

Determinação de derivados de platina provenientes de drogas anticâncer em amostras de urina por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)

Aluna: Alice Rezende Ratton
Orientador: Reinaldo Calixto de Campos

Introdução:

Ocorrência de metais e metalóides em sistemas biológicos

Desde longo tempo, sabe-se que a regulação funcional de sistemas biológicos é criticamente dependente de diferentes elementos químicos, mesmo que em concentrações-traço. Do ponto de vista biológico a manutenção vida depende de muitos modos da interação destes elementos com biomoléculas. Desta maneira, dependendo de sua forma de ação alguns elementos como Hg, As, Pb, e Pt são considerados elementos tóxicos, enquanto outros como Mo, Fe, Zn, Co, V, Cu, Ni são considerados essenciais e benéficos a manutenção dos processos bioquímicos de sistemas diversos. Do ponto de vista químico, a absorção, acumulação, transporte desses elementos são muitas vezes realizadas por ligantes biológicos. Assim esses diferentes processos envolvem a complexação do metal-traço com diferentes substâncias, levando a existência de formas (espécies químicas) com propriedades diferentes daquelas do metal livre (Spunzar, 2000; Rubini et al., 2002).

Em anos recentes, alguns desses elementos estão sendo utilizados no tratamento terapêutico de algumas doenças, como vanádio na diminuição da taxa de glicose no sangue de pacientes com diabetes mellitus (Nagaoka et al., 2002) e platina no tratamento quimioterápico de cânceres uma variedade de tumores sólidos (De Waal et al., 1990; Wong e Giandomenico, 1999).

Drogas anticâncer baseadas em platina ou metais do grupo da platina

O uso de complexos de platina em quimioterapia remonta do final da década de 60, quando foi observada a inibição do processo de divisão celular de bactérias, ocasionado por cis-diaminotetracloroplatina IV (figura 1-b) e cis-diaminodicloroplatina II (figura 1-a), esta última conhecida como cisplatina (De Waal et al., 1990; Wong e Giandomenico, 1999).

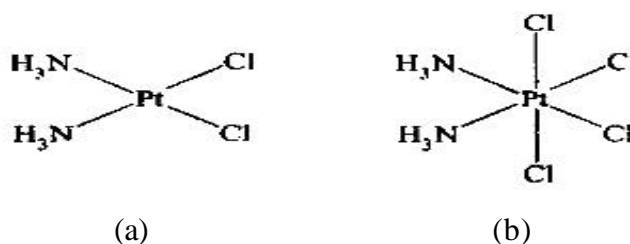


Figura 1 – Fórmula estrutural da cisplatina (a) e da transplatina (b). Fonte: Wong e Giandomenico (1999).

Atualmente, cisplatina é uma das drogas antitumorais de maior utilização no mundo, possuindo efetividade no tratamento de câncer testicular e ovariano e contribuindo para o tratamento de outros tantos tipos de tumores malignos como carcinoma orofaríngeo, carcinoma cervical, linfoma, osteocarcinoma, melanoma e neuroblastoma. Apesar de sua larga utilização, a quimioterapia com cisplatina possui desvantagens que incluem nefrotoxicidade e neurotoxicidade, além de alguns tumores apresentarem resistência natural à droga (Wong e Giandomenico, 1999).

Desde então, diversos compostos análogos da cisplatina, tem sido sintetizados e testados experimentalmente para a verificação e estudo de sua citotoxicidade e potencial uso para o tratamento clínico com células tumorais, originando uma diversidade de substâncias como a carboplatina (figura 2-a), a nedaplatina (figura 2-c), e a oxaliplatina (figura 2-b).

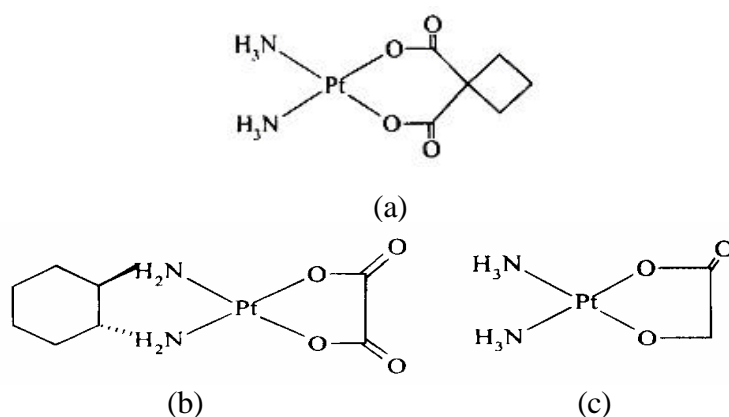


Figura 2 - Fórmula estrutural dos análogos de platina de 2^a geração: carboplatina (a), oxaliplatina

(b) e da nedaplatina (c). Fonte: Wong e Giandomenico (1999).

Diversos estudos têm demonstrado que não somente os complexos de platina demonstram atividade antitumoral, mas também compostos de rutênio ou ródio possuem atividade citostática. São exemplos o butirato de ródio II, o propionato de ródio II, o cisdiclorotetraminorutênio II e o cisdiclorotetradmsorutênio III, os quais possuem atividade antitumorais similares à cisplatina, porém, apresentando toxicidade menor que esta durante o tratamento clínico (Kopf-Maier e Kopf, 1987; Sherman e Lippard, 1987).

A busca por novos compostos de platina tem como objetivo o desenvolvimento de novas drogas que tenham sucesso no tratamento de tumores resistentes à cisplatina, a diminuição dos efeitos colaterais no tratamento quimioterápico, e a possibilidade de administração das doses medicamentosas por via oral, o que possibilitaria menor desconforto para o paciente durante a quimioterapia. (De Waal et al., 1990; Wong e Giandomenico, 1999; Barefoot, 2001).

Interação da platina com moléculas biológicas

As propriedades antitumorais das drogas contendo platina são atribuídas à cinética das reações de deslocamento de seus ligantes, liberando a platina para se coordenar aos átomos de nitrogênio das bases nitrogenadas da molécula de DNA. Assim, estas drogas não reagem diretamente com moléculas biológicas, mas sofrem reações de hidrólise no

interior da célula formando complexos que reagem de forma mais rápida com as biomoléculas desenvolvendo a atividade antitumoral.

Após a administração da droga, portanto, o sal de platina está sujeito a uma seqüência de reações que permitem a formação adutos metal-DNA através de uma ligação estável da Pt com os átomos de nitrogênio da molécula do ácido desoxirribonucleico, impedindo o processo de divisão celular (Burners-Price e Appleton, 2000). Os adutos formados entre a platina e o DNA seriam então, os responsáveis pela atividade anticancerígena apresentada pela droga (Jamienson e Lippard, 1999, Kartalou e Essigmenn, 2001, Brabec, 2002).

Os efeitos colaterais das drogas baseadas em platina bem como a resistência celular a essas substâncias são considerados as principais limitações associadas ao uso deste tipo de medicamentos no tratamento contra o câncer. Ambos estão relacionados a interações dos complexos coordenados de platina com moléculas biológicas, especialmente proteínas. Compostos com grupos tiol, como a L-metionina, a L-Cisteína ou glutathione, comumente presente nos fluidos biológicos do meio extracelular, reagem com a platina administrada a pacientes. Há evidências de que a nefrotoxicidade da cisplatina é aumentada na presença de seus produtos de reação com a L-metionina (Barefoot, 2001) ou causada, pela ligação do complexo de platina com proteínas (complexos proteômicos) e peptídeos, como a glutathione (Fontes et al., 1996). Fontes (1996) comprovou que quantidades significativas de platina são eliminadas na forma de complexos proteicos, observando grande quantidade de glutathione em células que apresentam resistência à utilização de cisplatina, sugerindo que este tripeptídeo desempenha um papel importante na resistência que as células adquirem à drogas antitumoral.

A extensão da ligação da cisplatina e seus análogos, como a carboplatina e a iproplatina, a proteínas, formando complexos proteômicos, varia conforme o tipo de droga utilizada terapeuticamente. Após aplicação de injeções com compostos coordenados de platina, Van der Vijgh e Klein observaram que a platina apresentou um grande número de ligações a proteínas, resultando em um rápido decréscimo no total de platina livre no plasma. Por outro lado, a iproplatina mostrou pouca afinidade a qualquer proteína (De Waal et al., 1990). Assim, os estudos de platina em fluidos biológicos, podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos na utilização de complexos metálicos com atividade anticâncer e possibilitando o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas ao seu monitoramento clínico.

Utilização do forno de grafite como instrumento de análise

Os processos analíticos devem ser aplicáveis para análises cotidianas, não podem consumir muito tempo, e devem apresentar um baixo custo financeiro. A utilização da absorção atômica no forno de grafite como técnica de detecção elementar é mais barata do que muitas outras técnicas como o ICP-MS e é suficientemente sensível tornando a metodologia mais acessível.

O método do forno de grafite apresenta outras grandes vantagens, uma delas é poder descartar o processo de digestão dos fluidos biológicos podendo minimizar interferências causadas por compostos formados a partir de substâncias usadas para digerir as amostras.

A espectrofotometria de absorção atômica no forno de grafite permite medidas precisas e sensíveis de concentrações de platina abaixo de 5 ng. mL^{-1} em fluidos biológicos, como plasma e urina. A técnica possui alta sensibilidade e suficiente

linearidade, é rápida e possui a precisão e exatidão necessárias para determinação de Pt em estudos clínicos de agentes anticâncer de Pt. Usando o forno de grafite é possível a eliminação de contaminantes, sem significativa perda de analito. As maiores dificuldades com esta técnica são os problemas de volatilização do analito e interferências espectrais. No entanto, essas interferências são corrigidas usando um modificador químico conveniente, assim como um corretor de fundo adequado.

Objetivo:

O objetivo desta pesquisa é desenvolver e otimizar uma metodologia analítica para determinação de platina em amostras de urina por espectrofotometria de absorção atômica no forno de grafite, buscando contribuir para uma melhor compreensão dos complexos mecanismos de interação, efeitos tóxicos e benefícios farmacológicos da utilização dos sais deste metal no tratamento quimioterápico do câncer. Pretende-se minimizar a necessidade de pré-tratamento da amostra, economizando tempo e diminuindo as chances de contaminações ou perdas.

Metodologia:

De maneira genérica, o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a análise em amostras biológicas e clínicas deve seguir um conjunto de procedimentos considerando os problemas inerentes de cada uma de suas etapas, conforme mostrado abaixo (EBDON *et al.*, 2001):

Tabela 1: Esquema para análise em amostras biológicas

Etapas do procedimento	Problema
Coleta e estocagem da amostra	<ul style="list-style-type: none">▪ Representatividade.▪ Contaminação.
Tratamento da amostra	<ul style="list-style-type: none">▪ Recuperação quantitativa do metal.▪ Processo de “Clean up”.
Análise das espécies	<ul style="list-style-type: none">▪ Detecção final do metal.

Assim, a metodologia experimental será desenvolvida conforme descrito a seguir:

Coleta e estocagem das amostras biológicas

As amostras de sangue e urina de pacientes sob tratamento quimioterápico com drogas a base de platina serão obtidas no Instituto Nacional do Câncer (INCA), de acordo com as normas éticas para a pesquisa com amostras advindas de seres humanos.

As amostras de urina coletadas serão armazenadas em tubos de polipropileno, podendo ser armazenados à temperatura de 4°C para utilização posterior.

Determinação de platina total em amostras biológicas

A determinação de platina total em amostras biológicas será realizada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (EAA-FG) utilizando um aparelho Analytik Jena ZEE nit com forno de grafite de aquecimento transversal e corretor de fundo Zeeman.

Os parâmetros temperatura de secagem e pirólise, natureza e concentração de diluentes, fator de diluição de amostra, volume de amostra injetado, uso de modificador químico da metodologia analítica serão otimizados através de planejamento experimental multivariado.

Resultados e discussão:

Otimização multivariada (Resultados Parciais)

Inicialmente buscou-se as melhores condições para as variáveis independentes na determinação de platina inorgânica em urina. Por serem muitas essas variáveis, demandaria muito tempo e trabalho a otimização univariada, no qual faz-se a variação de cada fator, deixando-se os outros fixos. Assim, foi utilizado um método multivariado, no qual obtém-se, através a combinação de todos os fatores, uma análise de cada fator sujeito a todas as combinações dos demais.

Um experimento no qual a resposta variável é medida por todas as possíveis combinações dos fatores, em dois níveis diferentes, é conhecido como um planejamento fatorial completo. Esse planejamento detecta e estima todas as interações dos fatores, o que não pode ser feito pelo método univariado. Além disso, se os efeitos dos fatores forem aditivos, o planejamento fatorial requer, para fornecer um resultado com a mesma precisão, uma quantidade menor de medidas (2^k , no qual k é o número de fatores) em relação ao método univariado.

Para se promover o planejamento fatorial completo, foram apenas escolhidas as variáveis que, por conhecimento prévios, aparentavam ser mais importantes, que são elas: concentração do ácido, temperatura de pirólise, temperatura de atomização e rampa de atomização. Além disso, como se deve ter dois níveis (alto e baixo) para cada variável, foram escolhidos dois valores relativamente distantes entre si, sendo um deles já estudado e o outro escolhido almejando melhoras. As variáveis estudadas, com os respectivos níveis para um planejamento fatorial de 2^4 que foram utilizados estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 2: Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento completo 2^{4-0} .

Variável	Descrição	Níveis	
		-	+
A	Concentração do ácido	0,15%	0,30%
B	Temperatura de atomização	2310	2420
C	Temperatura de pirólise	1460	1580
D	Rampa de atomização	1700	1808

Os 2^4 (16) experimentos foram feitos numa ordem aleatória.

O planejamento fatorial completo dos dados contidos na tabela 3 foi realizado utilizando a “Análise e Planejamento de Experimentos” do programa de estatística Statistica 6.0 Statsoft. Através deste programa, tratamentos estatísticos foram aplicados no “Planejamento Padrão Box-Hunter $2^{xx}(k-p)$ ”. As variáveis A, B, C e D junto com a interação de B com C e as interações de terceira ordem, que apresentam $p < 0,05$ mostraram grande significância.

A análise de variância, ANOVA está igualmente de acordo com os resultados dos efeitos e dos coeficientes. Da mesma forma, os efeitos com significância estatística são os efeitos A, B, C e D, a interação BC e as interações de terceira ordem, que apresentam $p < 0,05$.

Tanto a estimativa dos efeitos e coeficientes, quanto a ANOVA fornece o R^2 que é chamado coeficiente de determinação do modelo. O valor de R^2 máximo é 1 e, quanto mais próximo de 1, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas. Para o modelo no momento estudado, R^2 é igual a 0,95818, ou seja, 95,82% da variação média é explicada pela regressão utilizada, o que é satisfatório.

Para uma representação de forma rápida e clara dos efeitos importantes estatisticamente utiliza-se o diagrama de Pareto (figura 3). Os efeitos cujos retângulos se apresentam a direita da linha divisória ($p=0,05$), A, B, C, D, BC e as interações de terceira ordem devem ser considerados no modelo matemático. Os valores ao lado de cada retângulo representam a distribuição t de Student.

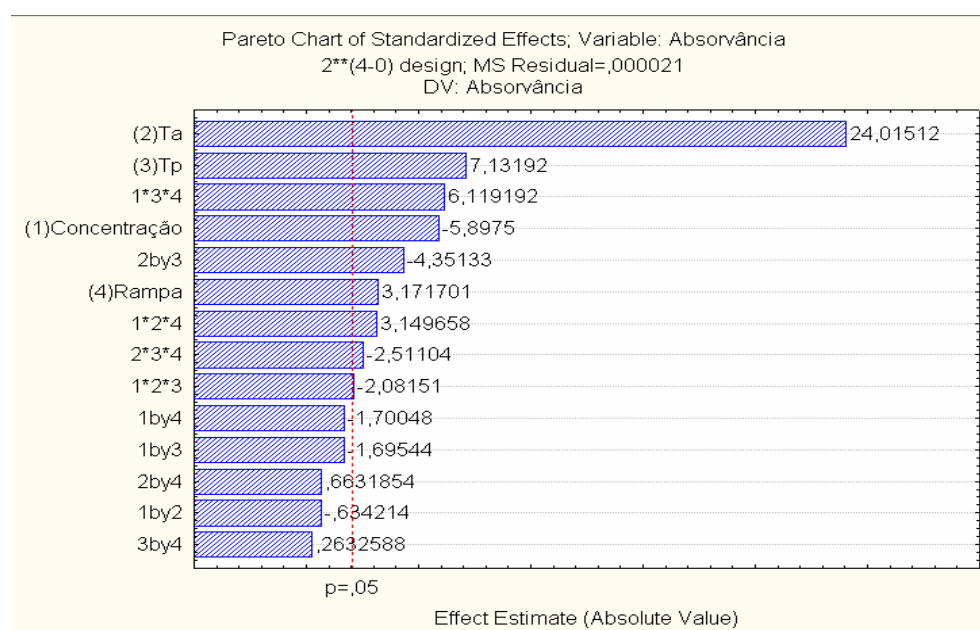


Figura 3: Diagrama de Pareto o planejamento 2^{4-0} .

Foi realizado um planejamento composto central com as variáveis A, B e D: experimentos (8) referentes ao planejamento fatorial, 2x3 experimentos estrela (6), com $a = \pm\sqrt[4]{2^3}$ e 4 experimentos centrais.

As variáveis aqui estudadas, com os respectivos valores para cada nível, estão mostradas na tabela 12. Os experimentos foram realizados de modo aleatório e não na ordem apresentada.

Tabela 12: Variáveis estudadas com os respectivos níveis no planejamento composto central.

Variável	Descrição	Nível				
		-1,68	-1	0	1	1,68
A	Concentração do ácido	0,07	0,1	0,15	0,20	0,23
B	Temperatura de atomização (°C)	2400	2420	2450	2480	2500
D	Rampa de atomização (°C/s)	1790	1800	1815	1830	1840

Foi realizado o planejamento composto central dos dados contidos na tabela 13, utilizando a “Análise e Planejamento de Experimentos/Composto Central” do programa Estatística 6.0 Statsoft. Através deste programa, foram feitos alguns tratamentos estatísticos dos dados, obtendo-se várias tabelas e gráficos, sendo os mais importantes apresentados a seguir.

Tabela 13: Combinações entre as variáveis e os respectivos resultados de absorvância no planejamento composto central.

Ensaio	Concentração	Ta	Rampa	Absorvância
1	-1	-1	-1	0,073207
2	1	-1	-1	0,087507
3	-1	1	-1	0,08024
4	1	1	-1	0,098245
5	-1	-1	1	0,074129
6	1	-1	1	0,084244
7	-1	1	1	0,081706
8	1	1	1	0,093141
9	-1,68	0	0	0,084162
10	1,68	0	0	0,088508
11	0	-1,68	0	0,080695
12	0	1,68	0	0,094567
13	0	0	-1,68	0,08912
14	0	0	1,68	0,090302
15	0	0	0	0,087436
16	0	0	0	0,09287
17	0	0	0	0,098062
18	-1	-1	-1	0,071742
19	1	-1	-1	0,090141

20	-1	1	-1	0,078472
21	1	1	-1	0,090492
22	-1	-1	1	0,072285
23	1	-1	1	0,082088
24	-1	1	1	0,078115
25	1	1	1	0,095871
26	-1,68	0	0	0,084234
27	1,68	0	0	0,083823
28	0	-1,68	0	0,081668
29	0	1,68	0	0,089627
30	0	0	-1,68	0,090427
31	0	0	1,68	0,086978
32	0	0	0	0,083171
33	0	0	0	0,093641
34	0	0	0	0,089977
35	-1	-1	-1	0,072481
36	1	-1	-1	0,087669
37	-1	1	-1	0,081479
38	1	1	-1	0,094167
39	-1	-1	1	0,077557
40	1	-1	1	0,080894
41	-1	1	1	0,075981
42	1	1	1	0,091887
43	-1,68	0	0	0,084578
44	1,68	0	0	0,085482
45	0	-1,68	0	0,080501
46	0	1,68	0	0,097144
47	0	0	-1,68	0,088518
48	0	0	1,68	0,086987
49	0	0	0	0,08113
50	0	0	0	0,092481
51	0	0	0	0,090198

Os efeitos ou interações significativos são: efeitos A (Linear), A (Quadrático), B (Linear) e B (Quadrático).

A análise de variância, ANOVA coincide com a tendência encontrada na tabela de estimativa dos efeitos e coeficientes. Da mesma forma, os efeitos com significância estatística são A (Linear), A (Quadrático), B (Linear) e B (Quadrático).

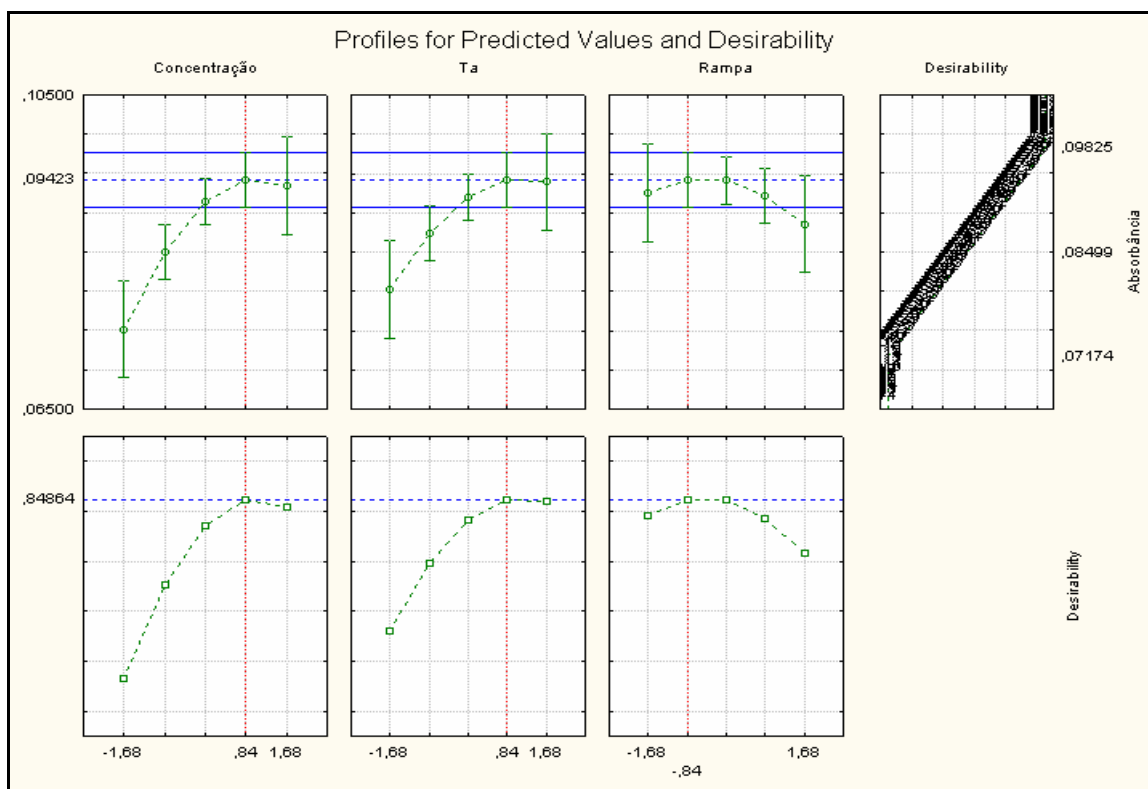


Figura 12: Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central.

Observando a figura 12 verificamos que se obtém um maior valor de absorvância para concentração de ácido próximo do nível 1 (0,20%), temperatura de atomização próxima do nível 1 (2480 °C) e rampa próxima do nível -1 (1800 °C/s). A tabela 17 tem-se o programa de temperatura otimizado.

Tabela 17: programa de temperatura otimizado

Etapa	Temp (°C)	Rampa (°C/s)	Hold (s)	Flow gas
Secagem	90	20	10	max
Secagem	120	15	15	max
Pirólise	900	100	10	max
Pirólise	1600	200	10	max
AZ	1600	0	6	stop
Atomização	2480	1800	5	stop
Limpeza	2600	1000	3	max

Concentração de ácido = 0,20%
Diluição: 1+1

Linearidade

A busca da linearidade está em obter o sinal analítico em proporção direta às concentrações das substâncias em estudo. Uma curva de calibração ou analítica é

necessária para o estudo sendo o eixo das abscissas o da concentração e o eixo das ordenadas o do sinal analítico (absorvância).

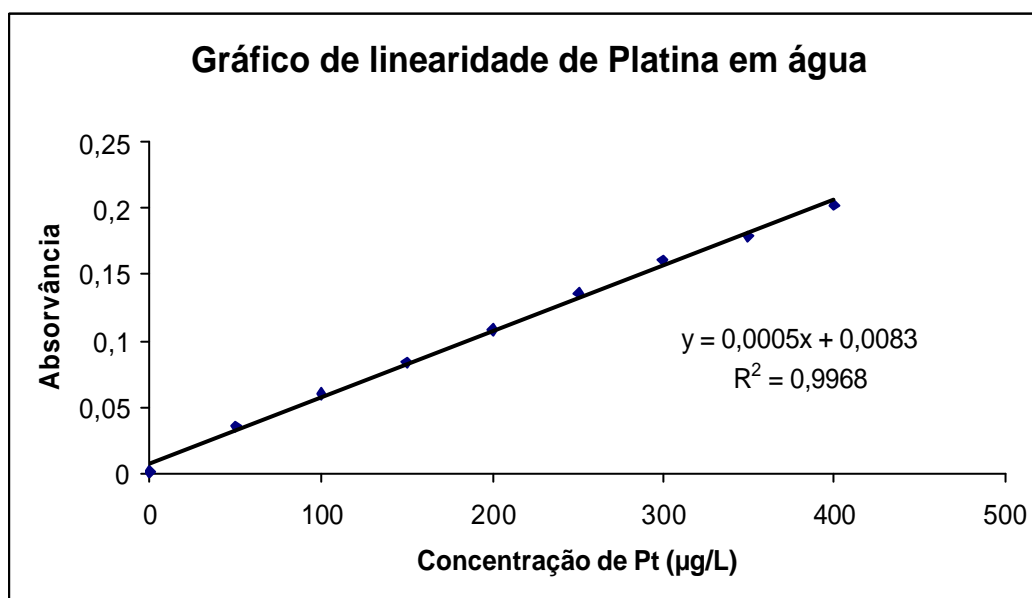
A equação da reta é definida como:

$$y = ax + b$$

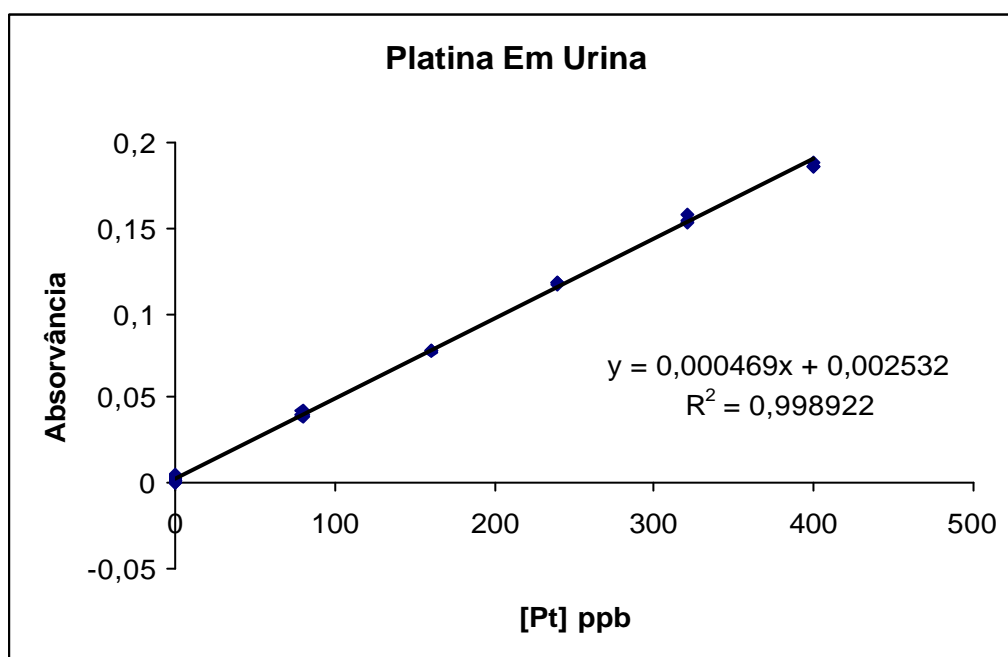
A equação busca sempre identificar se existe uma relação definida entre as duas variáveis em questão.

A regressão linear, método dos mínimos quadrados, que é uma forma de estimar qual a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente. O coeficiente de regressão linear é importante de ser calculado para comprovar que existe uma relação linear entre as duas variáveis em estudo, onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais próxima da unidade maior a relação, maior probabilidade de existir uma relação linear definida. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um valor igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Neste trabalho, optamos em considerar apenas valores de coeficiente de correlação igual ou acima de 0,99.

Foram construídos dois gráficos da absorvância da platina em função de sua concentração diluída em água e em urina.



Concentração de Pt (µg/L)	Abs
0	0,001108
50	0,035675
100	0,060697
150	0,083353
200	0,10895
250	0,13611
300	0,16079
350	0,17957
400	0,20268



Observamos que ambos os coeficientes de correlação possuem valores acima de 0,99. Existe uma linearidade entre as duas variáveis.

A sensibilidade é uma grandeza que depende da inclinação da curva analítica. Os limites de detecção (LD) e o de quantificação (LQ) indicam também a capacidade de medição de sinais que estatisticamente e inequivocamente que seriam do analito (sensibilidade do método).

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é o critério de sensibilidade mais utilizado. Segundo o INMETRO, ele representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada a partir de um procedimento experimental. O cálculo do LD será baseado aqui, em parâmetros da curva analítica, por ser estatisticamente mais confiável.

O LD pode ser definido por:

$$LD = 3 \times (\text{desvio padrão}) / a$$

Onde a é a inclinação da curva.

Foi calculado a partir do primeiro gráfico o LD da platina em água:

Desvio padrão Branco	0,00188
L.D.	9,657248

O LD da platina em urina foi determinado através do segundo gráfico:

Desvio padrão Branco	0,001639
L.D.	10,48269

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor a menor concentração da substância em exame que pode ser medida a partir de um método analítico. O LQ pode ser calculado utilizando as mesmas regras usadas para o LD substituindo a relação 3:1 para 10:1.

O LQ pode ser definido como:

$$LQ = 10 \times (\text{desvio padrão} / a)$$

Onde o desvio padrão é a estimativa do desvio padrão de replicatas do ensaio em branco e a é a inclinação da curva.

Foi calculado a partir do primeiro gráfico o LQ da platina em água:

LQ	32,19083
-----------	----------

O LQ da platina em urina foi determinado a partir do segundo gráfico:

LQ	34,94231
-----------	----------

Conclusão:

O programa ótimo de temperatura, o volume de amostra e a concentração do diluente foram definidos por otimização multivariada. Assim, foram definidos os valores ótimos das temperaturas de pirólise e atomização. Mesmo nas condições otimizadas, foram observadas diferenças significativas de inclinação entre as curvas analíticas em diluições aquosas e as curvas analíticas em meio de urina. Deste modo, a técnica de ajuste de padrões teve que ser utilizada para calibração. O limite de detecção ($n=10$, $k=3$) nas condições ótimas foram de $10 \mu\text{gL}^{-1}$. Coeficientes típicos de variação entre 1-2 % foram observados. O método foi aplicado na análise de uma série de amostras de urina, que foram também analisadas por um procedimento independente comparativo, havendo

excelente concordância entre os resultados obtidos pelo procedimento proposto e o comparativo.

Foi possível desenvolver um procedimento analítico para a determinação de Pt, na forma de diferentes compostos, em urina, pela espectrofotometria de absorção atômica no forno de grafite. O procedimento mostrou-se sensível e suficiente para os estudos desejados, simples e rápido. Estudos futuros incluem a extensão do procedimento a outros fluidos biológicos.

Referências bibliográficas:

Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis Vol. 8, No 1, pp. 1-30, 1990

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 25 (2001) 465-475

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raif, M., Roberts, K. e Watson, J. D. In: *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. Garland Publishing, Icm. Nova Iorque e Londres, 1294 pp. 1994

Barefoot, R. R. Speciation of platinum compounds: a review of recente applications in studies of platinum anticancer drugs. *Journal of Chromatography B*, 2001, 8:205-211.

Brabec, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Prog. Nucleotides Acids Research in Molecular Biology*, 2002, 71:1-68.

Brabec, V. e Kasparikova, J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drugs Resistance Updates*, 2002, 5:147-161.

Burners-Price, S. J. e Appleton, T. G. In: *The Chemistry of cisplatin in aqueous solution*. In: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*. Ed:Humana Press. Nova Jersey. 2000.

Caradonna, J. P., Lippard, S. J., Gait, M. J. e Singh, M. J. The anti-tumor drug cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] forms an intrastrand D(GPG) cross-link upon reaction with [D(APGPGPCPT)₂]. *Journal of American Chemistry Society*, 1982, 104 (21):5793-5795.

De Waal, W. A. J., Maessen, F. J. M. J. e Kraak, J. C. Analytical methodologies for the quantification of platinum ant-cancer drug and related compounds in biological media. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical analysis*, 1990, 8(1):1 -30.

Fontes, A. P. S., Almeida, S. G. e Nader, L. A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, 1996, 20(4):398-406.

Girault, J. P., Chottard, J. C., Guittet, E. R., Lallemand, J. Y., Huynh-Dinh, T. e Igolen, J. 1982. Specific platinum chelation by the guanines of the deoxyhexanucleotide D(T-G-G-C-C-A) upon reaction with cis $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$. *Biochemical Biophysics Research Community*, 1982, 109(4):1157-1163.

Jamieson, E. R. e Lippard, S. J. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemistry Review*, 1999, 99:2467-2498.

Kartalou, M. e Essigmann, J. M. Recognition of cisplatin adducts by cellular protein. *Mut. Research*, 2001, 478:1-21.

Kopf-Maier, P. E Kopf, H. Non-platinum group metal antitumor agents: history, current status and perspectives. *Chemical Reviews*, 1987, 87(5)1137-1152.

Nagaoka, M. H.; Yamazaki, T. E Maitani, T. Binding patterns of vanadium ions with different valence states to human serum transferrin studied by HPLC/high-resolution ICP-MS. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, 2002, 296:1207-1214.

Scheller, K. H., Scheller-Krattiger, V. e Martin, R. B. Equilibria in solutions of nucleosides, 5'-nucleotides and dienpd 2^+ . *Journal of American Chemistry Society*, 1981, 103(23):6833-6839.

Spunzar, J. Bioinorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 2000, 125:963-988

Suzane, E. S.; Lippard, S. J. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chemical Reviews*, 1987, 87(5)1153-1181.

Vouillamoze-Lorenz, S., Bauer, J., Lejeune, F. e Decosterd, L. A. 2001. Validation of an AAS method for the determination of platinum in biological fluids from patients receiving the oral platinum derivative JM216. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25:465-475.

Wong, R. D. e Giandomenico, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemistry Review*, 1999, 99:2451-2466.