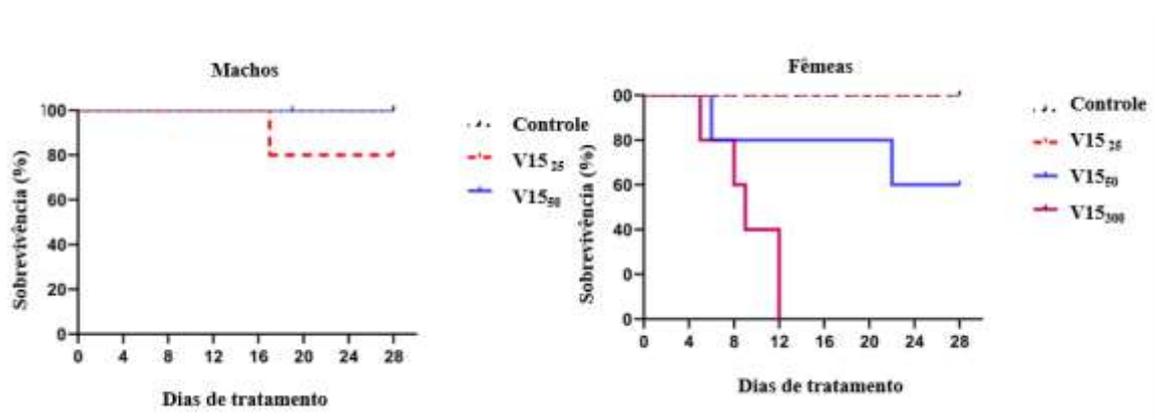


Figura 7 – A letalidade foi registrada em percentual (%).

### **6.3 Efeito da toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias sobre a massa corporal, ingestão alimentar e hídrica de camundongos tratados com V15**

O tratamento com V15 não produziu nenhum efeito sobre os parâmetros metabólicos gerais de ganho de massa corporal e ingestão hídrica em nenhuma dose avaliada, embora tenha reduzido a ingestão alimentar total nos animais machos e fêmeas do grupo V15<sub>50</sub> (figura 08, tabela 04). Os animais machos do grupo V15<sub>25</sub> reduziram a ingestão alimentar transitoriamente (36,67%,  $p < 0,05$ ) e o grupo V15<sub>50</sub> elevou este parâmetro (16,6%,  $p < 0,05$ ) no mesmo período. Já o grupo de fêmeas tratadas com a menor dose tiveram um aumento transitório da ingestão alimentar (57,1%,  $p < 0,05$ ), no 14° e (52,3%,  $p < 0,05$ ) no 28° dia de experimento, enquanto as fêmeas tratadas com a maior dose tiveram aumento seu consumo alimentar (59,0%,  $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos, no 21° dia de experimento (figura 8 e tabela 4). O V15 provocou aumento (17,4%  $p \leq 0,05$ ) na massa cardíaca, no grupo dos machos tratados com 25mg/kg, e redução (15%  $p \leq 0,05$ ) na massa renal do grupo tratado com 50mg/kg. Já no grupo das fêmeas, houve redução na massa cardíaca (24,63 %  $p \leq 0,05$ ) e renal (21,32 %  $p \leq 0,05$ ) no grupo V15<sub>50</sub> em relação ao controle, além disso, também houve redução (26,34%  $p \leq 0,05$ ) no peso dos ovários e útero no grupo V15<sub>25</sub> e (35,2%  $p \leq 0,05$ ) no grupo V15<sub>50</sub> vs. o controle ao final dos 28 dias de tratamento (Tabela 5).

Figura 8 - Ganho de peso corporal (A, B), ingestão alimentar (C, D) e ingestão hídrica (E, F) em camundongos machos (A, C e E) e fêmeas (B, D e F) tratados com V15 ao longo dos 28 dias de tratamento.

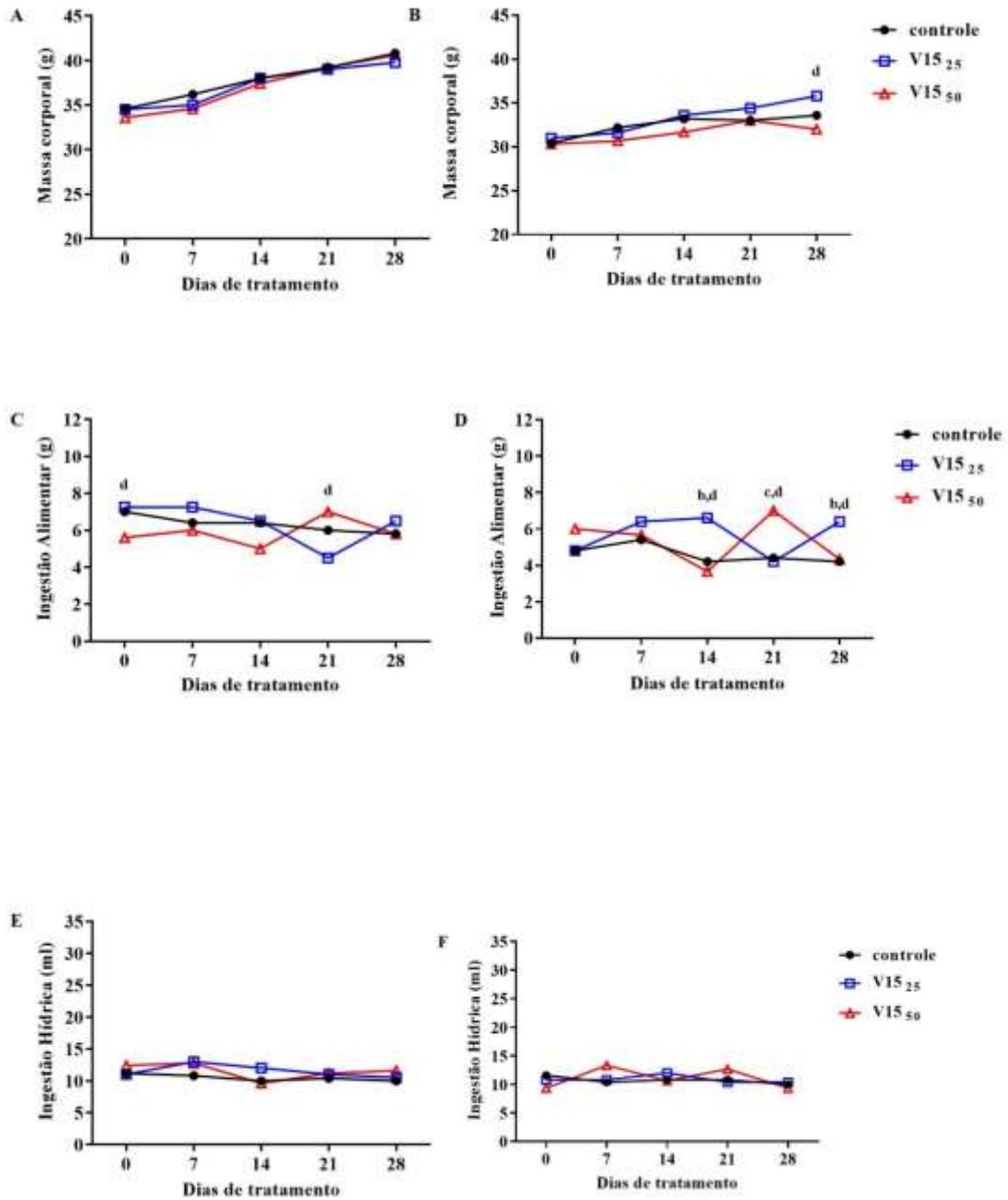


Figura 8. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

'b' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 25mg/kg e o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

'c' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 50mg/kg e o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

'd' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 25mg/kg e o grupo 50mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 4 - Ganho de massa corporal (g), ingestão de alimentos (g) e ingestão hídrica (ml) totais em camundongos machos e fêmeas tratados com V15 ao longo dos 28 dias de tratamento.

<b>Machos</b>			
Grupos	Peso corporal (g)	Ingestão alimentar (g)	Ingestão hídrica (ml)
Controle	1.071,80 ± 21,8	177,0 ± 6,6	316,0 ± 5,89
V15 <sub>25</sub>	1.080,00 ± 12,1	170,8 ± 2,8	327,5 ± 14,2
V15 <sub>50</sub>	1.070,00 ± 29,2	155,6 ± 5,4 <sup>c</sup>	308,4, ± 10,5
<b>Fêmeas</b>			
Grupos	Peso corporal (g)	Ingestão alimentar (g)	Ingestão hídrica (ml)
Controle	941,20 ± 28,7	146,8 ± 6,9	303,6 ± 9,0
V15 <sub>25</sub>	928,80 ± 15,4	164,2 ± 5,7	303,2 ± 18,1
V15 <sub>50</sub>	912,70 ± 15,5	136,3 ± 5,4 <sup>d</sup>	322,7 ± 3,5

Tabela 4 - Ganho ponderal, ingestão hídrica e alimentar total dos grupos controle, 25mg/kg, 50mg/kg.

Tabela 5 - Pesos relativos dos órgãos (mm/mg de peso corporal) de camundongos *Swiss* machos tratados com V15 no 28º dia.

<b>Machos</b>			
Órgãos	Controle	V15 <sub>25</sub>	V15 <sub>50</sub>
Coração (mm/mg)	8,99 ± 0,25	10,56 ± 2,37 <sup>b</sup>	7,43 ± 0,17
Pulmões (mm/mg)	13,62 ± 0,43	12,98 ± 1,31	11,07 ± 0,56
Fígado (mm/mg)	103,30 ± 7,29	110,13 ± 1,26	107,12 ± 3,25
Rins (mm/mg)	30,90 ± 0,53	29,18 ± 1,26	26,14 ± 1,44 <sup>c</sup>
Tibial anterior (mm/mg)	3,23 ± 0,12	2,78 ± 0,20 <sup>b</sup>	2,71 ± 0,22
Gastrocnêmio (mm/mg)	7,96 ± 0,15	7,29 ± 0,30	7,26 ± 0,56
Testículos (mm/mg)	16,15 ± 1,47	13,10 ± 1,04	12,96 ± 0,28
<b>Fêmeas</b>			
Órgãos	Controle	V15 <sub>25</sub>	V15 <sub>50</sub>
Coração (mm/mg)	8,69 ± 0,54	7,66 ± 0,26	6,55 ± 0,64 <sup>c</sup>
Pulmões (mm/mg)	12,50 ± 2,09	11,93 ± 0,84	11,62 ± 0,60
Fígado (mm/mg)	91,96 ± 4,23	99,39 ± 4,58	95,96 ± 3,74
Rins (mm/mg)	24,44 ± 0,76	21,71 ± 0,75	19,23 ± 1,67 <sup>c</sup>
Tibial anterior (mm/mg)	4,31 ± 0,98	2,56 ± 0,13	2,12 ± 0,13
Gastrocnêmio (mm/mg)	3,23 ± 0,42	5,25 ± 0,46	6,95 ± 0,88

Ovários + útero (mm/mg)	24,04 ± 1,07	17,71 ± 1,03 <sup>b</sup>	15,58 ± 2,14 <sup>c</sup>
-------------------------	--------------	---------------------------	---------------------------

Tabela 5 – Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

'b' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 25mg/kg e o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

'c' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 50mg/kg e o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

'd' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 25mg/kg e o grupo 50mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

Ao final do estudo de toxicidade oral por doses repetidas de 28 dias, houve aumento (48,1%  $p \leq 0,05$ ) na ALT, (179,4%  $p \leq 0,05$ ) na creatinina e (52,3%  $p \leq 0,05$ ) ácido úrico, no grupo de machos V15<sub>50</sub>, já no grupo V15<sub>25</sub>, houve aumento (69,5%  $p \leq 0,05$ ) na globulina e redução (69,5%  $p \leq 0,05$ ) na albumina desses animais (tabela 6). No grupo das fêmeas, foi observado aumento (56,6%  $p \leq 0,05$ ) e (115,6%  $p \leq 0,05$ ) na ALT nos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub> respectivamente. no grupo V15<sub>25</sub>, houve elevação (16,7%  $p \leq 0,05$ ) nos níveis de ureia em relação ao controle e (12,5%  $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo V15<sub>50</sub>. Foi observada ainda, redução nos níveis de colesterol (13,4%  $p \leq 0,05$ ) e triglicerídeos (28,3%  $p \leq 0,05$ ), nos grupos V15<sub>50</sub> e V15<sub>25</sub> respectivamente.

Tabela 6 - Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias nos parâmetros bioquímicos de camundongos *swiss* machos e fêmeas.

<b>Machos</b>			
	<b>Controle</b>	<b>V15<sub>25</sub></b>	<b>V15<sub>50</sub></b>
AST	155,1 ± 5,0	169,9 ± 6,0	145,4 ± 8,3
ALT (U/L)	82,7 ± 7,0	103,7 ± 5,4	122,5 ± 8,3 <sup>c</sup>
Proteínas Totais (mg/dL)	4,7 ± 0,6	5,8 ± 0,4	5,2 ± 0,2
Albumina (mg/dL)	2,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1 <sup>b,d</sup>	2,7 ± 0,2
Globulina (mg/dL)	2,3 ± 0,9	3,9 ± 0,3 <sup>b,d</sup>	2,4 ± 0,2
Ureia (mg/dL)	72,1 ± 1,4	80,6 ± 0,9	69,9 ± 4,7
Creatinina (mg/dL)	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,95 ± 0,2 <sup>c,d</sup>
Ácido Úrico (mg/dL)	2,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,5 <sup>c</sup>
Colesterol Total (mg/dL)	62,8 ± 5,5	75,9 ± 6,3	74,98 ± 6,0
Triglicerídeos (mg/dL)	143,6 ± 9,5	163,1 ± 11,7	116,1 ± 5,6
<b>Fêmeas</b>			
	<b>Controle</b>	<b>V15<sub>25</sub></b>	<b>V15<sub>50</sub></b>
AST	125,2 ± 6,7	151,8 ± 9,7	159,5 ± 11,1
ALT (U/L)	73,4 ± 5,5	114,9 ± 6,5 <sup>b</sup>	158,3 ± 25,0 <sup>c</sup>
Proteínas Totais (mg/dL)	4,2 ± 0,5	4,8 ± 0,6	5,1 ± 0,1
Albumina (mg/dL)	1,8 ± 0,3	2,2 ± 0,2 <sup>d</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>c</sup>

Globulina (mg/dL)	3,5 ± 0,3	2,6 ± 0,7	1,7 ± 0,4
Ureia (mg/dL)	69,2 ± 1,1	80,8 ± 1,7 <sup>b,d</sup>	70,7 ± 2,0
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,1	0,41 ± 0,04	0,39 ± 0,02
Ácido Úrico (mg/dL)	1,9 ± 0,3	2,9 ± 0,7	3,4 ± 1,1
Colesterol Total (mg/dL)	133,0 ± 12,5	107,4 ± 11,0 <sup>b,d</sup>	124,0 ± 6,3
Triglicerídeos (mg/dL)	78,2 ± 5,6	56,1 ± 6,7 <sup>b</sup>	70,2 ± 2,3

Tabela 6 – Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

‘b’ indica significância estatística entre o grupo 25mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘c’ existe diferença estatisticamente significante entre o grupo 50mg/kg e o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘d’ existe diferença estatisticamente significante entre o grupo 25mg/kg e o grupo 50mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

O tratamento com V15, induziu alterações no perfil hematológico dos animais, promovendo aumento (61,9 %  $p \leq 0,05$ ) no CHCM, e redução (39,2%  $p \leq 0,05$ ) no Ht e (18,5%  $p \leq 0,05$ ) no VCM, no grupo dos machos tratados com a maior dose (Tabela 7). No grupo V15<sub>25</sub> foi observada redução (20,2%  $p \leq 0,05$ ) no VCM e (9,3%  $p \leq 0,05$ ) no HCM. Nas fêmeas, o V15 reduziu (69,5%  $p \leq 0,05$ ) no Ht, (25,4%  $p \leq 0,05$ ) no VCM e (46,3%  $p \leq 0,05$ ) das RBC do grupo tratado com a maior dose. Neste mesmo grupo ainda foi observado aumento (68,8%  $p \leq 0,05$ ) no HCM e (123,6%  $p \leq 0,05$ ) no CHCM destes animais. O inverso ocorreu com o grupo V15<sub>25</sub>, onde houve redução (27,88%  $p \leq 0,05$ ) e (14,8%  $p \leq 0,05$ ) para os mesmos parâmetros.

Tabela 7 - Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias nos parâmetros hematológicos de camundongos *swiss* machos e fêmeas.

<b>Machos</b>			
	<b>Controle</b>	<b>V15<sub>25</sub></b>	<b>V15<sub>50</sub></b>
Hb (g/dL)	15,2 ± 1,3	12,5 ± 0,5	14,4 ± 0,6
HT (%)	43,4 ± 4,7	32,2 ± 1,9	26,4 ± 3,2 <sup>c</sup>
VCM (pg)	58,5 ± 2,7	46,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	47,7 ± 0,4 <sup>c</sup>
HCM (pg)	20,6 ± 0,7	18,7 ± 0,7 <sup>d</sup>	27,4 ± 3,2
CHCM (g/dL)	35,5 ± 1,8	38,6 ± 1,1	57,4 ± 6,8 <sup>c</sup>
RDW (%)	14,0 ± 0,7	13,3 ± 0,1	14,5 ± 0,4
RBC (Células/mm <sup>3</sup> )	6,8 ± 0,5	6,9 ± 0,5	5,5 ± 0,7
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	531600 ±	778000 ±	942750 ±
	86940,6	23357,6	173382,2
Monócitos (%)	6,9 ± 1,0	7,7 ± 0,3	7,6 ± 2,5
Linfócitos (%)	89,5 ± 2,1	89,0 ± 0,3	87,4 ± 4,0

Leucócitos (%)	5020,0 ± 1167,2	4100,0 ± 1046,4	7780,0 ± 829,7
<b>Fêmeas</b>			
	<b>Controle</b>	<b>V15<sub>25</sub></b>	<b>V15<sub>50</sub></b>
Hb (g/dL)	13,8 ± 0,6	11,2 ± 0,8	11,4 ± 0,7
HT (%)	37,3 ± 1,6	35,3 ± 2,4	11,4 ± 5,8 <sup>c</sup>
VCM (pg)	56,8 ± 5,4	47,3 ± 0,8	42,4 ± 0,4 <sup>c</sup>
HCM (pg)	20,9 ± 1,1	15,1 ± 0,4 <sup>b,d</sup>	35,3 ± 7,0 <sup>c</sup>
CHCM (g/dL)	37,3 ± 2,3	31,8 ± 0,4 <sup>b,d</sup>	83,5 ± 17,5 <sup>c</sup>
RDW (%)	14,8 ± 0,5	13,9 ± 0,2	15,2 ± 0,2
RBC (Células/mm <sup>3</sup> )	6,7 ± 0,6	7,4 ± 0,4	3,6 ± 0,9 <sup>c,d</sup>
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	438825 ± 138206	499000 ± 144721	911666 ± 162351
Monócitos (%)	3,5 ± 0,6	4,9 ± 0,6	6,1 ± 1,3
Linfócitos (%)	88,3 ± 4,7	91,1 ± 0,6	90,4 ± 2,4
Leucócitos (%)	7450,0 ± 2750,0	6350,0 ± 1283,5	5333,3 ± 2078,7

Tabela 7 – Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ .

‘b’ indica significância estatística entre o grupo 25mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘c’ indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

‘d’ indica significância estatística entre o grupo 25mg/kg e o grupo 50mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

Houve uma redução transitória da glicemia (22,0%  $p \leq 0,05$ ) e (30,1%  $p \leq 0,05$ ) nos animais machos dos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub>, no 7º dia de tratamento (figura 9). No grupo das fêmeas, não houve alteração ao longo dos 28 dias de tratamento. Em relação a temperatura, o V15 provocou aumento (5,5 %  $p \leq 0,05$ ) e (3,2%  $p \leq 0,05$ ) no grupo de machos tratados com 25mg/kg e 50mg/kg de V15, apenas no 14º dia de tratamento. No grupo das fêmeas, foi observado um aumento de (5,1 %  $p \leq 0,05$ ) no 7º, 21º e 28º dia de tratamento, no grupo que recebeu a maior dose, não houve alteração nos demais grupos.

Figura 9 – Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias sobre a glicemia (A, B) e temperatura (C, D) de camundongos *swiss* machos (A, C) e fêmeas (B, D).

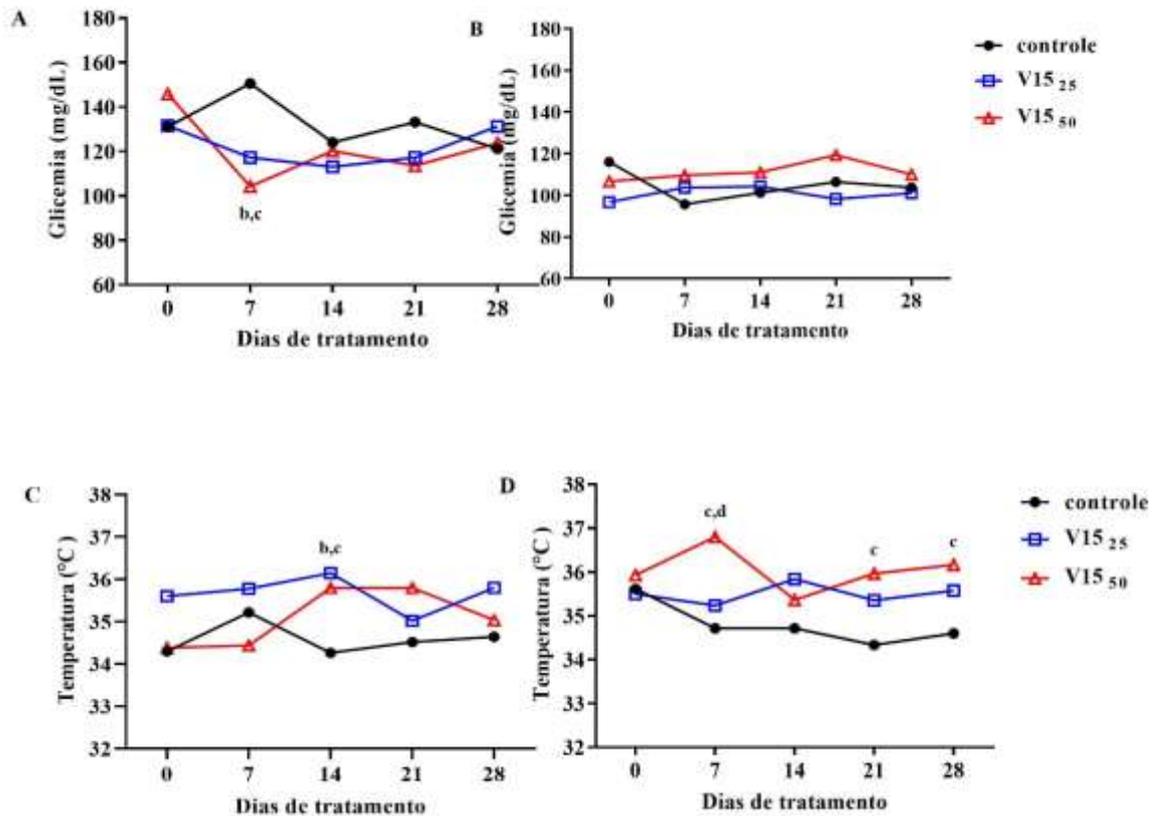


Figura 9 – Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ . 'b' indica significância estatística entre o grupo 25mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ). 'c' indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ). 'd' existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo 25mg/kg e o grupo 50mg/kg ( $p \leq 0,05$ ).

O V15 provocou alterações nos marcadores do estresse oxidativo, nos animais machos a redução foi apenas nos níveis de MDA (32,4 %  $p \leq 0,05$ ) no grupo V15<sub>25</sub> e (33,9 %  $p \leq 0,05$ ) no grupo V15<sub>50</sub>, ao final do tratamento. Já no grupo das fêmeas houve aumento (103,1 %  $p \leq 0,05$ ) nos níveis de SOD, (108,3 %  $p \leq 0,05$ ) nos níveis de GSSG, no grupo V15<sub>25</sub>. Foi observada ainda redução (50,0 %  $p \leq 0,05$ ) e (42,9 %  $p \leq 0,05$ ) na relação GSH/GSSG e (50,0 %  $p \leq 0,05$ ) e (42,9 %  $p \leq 0,05$ ) nos níveis de nitrito dos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub> respectivamente.

Tabela 8 – Efeito da administração oral do V15 em doses repetidas por 28 dias sobre os parâmetros do estresse oxidativo de camundongos *swiss* machos e fêmeas.

Machos	Controle	V15 <sub>25</sub>	V15 <sub>50</sub>
	GSH (nmol/mg ptn)	10,2 $\pm$ 0,3	10,4 $\pm$ 0,4
GSSG (nmol/mg ptn)	7,4 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,6

GSH/GSSG (nmol/mg ptn)	1,39 ± 0,07	1,42 ± 0,07	1,40 ± 0,05
MDA (U/mg ptn)	7,1 ± 0,3	4,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,5 <sup>b</sup>
Nitrito (µM/mg ptn)	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1
SOD (U/mg ptn)	19,9 ± 3,2	12,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	15,7 ± 1,3 <sup>c</sup>
CAT (U/mg ptn)	0,023 ± 0,005	0,027 ± 0,010	0,028 ± 0,010
<b>Fêmeas</b>			
	<b>Controle</b>	<b>V15<sub>25</sub></b>	<b>V15<sub>50</sub></b>
GSH (nmol/mg ptn)	6,6 ± 0,2	7,2 ± 0,2	6,9 ± 0,2
GSSG (nmol/mg ptn)	2,4 ± 0,4	5,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,1 <sup>c</sup>
GSH/GSSG (nmol/mg ptn)	2,8 ± 0,5	1,4 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,10 <sup>c</sup>
MDA (U/mg ptn)	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Nitrito (µM/mg ptn)	2,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>c</sup>
SOD (U/mg ptn)	16,6 ± 3,6	33,7 ± 3,8 <sup>b</sup>	24,3 ± 4,3
CAT (U/mg ptn)	0,011 ± 0,003	0,029 ± 0,008	0,026 ± 0,004

Tabela 8 – Os valores são expressos como média ± erro padrão, com significância estatística valor de  $p \leq 0,05$ . ‘b’ indica significância estatística entre o grupo 25mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ). ‘c’ indica significância estatística entre o grupo 50mg/kg vs. o controle ( $p \leq 0,05$ ).

#### 6.4 Análise histopatológica de tecido Renal e Hepático de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com V15

A análise histopatológica foi realizada para identificar possíveis alterações microscópicas no fígado e rins. Os grupos controles machos e fêmeas apresentaram estrutura hepática preservadas, sem alteração na veia centrolobular e capilares sinusóides (figura 10). Nos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub>, machos e fêmeas, foi observada arquitetura dos hepatócitos desorganizada, aumento do calibre dos capilares sinusóides e degeneração hidrópica com turvação no citoplasma de alguns hepatócitos. Foi observado ainda acúmulo de gotículas de gordura no tecido hepático, indicando esteatose hepática, apenas no grupo de machos tratados com 25mg/kg de V15.

No tecido renal dos animais controles machos e fêmeas, a estrutura dos rins estavam preservadas, sem alterações nos glomérulos, espaço capsular glomerular e túbulos renais (figura 11). Nos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub>, machos e fêmeas, foi observado aumento do espaço capsular glomerular, redução no volume dos tufos capilares, desorganização da arquitetura dos túbulos renais, além de descamação do núcleo de algumas células de revestimento dos túbulos renais.

Figura 10 – Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com V15

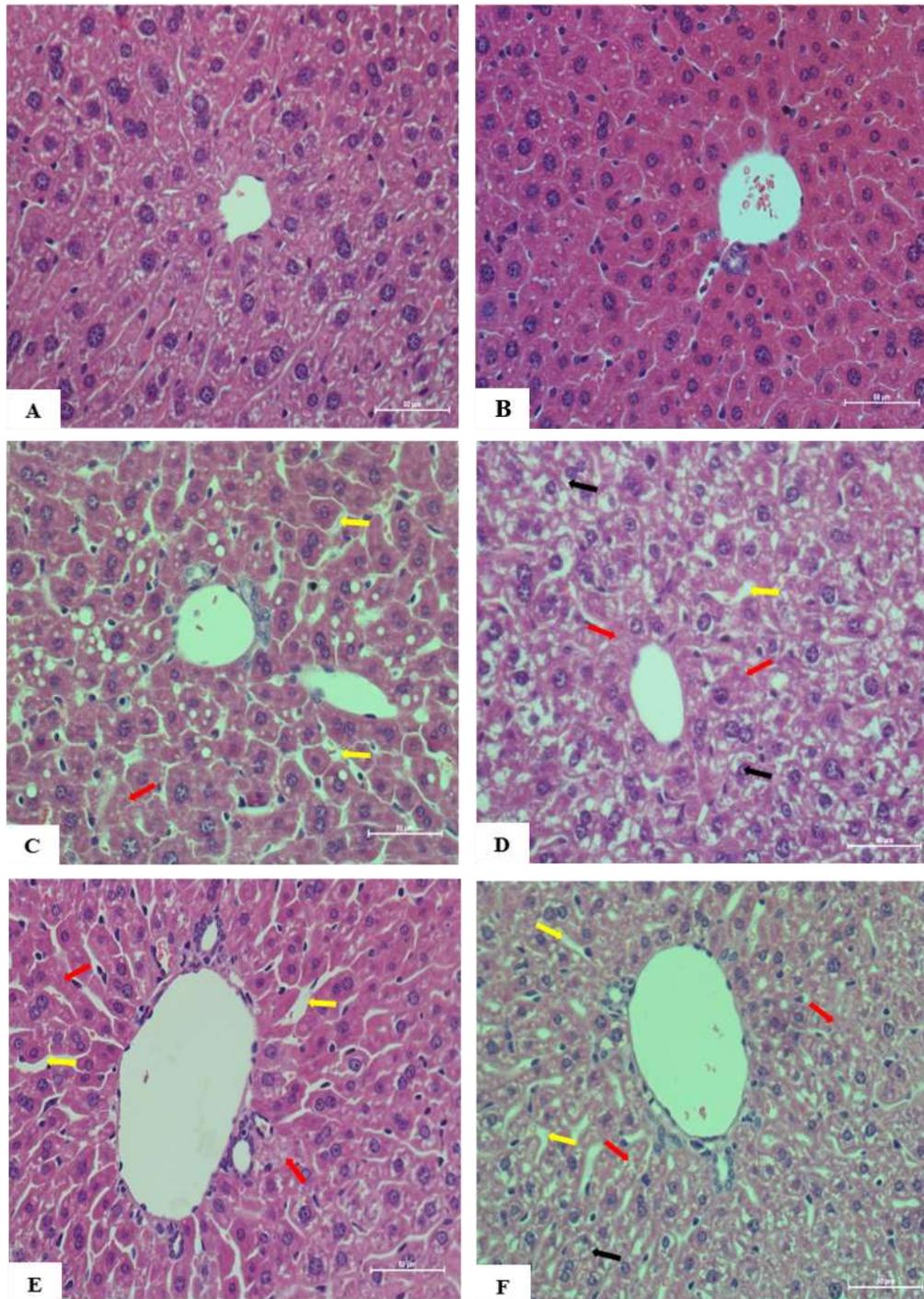


Figura 10 – Efeito do V15 sobre o tecido hepático de camundongos. (A e B) Fígado dos camundongos controles machos e fêmeas (HE – 50 µm). (C e D) Fígado dos camundongos machos e fêmeas, tratados com 25mg/kg de V15 (HE – 50 µm). (E e F) Fígado dos camundongos machos e fêmeas, tratados com 50mg/kg de V15 (HE – 50 µm).

- = Aumento no calibre dos capilares sinusóides.
- = Ausência de núcleo em alguns hepatócitos.
- = Degeneração hidrópica com turvação do citoplasma.

Figura 11 – Análise histopatológica do tecido renal de camundongos *swiss* machos e fêmeas tratados com V15.

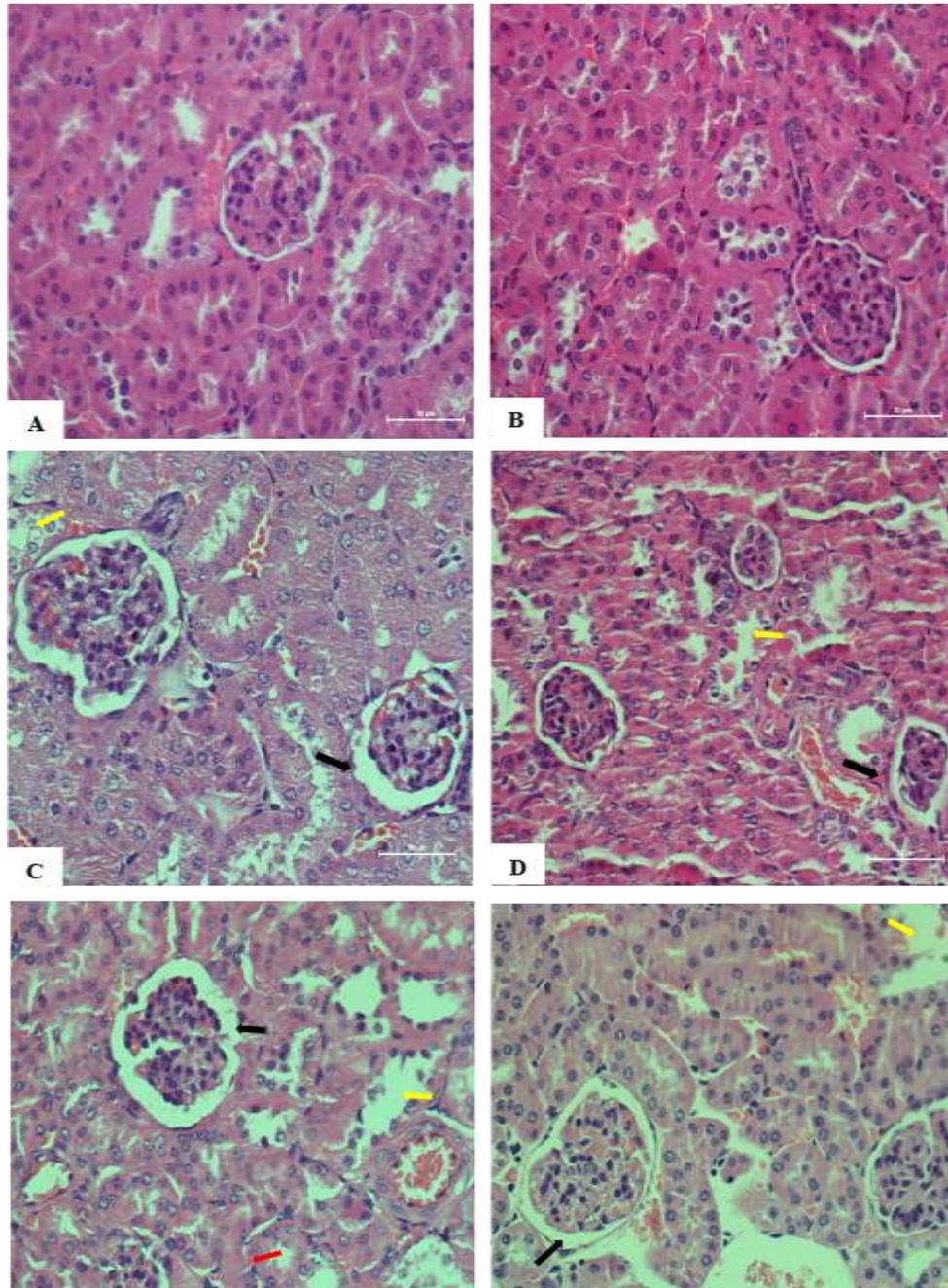


Figura 11 – Efeito do V15 sobre o tecido renal de camundongos. (A e B) rins dos camundongos controles machos e fêmeas (HE – 50  $\mu$ m). (C e D) Rins dos camundongos machos e fêmeas, tratados com 25mg/kg de V15 (HE – 50  $\mu$ m). (E e F) Rins dos camundongos machos e fêmeas, tratados com 25mg/kg de V15 (HE – 50  $\mu$ m).

- ↗ = Descamação do núcleo de algumas células de revestimento dos túbulos renais.
- ↗ = Desorganização da arquitetura dos túbulos renais.
- ↗ = Aumento do espaço capsular glomerular.

## 7 DISCUSSÃO

O vanádio é um oligoelemento, que pode ser benéfico e possivelmente essencial em humanos (CRANS *et al.*, 2004). Seus compostos têm atraído pesquisadores por seu potencial terapêutico, bem documentado na literatura. Diversos estudos atribuem a esse metal propriedades antihiperlipemiantes, com efeito mimético a insulina e tratamento de diferentes doenças, como dislipidemia, câncer, sífilis e tuberculose (FATOLA *et al.*, 2019; MUKHEERJEE *et al.* 2004; ŚCIBIOR *et al.*, 2020). Entretanto o uso clínico é limitado pela toxicidade dos compostos de V. Até então não conhecidos os possíveis efeitos tóxicos do V15. Portanto, estabelecemos esta pesquisa para avaliar a toxicidade do novo composto a base de vanádio, o V15, a fim de fornecer uma base experimental para sua aplicação clínica.

Os ensaios de toxicidade oral aguda, são o primeiro passo para a avaliação da toxicidade de uma substância (OCDE, 2001; ROY *et al.*, 2015). Permitindo que as mesmas sejam classificadas de acordo com o grau de toxicidade ou letalidade (OCDE, 2001). Ademais, é essencial para a identificação de doses que poderão ser utilizadas posteriormente. No ensaio de toxicidade oral aguda, desenvolvido neste estudo, não foi registrada mortalidade, sinais de toxicidade, nem alterações comportamentais, e decorrência das doses administradas. Esses achados corroboram com o estudo desenvolvido por Jiang *et al* (2017), que avaliou um composto orgânico de vanádio, o vanadil trealose, que não apresentou efeitos adversos no tratamento oral agudo em doses  $\leq 1.000$  mg/kg.

O consumo adequado de nutrientes é essencial para o estado fisiológico do animal e resposta adequada ao tratamento (ROY *et al.*, 2015). A exposição oral aguda ao V15, levou ao aumento pontual do consumo alimentar na reta final do experimento, no grupo V15<sub>2.000</sub>. Nos demais grupos o consumo alimentar não foi alterado. O tratamento oral agudo com o V15 não causou impacto sobre a ingestão hídrica dos animais, havendo um aumento transitório no consumo, apenas nos grupos que foram expostos as maiores doses V15<sub>300</sub> e V15<sub>2000</sub>, sugerindo que não houve lesão a nível de trato gastrointestinal nesses animais, nossos achados diferem dos resultados encontrados por Roberts *et al* (2016) que mostram redução no consumo hídrico e alimentar dos animais expostos ao metavanadato de sódio.

Apesar do aumento no consumo alimentar e hídrico, não houve impacto sobre o peso corporal dos animais. No entanto, foi observada alteração no peso relativo dos órgãos do grupo tratado com 2.000 mg/kg, observou-se um aumento significativo no peso do fígado desses animais em comparação aos demais grupos. O fígado é um órgão complexo e essencial nos processos de detoxificação de xenobióticos e excreção de metabólitos (ILAVENIL *et al.*, 2016).

O aumento no peso hepático nesses animais pode indicar que o fígado é um alvo em potencial após a exposição oral a compostos de vanádio, podendo estar relacionado também ao aumento de enzimas de desintoxicação hepática em decorrência ao dano causado (ROY *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2016).

Parâmetros bioquímicos também são utilizados como indicadores de toxicidade, pois refletem metabolicamente o estado fisiológico em que os animais se encontram durante o tratamento (FONSECA *et al.*, 2018). A função hepática foi avaliada através da análise das transaminases hepáticas, o aumento significativo da ALT, foi observado no grupo V15<sub>2000</sub> em relação ao grupo de V15<sub>50</sub> e ao controle ( $p \leq 0,05$ ). Já a AST, teve elevação significativa no grupo de V15<sub>50</sub> mg/kg ( $p \leq 0,05$ ). Tais alterações nos níveis de transaminases hepáticas são um indicativo de lesão no tecido hepático. Também foram observadas alterações significantes ( $p \leq 0,05$ ), em outros parâmetros bioquímicos como a elevação das proteínas totais, albumina e globulina, na maior dose administrada (tabela 3). Corroborando com o ensaio de toxicidade realizado por Roy *et al* (2015), que registrou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com um complexo vanádio-rutina.

A toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias, é um teste realizado após informações iniciais obtidas em testes de toxicidade oral aguda anteriormente realizados, esse teste busca analisar efeitos adversos decorrentes da administração consecutiva de determinada substância (OECD, 2008). No nosso ensaio de toxicidade por doses repetidas por 28 dias, foi registrada mortalidade e sinais de toxicidade nos camundongos machos e fêmeas ao longo do tratamento. No grupo dos machos V15<sub>25</sub> foi registrada a morte de 1 animal, já no grupo das fêmeas foi registrada mortalidade de 2 animais no grupo V15<sub>50</sub> e dos 5 animais do grupo V15<sub>300</sub>. Os sinais de toxicidade observados nesses animais foram: piloereção, tremores, postura curvada e letargia. Além desses, os animais ainda apresentaram perda ponderal e redução da ingestão de hídrica e de alimentos transitoriamente. Achados semelhantes foram encontrados em um estudo com metavanadato de sódio, conduzido por Roberts *et al* (2016).

Nos animais fêmeas que receberam a dose de 300 mg/kg, foi observada descoloração no tecido hepático e hepatomegalia na autopsia bruta. Ademais, houve a interrupção da ingestão hídrica e alimentar, como também perda ponderal. Os camundongos fêmeas parecem ser mais sensíveis aos efeitos da exposição ao V15 em comparação aos camundongos machos. Alterações no peso refletem efeitos adversos de drogas e substâncias químicas, sendo considerado significativo quando a perda for de 10% do peso inicial (JOTHY *et al.*, 2011). A sobrevivência desses animais foi avaliada através da curva de Kaplan-Meier e a letalidade foi de 100%, 40% e 20% em camundongos fêmeas tratados com 300mg/kg, 50mg/kg e 25mg/kg,

respectivamente, em comparação com aqueles que receberam apenas solução salina. No macho a mortalidade foi de 20% apenas com 25mg/kg (figura 7).

O peso corporal, assim como o peso dos órgãos dos animais foi avaliado, esses parâmetros refletem a toxicidade após a exposição a substâncias tóxicas (JOTHY et al., 2011). Alterações no peso corporal são indicadores de efeitos adversos a drogas e produtos químicos (NANDY & DATTA, 2012). Nosso estudo mostrou que houve um aumento gradativo no peso corporal no grupo dos animais machos, porém foi insignificante estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ). Já no grupo das fêmeas, foi registrado um ganho ponderal transitório no 28º dia de tratamento, no grupo que recebeu a dose de 25 mg/kg, em comparação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). Alguns estudos relacionam a redução do peso corporal à efeitos adversos ao tratamento (JIANG *et al.*, 2017; EKEANYANWU & NJOKU, 2014).

O peso relativo dos órgãos é um indicador importante do estado fisiológico e patológico em que os animais se encontram, sendo fundamental para determinar se o órgão foi ou não exposto a lesão (JOTHY et al., 2011). Nesse estudo, foi observado que o peso relativo dos rins tanto do grupo de machos quanto de fêmeas na dose de 50mg/kg foi significativamente menor em relação ao controle. Foi constatado ainda no grupo das fêmeas tratadas com 25 e 50mg/kg de V15, a redução significativa do tecido adiposo retroperitoneal, ovários e útero em relação as fêmeas do grupo controle. Essa redução pode estar associada a um efeito tóxico ocasionado pelo tratamento.

A ingestão adequada de nutrientes é fundamental para a manutenção do estado fisiológico dos animais (IVERSEN & NICOLAYSEN, 2003). Houve uma redução significativa no consumo alimentar apenas no grupo dos animais machos, tratados com as

doses 50 mg/kg e 25 mg/kg, no 1º e 21º dia de tratamento respectivamente. Essa redução pode ter sido causada por uma irritação transitória na mucosa gastrointestinal desencadeada pelo tratamento. A redução temporária no consumo alimentar descrita no presente estudo foi semelhante aos resultados de Roy *et al* (2015). Em relação ao consumo hídrico, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O sistema hematopoiético também é um importante indicador do estado fisiológico e patológico em humanos e animais, devido a sua sensibilidade a compostos tóxicos (ADENEYE *et al.*, 2006). No presente estudo, foi observada a redução no Ht, VCM e HCM nos animais machos e fêmeas tratados com as doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg. Ainda no grupo V15<sub>50</sub>, foi registrado um aumento no CHCM, para ambos os sexos. No grupo das fêmeas V15<sub>50</sub>, ainda foi observada a redução na contagem das células vermelhas, essa diminuição pode ser resultante da hemólise causada pela ação pro-oxidativa do vanádio (ZAPOROWSKA & SCIBIOR, 1998).

Esses indícios também podem indicar que o V15 possa ter levado a um quadro de anemia nesses animais (CALIXTO-LIMA, 2012). No estudo de Jiang *et al* (2017) não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros hematológicos, supõe-se que as divergências entre os resultados encontrados neste estudo e os resultados encontrados por Jiang *et al* (2017) podem ser devido a dose, e ao composto de vanádio utilizados.

Os parâmetros bioquímicos refletem metabolicamente o estado fisiológico dos animais submetidos ao estudo de toxicidade (FONSECA *et al.*, 2018). As transaminases ALT e AST podem ser usadas como biomarcadores de danos hepáticos e degradação de proteínas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2011). A ALT é uma enzima citosólica encontrada em altas concentrações no tecido hepático (EKEANYANWU & NJOKU, 2014). O aumento significativo da ALT, foi observado no grupo dos machos tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg e no grupo das fêmeas na dose de 50 mg/kg, quando comparados ao grupo controle. Essas alterações indicam que ocorrência de lesão hepatocelular. Os achados nesse experimento corroboram com o ensaio de toxicidade desenvolvido por Roy *et al* (2015) que encontrou resultado semelhante.

A AST distribui-se entre o citoplasma e as mitocôndrias, sua elevação está relacionada a perda da integridade funcional da membrana celular com extravasamento da enzima para a circulação (SHRIVASTAVA *et al.*, 2011), apesar de não ser um marcador específico para lesão hepática. Neste estudo, não houve elevação significativa nos níveis de AST. Outros parâmetros como albumina, foi achada elevada no grupo de fêmeas tratadas com as doses de 25 e 50 mg/kg. Já no grupo de machos de V15<sub>25</sub> mostrou-se reduzida. A hipoalbuminemia pode estar relacionada a doenças hepáticas, infecção e inflamações. A função renal, foi avaliada através da dosagem de creatinina sérica. Níveis elevados foram encontrados apenas no grupo de machos tratados com a maior dose, a elevação nos níveis de creatinina indica a ocorrência de lesão renal nesses animais. Um experimento anterior conduzido por Roy *et al* (2015), registrou resultados semelhantes nos animais que receberam a maior dose de complexo vanádio-rutina.

A toxicidade de diversos metais, incluindo o vanádio, está ligada a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando um estresse oxidativo na célula (SHI *et al.*, 2004). A depleção de GSH e alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD e Catalase, são consideradas marcadores do estresse oxidativo (SPEAR & AUST, 1995). Sob nossas condições experimentais, foram observadas alterações nos níveis de MDA apenas nos animais machos, nos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub> ao final do tratamento. Já no grupo das fêmeas do grupo V15<sub>25</sub>, os níveis de SOD e GSSG estavam aumentados no grupo V15<sub>25</sub>. Foi observada

ainda redução na relação GSH/GSSG, como também nos níveis de nitrito dos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub> respectivamente.

A níveis de glicose sanguíneos podem ser alterados por diversos fatores, como dieta, absorção intestinal e até mesmo pelo estresse (FONSECA *et al.*, 2018). Foi registrada uma redução transitória da glicemia dos camundongos machos tratados com 50 mg/kg de V15, no 7º dia de tratamento. Já no grupo das fêmeas não foram observadas alterações. O sistema termorregulador eleva a temperatura corporal como uma reação de defesa contra patógenos invasores e infecções (NAKAMURA, 2010). Neste experimento não foram registradas alterações significativas no grupo de machos, enquanto que no grupo das fêmeas exposto a dose de 50 mg/kg de V15, mostrou-se elevada no 7º, 21º e 28º dia de tratamento.

O fígado é essencial nos processos de biotransformação, detoxificação de xenobióticos e excreção de metabólitos (ILAVENIL *et al.*, 2016). Já os rins tem por função principal a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos renais, além de excreção de diversas substâncias. São considerados potenciais alvos de bioacumulação e efeitos tóxicos do vanádio. Através das análises histopatológicas do fígado e rins foi possível constatar alterações nos tecidos hepático e renal.

O estudo histopatológico do fígado mostrou que o V15 induziu um desarranjo na arquitetura dos hepatócitos e aumento do calibre dos capilares sinusóides, além de degeneração hidrópica vista nos hepatócitos. No tecido renal foi observado aumento do espaço capsular glomerular, redução no volume dos tufo capilares, desorganização da arquitetura dos túbulos renais e descamação do núcleo de algumas células de revestimento dos túbulos renais. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Roy *et al* (2015), que constatou lesão hepática e renal após a exposição ao complexo vanádio-rutina e De la Torre *et al* (1999) que demonstraram a tendência do vanádio em acumular-se no rim predispondo a nefrotoxicidade.

A administração de V15 em doses repetidas por 28 dias, causou lesões importantes no tecido hepático dos animais machos e fêmeas dos grupos V15<sub>25</sub> e V15<sub>50</sub>, confirmados através da avaliação histopatológica e elevação nos níveis de ALT um importante marcador de lesão hepática. Em relação ao tecido renal, também foram constatadas lesões em decorrência ao tratamento com o V15, comprovadas pela análise histopatológica e biomarcadores da função renal. Entretanto, não houve elevação nos níveis séricos de creatinina, indicando que a nefropatia ainda não era grave.

Em resumo, foram encontradas alterações significantes nos biomarcadores da função hepática, bem como anormalidades estruturais a nível de tecido hepático e renal dos animais tratados com V15 no final do experimento de 28 dias. Indicando que o V15 causou toxicidade

importante quando administrado em doses repetidas por 28 dias. Esses resultados podem fornecer uma base experimental para outros ensaios pré-clínicos na busca de elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos do V15.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Agudamente, o V15 não alterou os parâmetros comportamentais ou produziu mortalidade nos animais tratados, o que sugere a categoria 5 do sistema de classificação global harmonizado de substâncias e misturas (GHS). Todavia, o V15 se mostrou tóxico no ensaio de doses repetidas a partir de  $\geq 25\text{mg/kg}$ . Foram observados efeitos colaterais, mortalidade e prejuízos à função hepática nos animais em decorrência ao tratamento, o que limita o uso terapêutico deste composto no tratamento de doenças metabólicas como o diabetes, ou no tratamento do câncer.

## REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, Olamide; OBISESAN, Ayobami; OLAYEMI, Funsho; OLOPADE, James. Protective effect of ethanolic extract of *Grewia carpinifolia* leaves on vanadium induced toxicity. **Alexandria Journal Of Veterinary Sciences**, Alexandria, v. 47, n. 1, p. 24, 2015. ScopeMed. <http://dx.doi.org/10.5455/ajvs.189645>.
- ADENEYE, A.A. et al. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 105, n. 3, p. 374-379, maio 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.027>.
- ALLOWAY, Brian J. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. In: ALLOWAY, B. (ed.). **Environmental Pollution**, Dordrecht: Springer, 2013. pp. 11-50. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_2).
- ALTHUMAIRY, Duaa; POSTAL, Kahoana; BARISAS, B George; NUNES, Giovana G; A ROESS, Deborah; CRANS, Debbie C. Polyoxometalates function as indirect activators of a G protein-coupled receptor. **Metallomics**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1044-1061, 15 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1039/d0mt00044b>.
- AURELIANO, Manuel; GUMEROVA, Nadiia I.; SCIORTINO, Giuseppe; GARRIBBA, Eugenio; ROMPEL, Annette; CRANS, Debbie C.. Polyoxovanadates with emerging biomedical activities. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v. 447, p. 214143, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214143>.
- AZEEZ, Idris A.; OLOPADE, Funmilayo; LAPERCHIA, Claudia; ANDRIOLI, Anna; SCAMBI, Ilaria; ONWUKA, Silas K.; BENTIVOGLIO, Marina; OLOPADE, James O.. Regional Myelin and Axon Damage and Neuroinflammation in the Adult Mouse Brain After Long-Term Postnatal Vanadium Exposure. **Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology**, Oxford, v. 75, n. 9, p. 843-854, 6 jul. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnen/nlw058>.
- BARCELOUX, Donald G.; BARCELOUX, Donald. Vanadium. **Journal Of Toxicology: Clinical Toxicology**, New York, v. 37, n. 2, p. 265-278, jan. 1999. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/clt-100102425>.
- BAROCH, Edmund F.; STAFF, Updated By. Vanadium and Vanadium Alloys. **Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology**, New York, v. 5, n. 5, p. 512-528, 19 abr. 2013. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.22011401.a01.pub3>.
- BAYRAK, Bertan Boran; TUNALI, Sevim; BAL-DEMIRCI, Tulay; ULKUSEVEN, Bahri; YANARDAG, Refiye. Glycoprotein levels and oxidative lung injury in experimental diabetes: effect of oxovanadium(iv) complex based on thiosemicarbazone. **Toxicology Mechanisms And Methods**, London, v. 31, n. 8, p. 581-588, 9 jul. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2021.1941462>.
- BHARATHI, B. Vijaya; PRAKASH, G. Jaya; KRISHNA, K. M.; KRISHNA, C. H. Ravi; SIVANARAYANA, T.; MADAN, K.; RAJU, G. A. Rama; ANNAPURNA, A.. Protective effect of alpha glucosyl hesperidin (G-hesperidin) on chronic vanadium induced testicular

toxicity and sperm nuclear DNA damage in male Sprague Dawley rats. **Andrologia**, Berlin, v. 47, n. 5, p. 568-578, 9 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/and.12304>.

BIN-JALIAH, Ismaeel; SAKR, Hussein F.; MORSY, Mohamed D.; DALLAK, Mohamed; HAIDARA, Mohamed A.. Modulatory Effect of Concomitant Administration of Insulin and Vanadium on Inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetic Rats: Role of Adiponectin. **Chin J Physiol.**, Taipei, v. 61, n. 1, p. 42-49, 28 fev. 2018.

BISHAYEE, Anupam; WAGHRAY, Abhijeet; PATEL, Mehool A.; CHATTERJEE, Malay. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 294, n. 1, p. 1-12, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.030>.

BOSCOLO, P; CARMIGNANI, M; VOLPE, A R; FELACO, M; ROSSO, G del; PORCELLI, G; GIULIANO, G. Renal toxicity and arterial hypertension in rats chronically exposed to vanadate. **Occupational And Environmental Medicine**, London, v. 51, n. 7, p. 500-503, 1 jul. 1994. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.51.7.500>.

CARPIO, Edgar del; HERNÁNDEZ, Lino; CIANGHEROTTI, Carlos; COA, Valentina Villalobos; JIMÉNEZ, Lissette; LUBES, Vito; LUBES, Giuseppe. Vanadium: history, chemistry, interactions with  $\alpha$ -amino acids and potential therapeutic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v. 372, p. 117-140, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2018.06.002>.

CINTAS, Pedro. The Road to Chemical Names and Eponyms: discovery, priority, and credit. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim/Bergstr, v. 43, n. 44, p. 5888-5894, 12 nov. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200330074>.

CORREIA, Isabel; ADÃO, Pedro; ROY, Somnath; WAHBA, Mohamed; MATOS, Cristina; MAURYA, Mannar R.; MARQUES, Fernanda; PAVAN, Fernando R.; LEITE, Clarice Q.F.; AVECILLA, Fernando. Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, Columbia, South Carolina, v. 141, p. 83-93, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.019>.

CRANS, Debbie C.; GAMBINO, Dinorah; ETCHEVERRY, Susana B.. Vanadium science: chemistry, catalysis, materials, biological and medicinal studies. **New Journal Of Chemistry**, London, v. 43, n. 45, p. 17535-17537, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9nj90156f>.

CRANS, Debbie C.; SMEE, Jason J.; GAIDAMAUSKAS, Ernestas; YANG, Luqin. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. **Chemical Reviews**, Easton, Pa, v. 104, n. 2, p. 849-902, 29 jan. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr020607t>.

CUESTA, Santiago; PROIETTO, Ramiro; GARCÍA, Graciela Beatriz. Astroglialosis and HSP 70 activation in neonate rats' brain exposed to sodium metavanadate through lactation. **Neurotoxicology And Teratology**, Elmsford, NY, v. 37, p. 57-62, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2013.03.002>.

EKEANYANWU, Raphael Chukwuma; NJOKU, Obioma Uzoma. Acute and subacute oral toxicity study on the flavonoid rich fraction of *Monodora tenuifolia* seed in albino rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 4, n. 3, p. 194-202, mar. 2014. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691\(14\)60231-8](http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691(14)60231-8).

EVANGELOU, Angelos M.. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 42, n. 3, p. 249-265, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00221-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00221-9).

FATOLA, Olanrewaju I.; OLAOLORUN, Francis A.; OLOPADE, Funmilayo E.; OLOPADE, James O.. Trends in vanadium neurotoxicity. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 145, p. 75-80, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.010>.

FOLARIN, O. R.; ADARAMOYE, O. A.; AKANNI, O. O.; OLOPADE, J. O.. Changes in the brain antioxidant profile after chronic vanadium administration in mice. **Metabolic Brain Disease**, New York, v. 33, n. 2, p. 377-385, 25 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-017-0070-9>.

FOLARIN, Oluwabusayo; OLOPADE, Funmilayo; ONWUKA, Silas; OLOPADE, James. Memory Deficit Recovery after Chronic Vanadium Exposure in Mice. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, Austin, v. 2016, p. 1-7, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4860582>.

FONSECA, Aldilane Gonçalves; DANTAS, Luzia Leiros Sena Fernandes Ribeiro; FERNANDES, Júlia Moraes; ZUCOLOTTI, Silvana Maria; LIMA, Adley Antoninni Neves; SOARES, Luiz Alberto Lira; ROCHA, Hugo Alexandre Oliveira; LEMOS, Telma Maria Araújo Moura. In Vivo and In Vitro Toxicity Evaluation of Hydroethanolic Extract of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves. **Journal Of Toxicology**, Cairo, Egypt, v. 2018, p. 1-8, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6849765>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods In Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

HERNÁNDEZ, Lino; ARAUJO, Mary Lorena; MADDEN, Waleska; CARPIO, Edgar del; LUBES, Vito; LUBES, Giuseppe. Vanadium complexes with polypyridyl ligands: speciation, structure and potential medicinal activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 229, p. 111712, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111712>.

HISSIN, Paul J.; HILF, Russell. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 74, n. 1, p. 214-226, jul. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).

ILAVENIL, Soundharrajan; AL-DHABI, Naif; SRIGOPALRAM, Srisesharam; KIM, Young Ock; AGASTIAN, Paul; BARU, Rajasekhar; CHOI, Ki; ARASU, Mariadhas Valan. Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats—A Proteomic Approach. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 21, n. 2, p. 161, 28 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020161>.

IMTIAZ, Muhammad; RIZWAN, Muhammad Shahid; XIONG, Shuanglian; LI, Hailan; ASHRAF, Muhammad; SHAHZAD, Sher Muhammad; SHAHZAD, Muhammad; RIZWAN, Muhammad; TU, Shuxin. Vanadium, recent advancements and research prospects: a review.

**Environment International**, Oxford, v. 80, p. 79-88, jul. 2015. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.018>.

IMURA, Hitomi; SHIMADA, Akinori; NAOTA, Misaki; MORITA, Takehito; TOGAWA, Masako; HASEGAWA, Tatsuya; SEKO, Yoshiyuki. Vanadium Toxicity in Mice. **Toxicologic Pathology**, Newark, v. 41, n. 6, p. 842-856, 6 dez. 2012. SAGE Publications.  
<http://dx.doi.org/10.1177/0192623312467101>.

IVERSEN, Per O. et al. Water-for life. **Tidsskrift For Den Norske Laegeforening**, Norway, v. 123, n. 23, p. 3402-3405, jan. 2003.

KAKKAR, Rakesh; KALRA, Jawahar; MANTHA, Subrahmanyam V.; PRASAD, Kailash. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Molecular And Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 151, n. 2, p. 113-119, out. 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01322333>.

KORBECKI, Jan; BARANOWSKA-BOSIACKA, Irena; GUTOWSKA, Zabela; CHLUBEK, Dariusz. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 2, n. 59, p. 195-200, jun. 2012.

LANGMAN, Loralie J.; KAPUR, Bhushan M.. Toxicology: then and now. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 39, n. 5, p. 498-510, maio 2006. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.03.004>.

LATORRE, Antonio de; GRANERO, Salvador; MAYAYO, Emilio; CORBELLA, Jacinto; DOMINGO, Jose L.. Effect of age on vanadium nephrotoxicity in rats. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 75-82, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274\(98\)00385-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274(98)00385-3).

LIMA, Lidiane Macedo Alves de; SILVA, Amanda Katielly Jordão Pessoa Felix da; MENDONÇA, Thayná Ferreira de; SILVA, José Paulino da; MOURA, Severino Vitor do Nascimento; BATISTA, Eucilene Kélita de Lima; LIRA, Eduardo Carvalho; SILVA, Wagner Eduardo da; BELIAN, Mônica Freire. "Rediscovering and Redesigning" Strategies for Obtaining Vanadium Complexes with Antidiabetic Activity. **Revista Virtual de Química**, Niterói-RJ, v. 13, n. 4, p. 933-952, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).  
<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20210020>.

LIU, Juan; CUI, Hengmin; LIU, Xiaodong; PENG, XI; DENG, Junliang; ZUO, Zhicai; CUI, Wei; DENG, Yuanxin; WANG, Kangping. Dietary High Vanadium Causes Oxidative Damage-Induced Renal and Hepatic Toxicity in Broilers. **Biological Trace Element Research**, London, v. 145, n. 2, p. 189-200, 1 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-011-9185-8>.

LU, Ling-Pan; SUO, Feng-Zhi; FENG, Ya-Li; SONG, Li-Li; LI, Ying; LI, Yang-Jie; WANG, Kai-Ti. Synthesis and biological evaluation of vanadium complexes as novel anti-tumor agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 176, p. 1-10, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.073>.

MANNAZZU, I; GUERRA, E; STRABBIOLI, R; A MASIA,; MAESTRALE, G.B; ZORODDU, M.A; FATICHENTI, F. Vanadium affects vacuolation and phosphate

metabolism in *Hansenula polymorpha*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 23-28, 17 jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10215.x>.

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Rwin. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **The Journal Of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 25 maio 1972.

MONAKHOV, Kirill Yu.; BENSCH, Wolfgang; KÖGERLER, Paul. Semimetal-functionalised polyoxovanadates. **Chemical Society Reviews**, London, v. 44, n. 23, p. 8443-8483, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5cs00531k>.

MORGAN, Ashraf M.; EL-TAWIL, Osama S.. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. **Pharmacological Research**, Milan [S.L.], v. 47, n. 1, p. 75-85, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1043-6618\(02\)00241-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1043-6618(02)00241-4).

MUKHERJEE, Biswajit; PATRA, Balaram; MAHAPATRA, Sushmita; BANERJEE, Pratik; TIWARI, Amit; CHATTERJEE, Malay. Vanadium—an element of atypical biological significance. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 150, n. 2, p. 135-143, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.009>.

NAKAMURA, Kazuhiro. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 5, p. 1207-1228, nov. 2011. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>.

NANDY, Subhangkar; DATTA, Rana. Acute and sub-acute toxicity studies of methanolic leaves extract of *Pterospermum acerifolium* (L.) Willd in rodents. **International Journal Of Pharmacy & Life Sciences**, Dhaka, v. 3, n. 3, p. 1519-1529, mar. 2012.

OCDE. Test No. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. **Ocde Guidelines For The Testing Of Chemicals**, Section 4, USA, p. 1-13, 16 out. 2008. OECD. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070684-en>.

OECD. Test No. 423: acute oral toxicity - acute toxic class method. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals**, Section 4, USA, p. 1-14, 8 fev. 2002. OECD. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en>.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

PADUA, Monique Meyenberg Cunha - de; CADENA, Silvia Maria Suter Correia; PETKOWICZ, Carmen Lucia de Oliveira; MARTINEZ, Glaucia Regina; ROCHA, Maria Eliane Merlin; MERCÊ, Ana Lucia Ramalho; NOLETO, Guilhermina Rodrigues. Toxicity of native and oxovanadium (IV/V) galactomannan complexes on HepG2 cells is related to impairment of mitochondrial functions. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro, v. 173, p. 665-675, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.027>.

PEIXOTO, Eduardo Motta Alves. Vanádio. **Nova na Escola**, São Paulo, n. 24, p. 1-1, nov. 2006.

PESSOA, Joao Costa; ETCHEVERRY, Susana; GAMBINO, Dinorah. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 301-302, p. 24-48, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>.

RANA, S. V. S.. Perspectives in Endocrine Toxicity of Heavy Metals—A Review. **Biological Trace Element Research**, London, v. 160, n. 1, p. 1-14, 6 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7>.

REHDER, Dieter. Perspectives for vanadium in health issues. **Future Medicinal Chemistry**, London, v. 8, n. 3, p. 325-338, mar. 2016. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.15.187>.

REHDER, Dieter. Vanadium. Its Role for Humans. **Metal Ions In Life Sciences**, Chichester, p. 139-169, 2013. Springer Netherlands. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_5).

ROY, Souvik; MAJUMDAR, Sumana; SINGH, Amit Kumar; GHOSH, Balaram; GHOSH, Nilanjan; MANNA, Subhadip; CHAKRABORTY, Tania; MALLICK, Sougato. Synthesis, Characterization, Antioxidant Status, and Toxicity Study of Vanadium–Rutin Complex in Balb/c Mice. **Biological Trace Element Research**, London, v. 166, n. 2, p. 183-200, 21 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-015-0270-2>.

SCHLESINGER, William H.; KLEIN, Emily M.; VENGOSH, Avner. Global biogeochemical cycle of vanadium. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Washington, v. 114, n. 52, p. 11092-11100, 11 dez. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1715500114>.

SCIBIOR, Agnieszka; KURUS, Joanna. Vanadium and Oxidative Stress Markers - In Vivo Model: a review. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 26, n. 29, p. 5456-5500, 26 out. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867326666190108112255>.

SCIBIOR, Agnieszka; PIETRZYK, ?Ukasz; PLEWA, Zbigniew; SKIBA, Andrzej. Vanadium: risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological me. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, France, v. 61, p. 126508, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126508>.

SHECHTER, Y. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. **Coordination Chemistry Reviews**, Sydney, v. 237, n. 1-2, p. 3-11, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00302-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00302-8).

SHECHTER, Yoram; KARLISH, Steven J. D.. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. **Nature**, [S.L.], v. 284, n. 5756, p. 556-558, abr. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/284556a0>.

SHI, Honglian; HUDSON, Laurie G.; LIU, Ke Jian. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. **Free Radical Biology And Medicine**, New York, v. 37, n. 5, p. 582-593, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.012>.

SHRIVASTAVA, Sadhana; JOSHI, Deepmala; BHADARIA, Monika; SHUKLA, Sangeeta; MATHUR, Ramesh. Cotherapy of Tiron and selenium against vanadium induced toxic effects in lactating rats. **Ranian Journal Of Reproductive Medicine**, Yazd, v. 9, n. 3, p. 229-238, 2011.

SPEAR, Nathan; AUST, Steven D.. Effects of Glutathione on Fenton Reagent-Dependent Radical Production and DNA Oxidation. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, New York, v. 324, n. 1, p. 111-116, dez. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1995.9921>.

THOMPSON, Katherine H.; LICHTER, Jay; LEBEL, Carl; SCAIFE, Michael C.; MCNEILL, John H.; ORVIG, Chris. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 103, n. 4, p. 554-558, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.003>.

TIWARI, Vinod; KUHAD, Anurag; CHOPRA, Kanwaljit. Emblica officinalis Corrects Functional, Biochemical and Molecular Deficits in Experimental Diabetic Neuropathy by Targeting the Oxido-nitrosative Stress Mediated Inflammatory Cascade. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, n. 10, p. 1527-1536, 11 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3440>.

TOLMAN, Edward L.; BARRIS, Edna; BURNS, Michael; PANSINI, Angela; PARTRIDGE, Ruth. Effects of vanadium on glucose metabolism. **Life Sciences**, Oxford, v. 25, n. 13, p. 1159-1164, set. 1979. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90138-3](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(79)90138-3).

TRACEY, Alan S.; WILLSKY, Gail R.; TAKEUCHI, Esther S.. Vanadium: chemistry, biochemistry, pharmacology and practical applications. **Bioscience, Physical Sciences**, Boca Raton, p. 1-250, 19 mar. 2007. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420046144>.

TRIPATHI, Deepika; MANI, Veena; PAL, Ravi Prakash. Vanadium in Biosphere and Its Role in Biological Processes. **Biological Trace Element Research**, London, v. 186, n. 1, p. 52-67, 9 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-018-1289-y>.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 1 maio 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867053764635>.

WEI, Cheng?I; BAYATI, M. A. Al; CULBERTSON, M. R.; ROSENBLATT, L. S.; HANSEN, L. D.. Acute toxicity of ammonium metavanadate in mice. **Journal Of Toxicology And Environmental Health**, Washington, v. 10, n. 4-5, p. 673-687, out. 1982. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15287398209530286>.

WILK, Aleksandra; SZYPULSKA-KOZIARSKA, Dagmara; WISZNIEWSKA, Barbara. The toxicity of vanadium on gastrointestinal, urinary and reproductive system, and its influence on

fertility and fetuses malformations. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**, Warsaw, v. 71, n. 0, p. 850-859, 2017.

WOODIN, Melanie et al. Acute respiratory symptoms in workers exposed to vanadium-rich fuel-oil ash. **American Journal Of Industrial Medicine**, New York, v. 37, n. 4, p. 353-363, 2000.

ZAPOROWSKA, Halina; WASILEWSKI., Wac?aw. "Haematological effects of vanadium on living organisms.". **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 223-231, 1992.

ZWOLAK, Iwona. Protective Effects of Dietary Antioxidants against Vanadium-Induced Toxicity: a review. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, Austin, v. 2020, p. 1-14, 9 jan. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/1490316>.

## ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biotérios  
Av. Prof. Nelson Cavari, 521  
54070-900 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (51) 3442-8142  
www.ufpe.br

Recife, 29 de dezembro de 2021

Ofício nº 97/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof. Eduardo Carvalho Lira**  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
processo nº 0021/2021

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade oral aguda e subcrônica do composto à base de vanádio ( $\text{me}_4\text{n}_6[\text{v}15\text{o}36\text{c}] - \text{v}15$  - em camundongos", de registrado com o nº 0021/2021 sob a responsabilidade da **Prof. Eduardo Carvalho Lira** Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos); para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 21/12/2021

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2022 a 20/05/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (Camundongo Albino da linhagem Swiss)
Nº de animais	52 animais
Peso/idade	30 ± 2g / 8 a 10 semanas
Sexo	(20 machos) e (32 fêmeas)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, UFPE

Atenciosamente

  
**Prof. Sebastião R. F. SILVA**  
 -Presidente CEUA/UFPE  
 SUAPE 2345931