

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Potencial Antitumoral do Metalocomplexo de Cobre (II) DRI-12:
Uma Análise *In Vitro* e *In Sílico* no Tratamento do Câncer de Próstata

Malu Mariana Damasceno Góes

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Novembro/2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Potencial Antitumoral do Metalocomplexo de Cobre (II) DRI-12:
Uma Análise *In Vitro* e *In Silico* no Tratamento do Câncer de Próstata

Malu Mariana Damasceno Góes

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

Me. Clara Maria Faria Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Novembro/2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Potencial Antitumoral do Metalocomplexo de Cobre (II) DRI-12:
Uma Análise *In Vitro* e *In Silico* no Tratamento do Câncer de Próstata

Malu Mariana Damasceno Góes

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior
IBTEC

Me. Clara Maria Faria Silva
IBTEC

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
(Coordenador de curso)

Uberlândia – MG
Novembro/2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Potencial Antitumoral do Metalocomplexo de Cobre (II) DRI-12:
Uma Análise *In Vitro* e *In Silico* no Tratamento do Câncer de Próstata

Malu Mariana Damasceno Góes

Aprovado pela Banca Examinadora em: ____/____/____ Nota: _____

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior
(Presidente da Banca Examinadora)

Uberlândia, ____ de _____ de _____

Dedico este trabalho à minha família, por seu amor inabalável e apoio constante em cada etapa desta jornada. Aos amigos e mestres, que me inspiraram com suas palavras, exemplos e sabedoria.

A todos que enfrentam a batalha contra o câncer, dedico meu esforço, na esperança de contribuir para dias melhores e tratamentos mais humanos.

Com gratidão e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, pelo amparo e pelas bênçãos concedidas em cada passo dessa jornada. Por guiar meus passos, renovar minha fé e me sustentar diante dos desafios. Que toda honra e glória sejam dedicadas a Ti.

Aos meus pais, Marcelo e Luciana, por seu amor incondicional, paciência e apoio em cada etapa. Obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação incansável e por serem a base de tudo o que sou. Vocês me ensinaram a perseverar, a acreditar em mim mesma e a nunca desistir, mesmo diante das maiores adversidades. Obrigada por serem pilares de amor e valores em minha vida. Cada conquista é também de vocês.

Aos meus irmãos, Luma Laura, Marcelo Augusto e Luiz Marcelo, cuja presença vai muito além das distâncias geográficas. Obrigada por sempre estarem comigo em pensamento, coração e alma, trazendo conforto e apoio de formas que só o amor de irmãos permite. Vocês são parte fundamental da minha vida e uma constante fonte de força.

Aos meus avós, Ana e João, Gil e Namir, por toda a sabedoria, carinho e apoio ao longo da minha vida. Seus ensinamentos e amor inabalável são meu legado e uma inspiração diária para seguir em frente.

Aos meus queridos familiares e amigos, por serem meu porto seguro e me inspirarem a dar o melhor de mim. Obrigada por cada gesto de carinho, palavras de incentivo e por me mostrarem que a caminhada se torna mais leve quando feita ao lado de pessoas que nos amam.

Ao meu namorado, João Alexandre, que sempre me incentiva a crescer em todos os aspectos e nunca poupa esforços pra me ajudar, obrigada por todo o carinho e cuidado. Obrigada por ser meu refúgio e apoio constante em meio ao cansaço e as dúvidas, sua presença deixa os momentos difíceis mais leves e as vitórias ainda mais doces. Você é parte essencial dessa conquista.

À minha amada tia, Viviane Góes, minha maior inspiração para trilhar esta carreira. Sua dedicação, competência e paixão pelo que faz me encorajaram desde o início. Sou grata por cada momento em que me acolheu, apoiou e compartilhou seus conhecimentos. Obrigada por abrir portas, me ensinar com paciência e por ser um exemplo que carrego com profunda admiração. Sua presença nesta jornada foi e sempre será inestimável.

Ao meu querido e dedicado orientador, Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior, por todo apoio e paciência. Obrigada por acreditar neste trabalho e por me guiar com tanto profissionalismo e empatia. Seu incentivo e seus ensinamentos foram fundamentais para a concretização deste projeto.

À minha coorientadora, Me. Clara Maria Faria Silva, pela dedicação, pelos ensinamentos valiosos e pela orientação que tanto contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. Sou grata por sua paciência, incentivo e comprometimento.

Aos meus companheiros e colegas de laboratório, que compartilharam comigo essa jornada de aprendizado e desafios. Agradeço pelas conversas, pelo apoio mútuo e pelo ambiente acolhedor que fizeram deste caminho algo especial. Vocês tornaram os dias de trabalho mais leves e produtivos.

Por fim, aos financiadores deste projeto realizado no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Uberlândia (CITOGEN) – UFU, FAPEMIG, CNPq e CAPES –, cujo suporte tornou possível a execução desta pesquisa. Obrigada por acreditarem no poder transformador da ciência.

RESUMO

O estudo aborda o potencial antitumoral do metalocomplexo de cobre (II) DRI-12 em células de câncer de próstata (PC-3), comparando seu efeito com células saudáveis (PNT-2). O DRI-12 apresentou atividade citotóxica significativa *in vitro*, com valores de IC₅₀ de 4,543 µM para células tumorais e 5,414 µM para células não tumorais, demonstrando baixa seletividade (IS = 1,19). Ensaio de viabilidade celular com AlamarBlue destacaram sua capacidade de inibir o crescimento celular, enquanto estudos de interação molecular indicaram uma afinidade específica com o DNA, sugerindo um possível mecanismo de ação antitumoral relevante. O ensaio Cometa corroborou a genotoxicidade do composto, com danos ao DNA detectáveis em todos os parâmetros avaliados e proporcionais à dose aplicada. Apesar de apresentar seletividade limitada, os resultados demonstraram que o DRI-12 possui alta capacidade de induzir danos às células tumorais e de bloquear vias críticas para sua sobrevivência. Esses achados reforçam o potencial do DRI-12 como alternativa promissora em terapias contra o câncer de próstata, podendo ser otimizado para aprimorar sua eficácia e especificidade tumoral, com base nos resultados robustos de citogenotoxicidade e interação molecular obtidos.

Palavras-chave: Metalocomplexo de Cobre (II); potencial antitumoral; câncer de próstata.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Panorama do câncer e o câncer de próstata.....	1
1.2. Quimioterapia e quimioterápicos	4
1.3. Complexos metálicos e o cobre (Cu)	5
2. OBJETIVO GERAL	7
2.1. Objetivos específicos	7
3. METODOLOGIA	7
3.1. Síntese do metalocomplexo de cobre (II) DRI-12	7
3.2. Manutenção das linhagens celulares <i>in vitro</i>	8
3.3. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina (<i>AlamarBlue</i>)	8
3.3.1. Índice de seletividade (IS).....	10
3.4. Piloto do Ensaio de <i>Docking</i> Molecular	10
3.5. Ensaio Cometa (SCGE)	12
3.6. Análises estatísticas.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Citotoxicidade do complexo DRI-12 pelo ensaio colorimétrico AlamarBlue (resazurina): IC ₅₀ e índice de seletividade (IS)	14
4.2. Projeto piloto do Ensaio de <i>Docking</i> molecular.....	20
4.3. Atividade genotóxica do metalocomplexo DRI-12 por Ensaio Cometa.....	23
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama do câncer e o câncer de próstata

Atualmente, o termo "câncer" engloba mais de uma centena de doenças distintas, todas caracterizadas pelo crescimento desordenado de células, as quais têm a tendência de invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2022c). A raiz do câncer está relacionada a modificações na estrutura genética (DNA) das células, denominadas mutações. Cada célula saudável opera com instruções precisas sobre seu crescimento, divisão, período funcional e morte (INCA, 2022a). Além de um equilíbrio essencial entre a quantidade de células que passam por processos de morte (seja por morte celular programada, doenças ou lesões) e a taxa de reprodução celular, responsável pela renovação dos tecidos (Prado, 2014). A presença de quaisquer irregularidades nessas instruções, pode resultar no surgimento de uma célula alterada, propensa a se tornar cancerosa (INCA, 2022a).

As células cancerosas, originadas a partir de células normais, distinguem-se em dois aspectos fundamentais. Em primeiro lugar, perdem o controle sobre a divisão celular e a capacidade de seguir o ciclo natural de morte programada, o que resulta em proliferação contínua e, conseqüentemente, na formação de tumores, geralmente identificados apenas quando já apresentam milhões de células. A segunda característica, mais preocupante, é a capacidade da célula cancerosa de invadir tecidos próximos e se disseminar para outras regiões do organismo, fenômeno conhecido como metástase. Quando uma única célula cancerosa alcança um órgão propício, passa a expressar proteínas que facilitam sua invasão e aderência aos novos tecidos. Paralelamente, o tumor em desenvolvimento libera sinais químicos que estimulam a formação de vasos sanguíneos, assegurando o suprimento necessário para sua progressão (Prado, 2014).

Tumores, caracterizados por grandes aglomerados de células, são divididos em duas categorias com base nas características celulares apresentadas. Um tumor maligno (câncer), é identificado pela disposição desordenada de células anormais que invadem órgãos e tecidos adjacentes, perdendo a semelhança com o tecido de origem. Esses tumores frequentemente expressam o gene da telomerase, evitando o encurtamento das extremidades dos cromossomos após cada replicação do DNA, o que permite que se dividam continuamente. Em contrapartida, um tumor benigno é uma massa de células localizada no tecido ou órgão original, que mantém semelhança com o tecido de origem. Embora os tumores benignos não sejam considerados cânceres, a remoção pode ser necessária se afetarem órgãos importantes, como o cérebro (Alves; Tavares; Borges, 2020; Prado, 2014).

O câncer representa um desafio significativo para a saúde global, sendo uma das principais causas de óbito e um obstáculo para o aumento da expectativa de vida em escala mundial. Em muitos países, essa doença é identificada como a principal ou segunda mais comum causa de morte prematura antes dos 70 anos (INCA, 2022b). Conforme indicado no relatório informativo de 2020 da Organização Pan-americana de Saúde, o câncer assumiu a posição de segunda principal causa de óbitos em todo o mundo, resultando em 9,6 milhões de mortes no ano de 2018.

As estimativas sobre o impacto do câncer em 2020, apresentadas pelo *Global Cancer Observatory (Globocan)* e formuladas pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, revelaram um alarmante total de 19,3 milhões de novos casos da doença no cenário internacional. Em projeções mais recentes da *IARC* para o ano de 2040, espera-se um aumento significativo, com a previsão de 30,2 milhões de novos casos. Esses dados indicam um cenário desafiador e a crescente necessidade de estratégias eficazes no combate ao câncer.

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino localizada à frente do reto, abaixo da bexiga e envolvendo a porção inicial da uretra. Ela desempenha papel fundamental na produção de um fluido que integra o sêmen, fornecendo nutrientes e proteção aos espermatozoides, sendo, portanto, essencial para a função reprodutiva. (INCA, 2019b). Seu crescimento anormal caracteriza o chamado câncer de próstata (CP). Uma vez que os diferentes tipos de câncer estão associados aos diferentes tipos de células do corpo, tumores malignos que têm origem nas células glandulares, como a próstata, são denominados adenocarcinomas, e apresentam uma propensão significativa à invasão de tecidos adjacentes (Bacelar et al, 2015; Prado, 2014)

O câncer de próstata (CP), em sua fase inicial, se desenvolve de maneira silenciosa, sem a manifestação evidente de sintomas. Em muitos casos, pode se assemelhar ao crescimento benigno da próstata, caracterizado por dificuldade em urinar e aumento da frequência urinária. À medida que progride para estágios mais avançados, pode apresentar sintomas como dor óssea, complicações urinárias e, em situações mais graves, infecção generalizada ou insuficiência renal. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata (CP) estão relacionados à presença da testosterona e ao avanço da idade, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade da doença aumentam de forma significativa em homens com mais de 50 anos (INCA, 2023a).

A detecção precoce e o tratamento apropriado podem resultar em altas chances de cura para muitos tipos de câncer (OPAS, 2020). O tratamento oncológico engloba diversas abordagens, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e terapia alvo, sendo raras as situações em que neoplasias malignas são abordadas por meio de uma única modalidade terapêutica. (Silva et al, 2017; INCA, 2019a). Para optar pelo tratamento adequado contra o câncer de próstata, faz-se necessário considerar a idade do paciente, suas

comorbidades, o tamanho da próstata, o estágio do tumor e a extensão do comprometimento do organismo (Bacelar et al, 2015), de forma a se concentrar não apenas no controle oncológico, mas também na preservação da qualidade de vida do paciente (Damião, 2015).

Conforme registrado no livro "Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil" do Instituto Nacional de Câncer, o câncer de próstata é globalmente classificado como a quarta posição em frequência de casos de câncer, representando 7,3% do total. No ano de 2020, a estimativa foi de 1,4 milhão de novos casos de câncer de próstata, correspondendo a 15,2% de todas as incidências de câncer em homens. Em relação à mortalidade no Brasil, foram registrados 15.841 óbitos decorrentes de CP no mesmo período.

1.2. Quimioterapia e quimioterápicos

A quimioterapia é uma das principais alternativas para a cura, controle e alívio dos sintomas no tratamento do câncer (Sawada et al, 2009). A aplicação da quimioterapia pode ocorrer por diferentes vias, dentre elas estão: via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica. Esse método utiliza medicamentos que se misturam ao sangue e se distribuem por todo o organismo, alcançando diferentes regiões e atuando sobre as células cancerosas responsáveis pela formação do tumor, com o objetivo de impedir seu crescimento e disseminação (INCA, 2023b).

Os quimioterápicos, também conhecidos como antineoplásicos, são drogas citotóxicas que influenciam o ciclo celular de diversas maneiras, como na duplicação do DNA ou na separação de cromossomos recém-formados. A maioria desses medicamentos tem como alvo todas as células que se dividem rapidamente, sem especificidade. Portanto, a quimioterapia possui o potencial de causar danos aos tecidos saudáveis, especialmente aqueles com alta taxa de renovação celular, resultando em efeitos adversos frequentes e intensos. (Iuchno; Carvalho, 2019; Tavares et al, 2019). Ademais, a quimiorresistência releva-se outro obstáculo no

tratamento de neoplasias, uma vez que limita a eficácia da quimioterapia podendo levar ao fracasso do tratamento. Os tumores podem demonstrar resistência intrínseca prévia à quimioterapia, ou essa resistência pode ser desenvolvida durante o tratamento em tumores inicialmente sensíveis (Prihantono, 2021; Wilson et al, 2006).

Os dados alarmantes aqui destacados, evidenciam o desafio significativo que o câncer representa para a saúde pública e reforçam a necessidade crescente do desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Dessa forma, a descoberta de novos fármacos torna-se essencial, seja para serem empregados em conjunto com os tratamentos convencionais — reduzindo efeitos adversos —, seja como abordagens inovadoras de terapia sistêmica, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos milhões de indivíduos impactados por essa doença devastadora.

1.3. Complexos metálicos e o cobre (Cu)

A descoberta da cisplatina por Barnett Rosenberg, na década de 1960, representou um marco na utilização de compostos metálicos no tratamento do câncer. Esse achado estabeleceu as bases para a era contemporânea dos fármacos anticancerígenos à base de metais e impulsionou de forma significativa as pesquisas nesse campo. Desde então, muitos compostos a base de platina foram sintetizados e (Ndagi; Mhlongo; Soliman, 2017), apesar da eficácia no tratamento de diversos tipos de tumores, um desafio significativo ainda reside nos efeitos colaterais intensos e na resistência das células tumorais a estes medicamentos. A busca por superar tais problemas impulsiona, assim, o desenvolvimento de medicamentos com maior compatibilidade biológica (Cross et al, 2018).

O crescente interesse no potencial terapêutico dos metalocomplexos na terapia do câncer decorre, principalmente, das propriedades únicas dos metais. Essas características permitem o desenvolvimento de complexos metálicos capazes de se ligar seletivamente a alvos

biomoleculares, favorecendo a entrega direcionada da droga às células cancerosas e contribuindo para superar um dos principais obstáculos farmacocinéticos no tratamento (Ndagi; Mhlongo; Soliman, 2017). Nesse cenário, os complexos metálicos à base de cobre (Cu) têm atraído atenção não apenas pela ampla gama de atividades farmacológicas — incluindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-biofilmes e anti-inflamatórias (Cross et al., 2018) —, mas também por apresentarem menor toxicidade em comparação a outros metais, visto que o cobre é um elemento naturalmente presente no organismo humano (Pravin et al., 2017).

Nesse contexto, diversos protótipos de metalofármacos que contêm cobre têm sido estudados como possíveis agentes antineoplásicos (Pravin et al, 2017). Ao serem contrastados com os complexos à base de platina, aqueles que contêm cobre em sua formulação tendem a provocar menor resistência das células tumorais ao tratamento, apresentar efeitos colaterais mais moderados no organismo e a proporcionar maior abrangência em sua atividade antitumoral (Ruiz-Azuara; Bravo-Gomez, 2010).

Embora o perfil farmacocinético da maioria desses medicamentos ainda não tenha sido totalmente elucidado em seres humanos, há uma expectativa otimista. O desenvolvimento de compostos à base de metal, direcionados seletivamente às células cancerígenas, representa uma notável inovação nessa área de pesquisa (Ndagi; Mhlongo; Soliman, 2017), oferecendo perspectivas promissoras para enfrentar o desafio do câncer e justificando o presente estudo.

Sendo assim, o presente estudo visa analisar, *in vitro*, o potencial antitumoral contra a linhagem de células humanas do câncer de próstata (PC-3) de um novo metalocomplexo de cobre ($[\text{Cu}(\text{4-FH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$), denominado DRI-12, formado a partir da associação de aceto-hidrazida, perclorato e 1,10 fenantrolina ao cobre (II) e sintetizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia/MG. A escolha desse

metalocomplexo se deu partindo da hipótese de que devido às propriedades farmacológicas e antitumorais dos metais essenciais, como o cobre, o DRI-12 apresenta um potencial promissor no combate a células cancerígenas.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antitumoral *in vitro* do metalocomplexo DRI-12 em linhagens celulares prostáticas tumorigênicas (PC-3) e não tumorigênicas (PNT-2) bem como verificar seu efeito genotóxico.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do DRI-12 em ambas as linhagens prostáticas e analisar seu efeito inibitório sobre a proliferação celular;
- Determinar a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) *in vitro* para as duas linhagens;
- Calcular o Índice de Seletividade (IS) do complexo e discutir suas implicações terapêuticas;
- Investigar a interação do metalocomplexo DRI-12 com o DNA por meio de ferramentas *in silico*;
- Avaliar a capacidade genotóxica do DRI-12, por meio do ensaio Cometa;

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese do metalocomplexo de cobre (II) DRI-12

Para a obtenção do complexo DRI-12, caracterizado pela associação do Cobre (II) a 4-ácido fluorofenoxiacético Hidrazida e 1,10-fenantrolina, analisado neste estudo, a equipe do Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LasFar) da Universidade Federal de

Uberlândia preparou a reação de Cu (ClO₄)₂·6H₂O (0.09 gramas (g), 0.25 micro mols (μM) em conjunto com 0.25 μM de hidrazida diluídas em metanol. A solução foi submetida a agitação por 2 horas, seguida pela adição de um ligante heterocíclico (0,25 μM) doador de N,N, anteriormente dissolvido em metanol. Após um período de 48 horas, o composto foi filtrado, lavado com metanol e seco por redução de pressão (Paixão et al, 2017).

3.2. Manutenção das linhagens celulares *in vitro*

As linhagens utilizadas para o presente estudo consistem em células humanas prostáticas tumorais (PC-3) e não tumorais (PNT-2) como controle. As quais foram cultivadas *in vitro* em garrafas de cultura, utilizando meio *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) -1640 contendo HEPES e L-glutamina (*Gibco®*, Paisley, UK), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (*Cultilab®*, Campinas, Brasil) e 1% de antibiótico, sendo estes penicilina e estreptomicina (*Sigma Chemical Co. ®*, St. Louis, USA). As células foram mantidas em incubadora a uma temperatura de 37°C e concentração de CO₂ em 5%, seguindo as instruções dos fabricantes.

3.3. Ensaio de citotoxicidade por redução da resazurina

O ensaio de viabilidade celular foi realizado por meio da redução da resazurina, que, ao atravessar as membranas de células viáveis com metabolismo ativo, é convertida em resorufina pelas desidrogenases mitocondriais (Riss et al., 2016). O objetivo foi avaliar a capacidade citotóxica do complexo metálico de cobre (II) DRI-12. Para isso, cada linhagem celular foi cultivada separadamente em quadruplicatas de 100 microlitros (μL) de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (meio completo), em microplacas estéreis de 96 poços, de modo que cada poço continha 2 x 10⁴ células. Após a aderência das células à placa, o composto metálico DRI-12 foi diluído de

forma seriada, adicionado aos poços e testado nas células em concentrações variando de 1 a 100 µM.

Na sequência, a microplaca foi armazenada em uma incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C por aproximadamente 21 horas. Ao fim dessa etapa de tratamento, cada poço da placa recebeu 20 µL do reagente colorimétrico *AlamarBlue* (resazurina), que apresenta coloração azul. Em seguida, a microplaca foi retornada à incubadora sob as mesmas condições previamente descritas. Aguardou-se de 4 a 6 horas até que o controle negativo apresentasse uma mudança na coloração para um tom rosa intenso, indicando que o reagente colorimétrico havia sido completamente metabolizado pelas células. Posteriormente, procedeu-se com a leitura da absorbância em uma leitora de placas.

As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 570 nanômetros (nm) e 600 nm, e os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da viabilidade celular, por meio da equação correspondente.

Com base no trabalho de Bénéré et al. (2007), a viabilidade celular foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Viabilidade Celular} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)} \times 100$$

Onde:

- A₁ representa a absorbância das células tratadas com DRI-12 a 570 nm;
- A₂ é a absorbância das células tratadas com DRI -12 a 600 nm;
- O₁ é o coeficiente de extinção molar (E) de AlamarBlue oxidado a 570 nm, previamente determinado em 117,216;

- O_2 é o coeficiente de extinção molar (E) de AlamarBlue oxidado a 600 nm, previamente determinado em 80,586;
- P_1 corresponde à absorbância do controle negativo a 570 nm;
- P_2 é a absorbância do controle negativo a 600 nm.

3.3.1. Índice de seletividade (IS)

Para confirmar e avaliar a seletividade do metalocomplexo em relação às células tumorais, foi preciso calcular o índice de seletividade (IS). Esse índice é obtido pela razão entre as concentrações necessárias para reduzir em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) tanto na linhagem tumoral quanto na não tumoral.

A seletividade do composto foi determinada utilizando a fórmula abaixo:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ linhagem tumoral}}$$

Segundo Badisa et al. (2009), quando o índice de seletividade (IS) é igual ou superior a 2, o composto demonstra maior afinidade pelas linhagens tumorais, sendo capaz de eliminar até o dobro de células cancerígenas em comparação com as células saudáveis, sendo, portanto, considerado promissor.

3.4. Piloto do Ensaio de *Docking* Molecular

Com o avanço dos programas computacionais e bancos de dados, a modelagem molecular se tornou uma ferramenta indispensável no planejamento e no desenvolvimento de novos fármacos (Salmaso; Moro, 2018), utilizando química computacional e técnicas gráficas, ela fornece representações tridimensionais que facilitam a análise das estruturas e propriedades

das moléculas, reduzindo tempo e custos no processo de pesquisa (Pinzi; Rastelli, 2019). Com isso, ao aplicar técnicas como *docking* molecular e triagem virtual, é possível direcionar a síntese de novos complexos, otimizar o design de ligantes e desenvolver compostos mais eficientes para alvos terapêuticos específicos (Tarzia; Jelfs, 2022).

Em colaboração com os doutorandos Ricardo Campos Lino e Pedro Henrique Alves Machado, foi desenvolvido um ensaio piloto de *docking* molecular com o objetivo de identificar interação entre o complexo metálico de Cobre (II) e uma molécula de DNA humano. Este estudo preliminar teve como objetivo fornecer uma base para a realização do experimento subsequente (Ensaio Cometa), no qual a interação investigada serviria como um direcionamento valioso e um indicativo positivo para aprofundar as análises e validar os resultados esperados.

Para o desenvolvimento do projeto piloto, o complexo metálico de Cobre (II), DRI-12, foi modelado utilizando o *software Avogadro* (versão 1.1.1). A otimização estrutural foi realizada com a ferramenta *Extensions*, com o objetivo de obter uma geometria aprimorada utilizando o campo de força UFF (*Universal Force Field*). Em seguida, foi realizado um processo de preparação do metalocomplexo no *software AutoDock* (versão 1.5.7), com o qual foram removidas as moléculas de água indesejadas, e apenas hidrogênios polares e a carga de *Gasteiger* foram adicionados.

Na sequência, foi realizado o estudo de *docking* molecular da espécie metálica DRI-12 com macromoléculas de DNA, também utilizando o *AutoDock* (versão 1.5.7). A estrutura cristalina do DNA (126D), contendo a sequência CATGGCCATG, foi obtida do *Protein Data Bank* (www.rcsb.org). As moléculas de água presentes ao redor da estrutura do DNA foram removidas, e hidrogênios polares, junto com as cargas de *Kollman*, foram incorporados à estrutura.

Para a análise do estado de ligação, foi definida uma caixa de varredura (*grid box*) com dimensões de 62x58x96, com a qual o DNA foi estudado, considerando-se toda a superfície da biomolécula na busca simultânea de sítios de ligação e possíveis conformações. Os cálculos de interação entre o ligante e o receptor foram realizados utilizando algoritmos genéticos “*lamarkianos*”. Por fim, o programa *Discovery Studio Visualizer* (Biovia, 2021) foi utilizado para gerar as imagens que ilustram as interações entre o DNA e o metalocomplexo DRI-12.

3.5. Ensaio Cometa (SCGE)

O ensaio Cometa, também conhecido como eletroforese de gel de célula única (*SCGE*, do inglês, *Single Cell Gel Electrophoresis*), foi desenvolvido pela primeira vez em 1984 por Ostling e Johanson, fornecendo abordagens quantitativas para avaliar a extensão dos danos causados por determinados tratamentos no DNA de uma célula *in vitro*. Assim, para verificar se o complexo à base de cobre (II), DRI-12, possui a capacidade de gerar degradação do material genético, foi realizado um estudo baseado no trabalho de Arruda et al. (2022), com algumas modificações.

As células da linhagem tumorigênica PC-3 foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo e, em seguida, distribuídas em placas de 6 poços, com 2×10^5 células por poço. Após 3 horas, as culturas foram tratadas com três concentrações do metalocomplexo DRI-12 – $[IC_{50}/2] = 2,5 \mu M$, $[IC_{50}] = 5 \mu M$ e $[2 \times IC_{50}] = 10 \mu M$ – controle negativo (somente meio de cultura) e controle positivo (Cisplatina a $200 \mu M$), todos em triplicata. As placas foram então mantidas em incubadora a $37^\circ C$, com 5% de CO_2 .

Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi removido e armazenado, e os poços foram lavados com 500 μL de tampão salino-fosfato (PBS). Em seguida, cada poço foi tratado com 500 μL de tripsina por 6 minutos. A tripsina foi inativada utilizando o sobrenadante armazenado de cada poço, acrescido do meio completo, na intenção de preservar a maior

quantidade possível de células. O conteúdo de cada poço foi então transferido para microtubos e centrifugado por 10 minutos a 1000 rotações por minuto (RPM). A seguir, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspensionado em soro fetal bovino (SFB) inativado e filtrado.

Em seguida, adicionaram-se 450 μ L da suspensão celular, composta por 150 μ L de células (pellet ressuspensionado em SFB) e 300 μ L de agarose *Low Melting Point*, sobre lâminas previamente preparadas com uma camada de agarose *Normal Melting*, de forma linear e utilizando ponteiras autoclavadas. Após a aplicação, uma lamínula foi colocada sobre a solução para espalhá-la uniformemente. As lâminas foram então armazenadas em ambiente refrigerado por 40 minutos, até que o material se solidificasse. Após a solidificação, as lamínulas foram cuidadosamente removidas para evitar a retirada do conteúdo celular, e as lâminas permaneceram imersas em solução de lise por 24 horas.

Após este período, as lâminas foram posicionadas em uma cuba de eletroforese horizontal, e o tampão de eletroforese foi cuidadosamente vertido até cobrir completamente as lâminas. As quais, foram incubadas em ambiente refrigerado por 30 minutos antes do início da corrida de eletroforese, permitindo a desnaturação do DNA em meio alcalino. Após esse tempo, o tampão restante foi adicionado, e a corrida de eletroforese foi realizada por 25 minutos, a 25 volts (V) e 300 miliamperes (mA).

Após a corrida, as lâminas passaram pelo processo de neutralização, onde foram submetidas a um tampão específico durante 5 minutos, com o processo sendo repetido mais duas vezes. Em seguida, as lâminas foram secas em posição inclinada, fixadas com álcool etílico absoluto (100%) por 5 minutos e, então, armazenadas em refrigerador.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 25 μ L de brometo de etídio e cobertas com uma lamínula. Em seguida, foram imediatamente examinadas em um microscópio de fluorescência invertido Evos (*Thermo Fisher Scientific*®, *Massachusetts*, EUA), equipado com

filtro PE (absorção a 521 nm e emissão a 602 nm). A contagem das células foi feita de forma aleatória, considerando 50 células por lâmina, totalizando a captura de 100 células por concentração analisada, conforme recomendado na literatura.

3.6. Análises estatísticas

A determinação do valor de IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA*), por meio de uma regressão não linear. Nesse processo, a viabilidade celular foi expressa como uma função logarítmica de base 10 das concentrações testadas, considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

As imagens do ensaio Cometa (SCGE) capturadas pelo microscópio de fluorescência Evos foram examinadas utilizando o *software Comet Score*, versão 2.0, e os dados gerados foram analisados através do programa *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA*) utilizando análise de variância *One-way* (ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Citotoxicidade do complexo DRI-12 pelo ensaio colorimétrico AlamarBlue (resazurina): IC₅₀ e índice de seletividade (IS)

Os resultados de citotoxicidade foram obtidos por meio do ensaio colorimétrico de redução da resazurina a resorufina nas linhagens humanas prostáticas PC-3 (tumorigênica) e PNT-2 (não tumoral). A Figura 1 (A e B) ilustra o gradiente de cores na placa de 96 poços utilizada no experimento, em que a coloração azul/roxa indica menor metabolismo da resazurina, refletindo baixa viabilidade celular, enquanto a coloração rosa evidencia maior redução da resazurina a resorufina, indicando maior viabilidade celular.

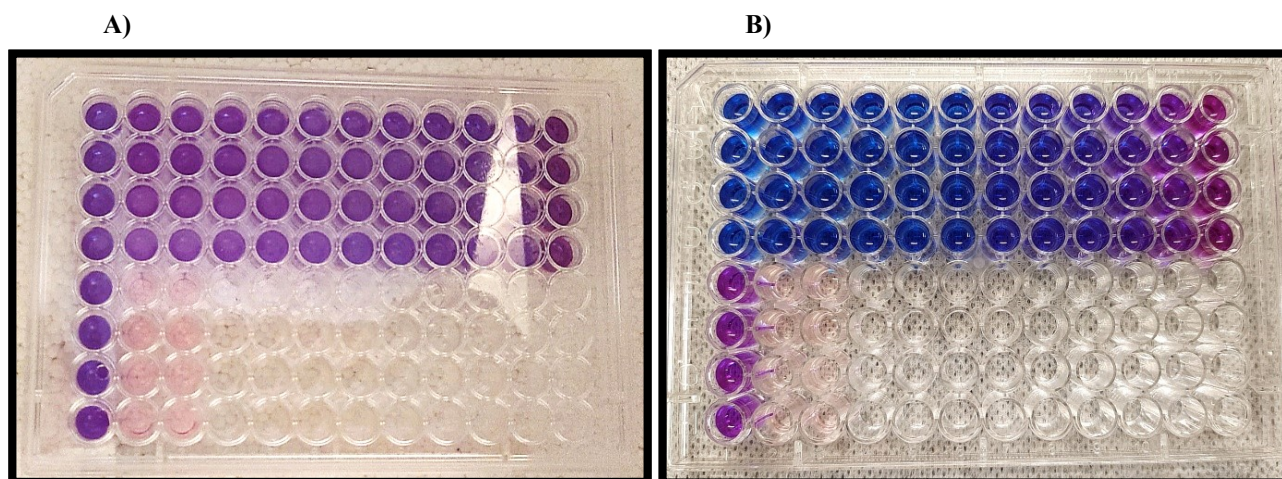


Figura 1. Representação ilustrativa do gradiente de cores no ensaio colorimétrico de citotoxicidade. **A)** Microplaca de 96 poços imediatamente após a adição do reagente colorimétrico resazurina, referente a linhagem PNT-2. **B)** Microplaca de 96 poços após o tempo de redução do reagente colorimétrico resazurina à resorufina, referente a linhagem PNT-2. (Fonte: autoria própria)

A citotoxicidade refere-se à capacidade de um composto de causar danos ou morte celular. Em 1977, Nardone a caracterizou como um conjunto de alterações que comprometem a homeostase celular, afetando a adaptação, metabolismo, replicação e sobrevivência das células. Essa definição é fundamental para entender como agentes químicos ou biológicos podem interferir na viabilidade celular. Nesse contexto, o IC_{50} , ou concentração inibitória média, é amplamente utilizado para quantificar essa interferência, representando a concentração necessária de um composto para reduzir em 50% a viabilidade ou atividade de uma população celular em relação a um controle não tratado.

Após a leitura das placas no espectrofotômetro e aplicação dos cálculos de viabilidade celular, foi gerado um gráfico sigmoidal utilizando o *software GraphPad Prism 8*, o qual representa a curva de dose-resposta inibitória. A partir dessa curva, foi possível determinar a concentração necessária do metalocomplexo DRI-12 para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC_{50}), conforme ilustrado nas Figuras 2 e 3.

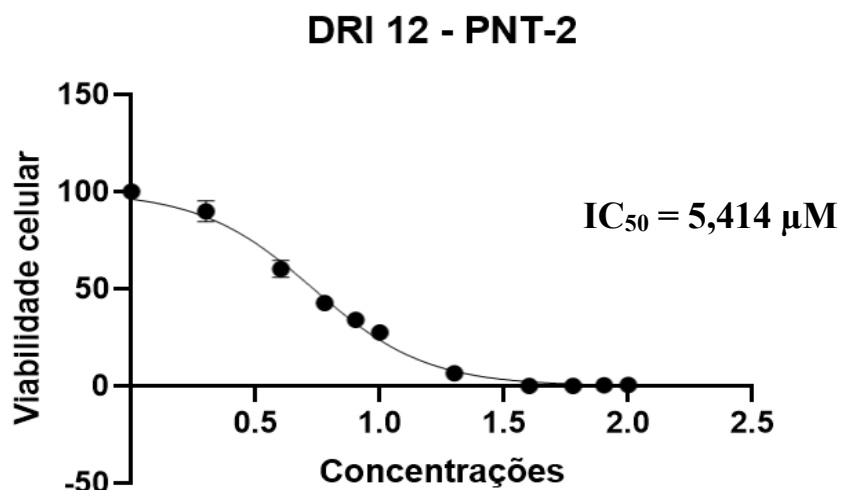


Figura 2. Curva de dose-resposta sigmoidal e representação do IC_{50} após o tratamento das células PNT-2 com o composto DRI-12. (Fonte: autoria própria)

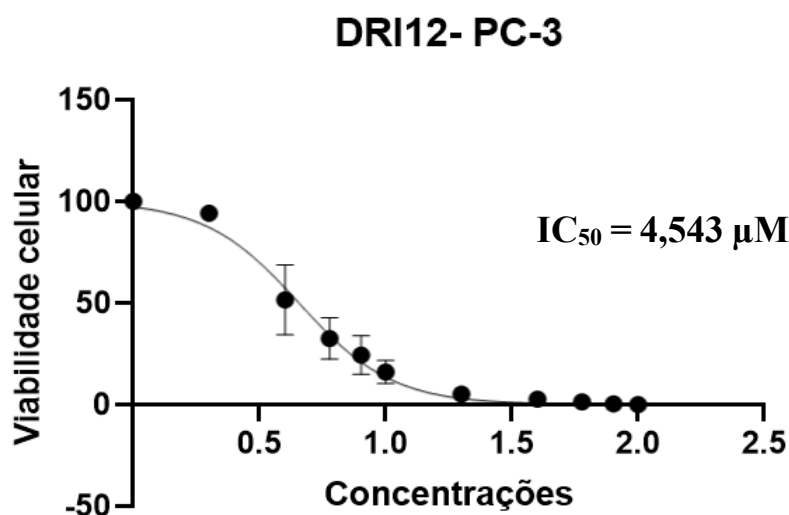


Figura 3. Curva de dose-resposta sigmoidal e representação do IC_{50} após o tratamento das células PC-3 com o composto DRI-12. (Fonte: autoria própria)

No desenvolvimento de fármacos, a citotoxicidade medida pelo IC_{50} é essencial para avaliar a eficácia e a segurança de novos compostos, comparando diretamente seu impacto sobre células normais e tumorais. A compreensão detalhada do IC_{50} não apenas quantifica o

potencial citotóxico de um composto, mas também fornece informações valiosas para a tomada de decisões no desenvolvimento de tratamentos e na avaliação de riscos.

Ao avaliar a citotoxicidade e a capacidade inibitória do composto estudado, os resultados observados foram bastante promissores. Embora ainda existam dados limitados sobre a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do complexo de Cobre (II) DRI-12 em diversas linhagens celulares, devido ao seu recente desenvolvimento em colaboração com nossos parceiros.

Os valores obtidos — 5,414 µM para a linhagem não tumoral (PNT-2) e 4,543 µM para a linhagem tumorigênica (PC-3), conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3 — evidenciam um elevado potencial citotóxico, visto que uma concentração consideravelmente reduzida do metalocomplexo foi suficiente para alcançar o efeito desejado. Assim, o composto demonstrou forte citotoxicidade, sugerindo uma interação eficaz com as células tratadas e, possivelmente, o bloqueio de vias biológicas essenciais para sua sobrevivência e proliferação.

Com base nos valores de IC₅₀ obtidos, foi calculado o índice de seletividade (IS), que resultou em um valor de 1,19. A compreensão desse índice é essencial para avaliar a eficácia e a segurança dos possíveis metalofármacos, uma vez que representa a capacidade dos compostos de distinguir entre células tumorais e células saudáveis em seu mecanismo de ação. Baseado na literatura, é considerado um valor de $IS \geq 2$ para indicar alta seletividade de um composto em relação às células tumorais (Badisa et al., 2009). Dessa forma, o valor obtido sugere que, embora o metalocomplexo DRI-12 apresente algum grau de especificidade, há uma necessidade de estratégias para aprimorar seu potencial seletivo.

A entrega direcionada de fármacos é uma alternativa promissora, podendo envolver o uso de sistemas de transporte como nanopartículas, lipossomas ou conjugação com anticorpos, que aumentam a concentração do composto especificamente nos tecidos tumorais, reduzindo

seus efeitos em células saudáveis. Além disso, modificações estruturais por meio do bioisosterismo são frequentemente utilizadas na química medicinal e também podem ser exploradas para melhorar as propriedades do complexo, a fim de aumentar sua estabilidade, afinidade por alvos tumorais e reduzir interações indesejadas.

É importante destacar que a interpretação dos índices discutidos acima deve ser sempre contextualizada dentro do sistema experimental utilizado, uma vez que diferentes tipos celulares podem apresentar sensibilidades e comportamentos variados ao mesmo composto, refletindo perfis de citotoxicidade diferenciados (Arruda et al., 2022). Nesse contexto, um estudo realizado por Bontempo et al., 2022, avaliou dois diferentes complexos de cobre em linhagens prostáticas humanas PC-3 (tumoral) e PNT-2 (não tumoral) ao longo de 24 horas, em condições comparáveis às do presente estudo. Uma comparação detalhada dos resultados pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela comparativa da citotoxicidade *in vitro* entre dois complexos metálicos de Cobre (II) (Bontempo et al., 2022) e o DRI-12 nas linhagens PC-3 e PNT-2. (Fonte: autoria própria)

	4-FH-Phen-Cu (II)		4-NH-Phen-Cu (II)		DRI - 12	
Linhagem	PC-3	PNT-2	PC-3	PNT-2	PC-3	PNT-2
IC ₅₀	46,58 µM	24,5 µM	9,63 µM	3,63 µM	4,543 µM	5,414 µM
IS	0,52	0,52	0,37	0,37	1,19	1,19

(Bontempo et al., 2022) (Bontempo et al., 2022)

Os dados destacados na Tabela 1 evidenciam diferenças importantes nos valores de IC₅₀ e no índice de seletividade (IS) entre os compostos testados. Comparativamente, o

complexo DRI-12 apresentou uma atividade citotóxica significativamente superior em concentrações mais baixas, sendo aproximadamente 10,25 vezes mais eficaz que o 4-FH-Phen-Cu (II) (IC_{50} de 4,543 μ M em comparação a 46,58 μ M) e cerca de 2,12 vezes mais eficaz que o 4-NH-Phen-Cu (II), com IC_{50} de 9,63 μ M, na redução de 50% da viabilidade celular para a mesma linhagem (PC-3).

Retomando Ndagi, Mhlongo e Soliman (2017), pode-se afirmar que a descoberta da cisplatina representou um marco na introdução de quimioterápicos metalocomplexos no tratamento do câncer. Sua eficácia no combate a diversos tipos de tumores é amplamente documentada na literatura atual, assim como os efeitos adversos associados ao seu uso, que impulsionaram a busca e o desenvolvimento de novos medicamentos com maior compatibilidade biológica (Cross et al., 2018).

De acordo com a literatura, em um estudo que avaliou os efeitos citotóxicos de diversos complexos metálicos, incluindo a cisplatina, nas linhagens celulares de câncer de próstata PC3 e de pulmão A549 (Moraes; Rey, 2016), sob condições também comparáveis às do presente trabalho, foi demonstrado que a cisplatina apresentou um valor de IC_{50} de aproximadamente 99,99 μ M para a linhagem celular prostática tumoral (Tabela 2). Esse valor é cerca de 22 vezes maior do que o IC_{50} do complexo de cobre (II) DRI-12, corroborando seu alto potencial citotóxico evidenciado nesse estudo.

Tabela 2. Tabela comparativa entre as doses capazes de reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) *in vitro* em linhagem prostática tumoral da cisplatina (Moraes; Rey, 2016) e do metalocomplexo de cobre (II) DRI-12. (Fonte: autoria própria)

Linhagem PC-3		
Complexo	Cisplatina	DRI-12
IC ₅₀	99,99 μ M	4,543 μ M

(Moraes; Rey, 2016)

A diferença observada destaca que, apesar da cisplatina ser uma metalodroga amplamente utilizada em tratamentos oncológicos, ela apresenta limitações específicas para células PC-3, reforçando a importância de buscar novas alternativas terapêuticas mais eficazes.

Em suma, é notória a superioridade do complexo metálico DRI-12 em inibir 50% da viabilidade celular quando comparado à cisplatina e a outras metalomoléculas de cobre (tabelas 1 e 2), devido a sua interação mais eficaz e mecanismos de ação mais precisos na indução de citotoxicidade. Esse desempenho ressalta seu potencial promissor como candidato a quimioterápico em futuros testes terapêuticos, enfatizando a importância e a necessidade de investigações contínuas para otimizar sua seletividade e minimizar os efeitos em células saudáveis.

4.2. Piloto do Ensaio de *Docking* molecular

O *docking* molecular é uma ferramenta fundamental para analisar e compreender como diferentes moléculas interagem e se ligam, permitindo avaliar a interação entre o composto em estudo e outra molécula de interesse. Esse método possibilita verificar a presença de interações significativas que possam viabilizar a aplicação prática do composto antes de avançar com testes adicionais (Schindler, 2022). Com a determinação da existência e intensidade dessas

interações, torna-se viável realizar estudos mais aprofundados para mapear as vias moleculares envolvidas e analisar os efeitos resultantes da ligação.

Os resultados do ensaio piloto de *docking* molecular entre o complexo metálico DRI-12 e o DNA humano indicaram uma interação termodinamicamente estável, evidenciada pelo valor de energia livre de ligação de -10,21 Kcal/mol. Esse valor sugere uma forte afinidade do DRI-12 pelo DNA, já que menores valores de energia correspondem a um melhor encaixe molecular (ABDEL-RAHMAN et al., 2018).

A análise detalhada das interações demonstrou que o complexo DRI-12 tem preferência de ligação pelo sulco menor do DNA, onde se conecta a ambas as fitas por meio de quatro ligações de hidrogênio com bases nitrogenadas específicas. As interações ocorreram com a adenina 8 da cadeia A, mediadas pelo hidrogênio 3 e um oxigênio do complexo, e com as guaninas 14 e 15 da cadeia B, através dos hidrogênios 3 e 22 e um segundo oxigênio do complexo. As representações gráficas do estudo (Figura 4) destacaram a localização precisa do DRI-12 no sulco menor, com esferas transparentes indicando o alcance das interações intermoleculares, proporcionando uma visualização clara da interação estabelecida.

A afinidade do DRI-12 por essa região específica sugere um potencial para afetar o DNA de maneira direcionada, podendo induzir alterações estruturais com impacto em processos biológicos essenciais, como a replicação e a transcrição. Tal comportamento pode estar associado à sua atividade antitumoral, indicando um possível mecanismo de ação que poderia ser explorado para o desenvolvimento de terapias antitumorais mais específicas, com o objetivo de minimizar danos em células saudáveis.

O estudo preliminar buscou investigar a possibilidade de interação entre o DRI-12 e uma molécula de DNA humano. Os resultados obtidos reforçam o potencial do DRI-12 como um agente antitumoral promissor, cuja seletividade e eficácia terapêutica podem ser otimizadas

em pesquisas futuras. A confirmação dessa interação com o DNA torna necessária a investigação de possíveis efeitos genotóxicos, motivando a realização do estudo de genotoxicidade por meio do ensaio Cometa. Esse teste permitirá quantificar e caracterizar a extensão dos danos ao DNA causados pelo DRI-12, oferecendo uma análise complementar sobre os danos provocados pela interação do metalocomplexo com a molécula-alvo.

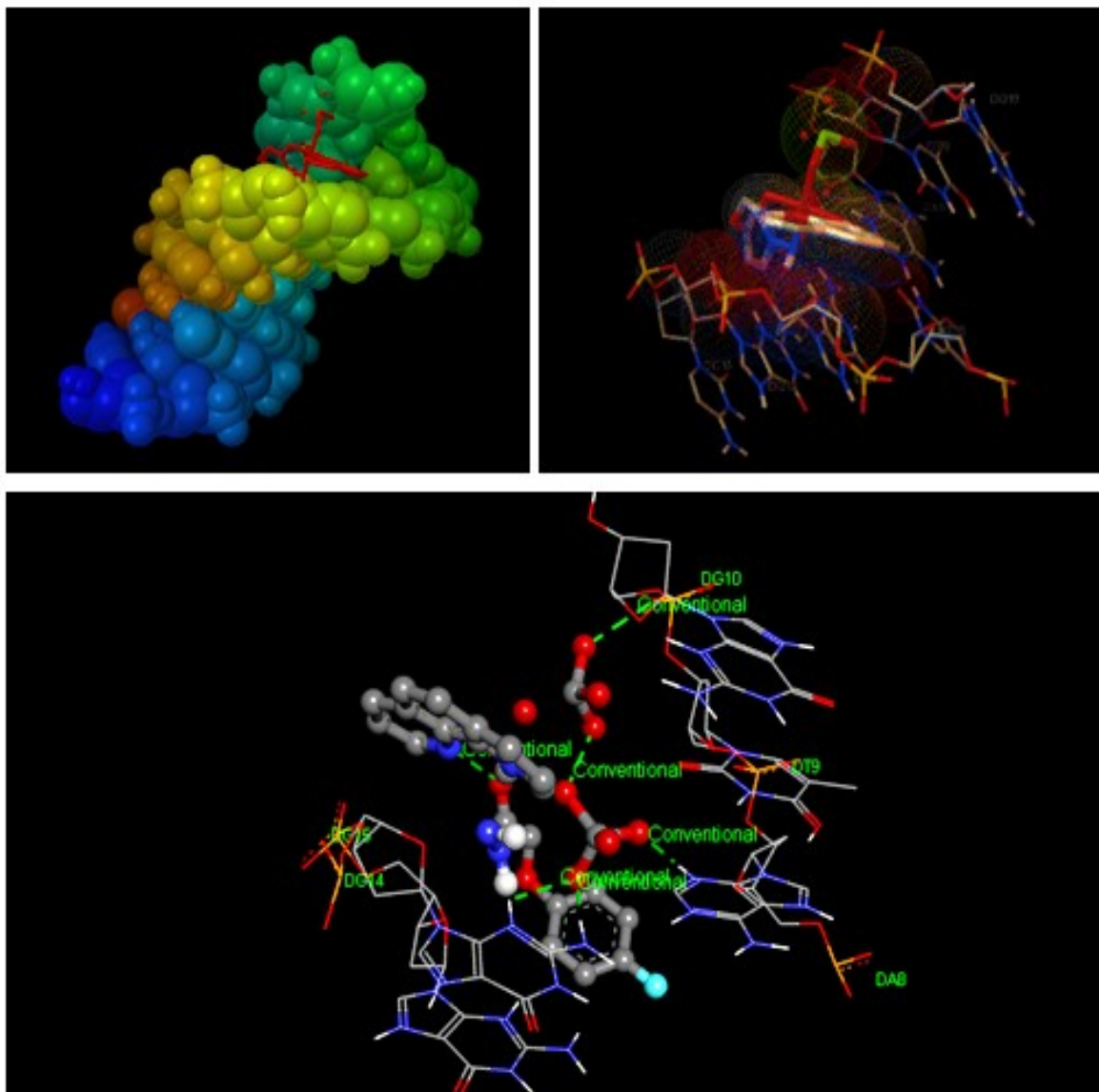


Figura 4. Interação entre DRI-12 e DNA (126D).

4.3. Atividade genotóxica do metalocomplexo DRI-12 por Ensaio Cometa

O ensaio Cometa, amplamente utilizado em estudos genotoxicológicos, possibilita a determinação, avaliação e quantificação dos danos ao DNA em núcleos celulares individuais, com base na migração diferencial de fragmentos de DNA durante um processo de microeletroforese (ÖSTILING; JOHANSON, 1984). Após a realização desse processo, as células que permanecem sem danos ao DNA mantêm seus núcleos intactos e arredondados.

Em contrapartida, nas células com quebras simples ou múltiplas no DNA, observa-se a migração dos fragmentos do material genético para fora do núcleo, formando uma estrutura semelhante a um cometa, cuja cauda é composta pelos fragmentos de DNA e reflete a desestruturação nuclear. O comprimento do DNA na cauda do cometa está diretamente associado ao nível de dano sofrido pela célula (FAIRBAIRN et al., 1995).

O estágio final do ensaio Cometa envolve a quantificação da distribuição de DNA entre a região da cabeça (núcleo) e a cauda dos cometas, utilizando tanto a classificação visual quanto a análise de imagem. A classificação visual consiste em uma avaliação categórica da migração do DNA, organizando os cometas em diferentes classes (*scores*) com base em suas formas, conforme descrito por Collins et al. (1995), que propuseram um sistema de classificação em cinco níveis de dano, que vai de 0 (sem cauda visível, indicando ausência de dano detectável) até 4 (cabeça do cometa pequena, com a maior parte do DNA localizado na cauda) e, apesar de ser uma técnica mais subjetiva, apresentou uma excelente correlação com as medições obtidas por análise de imagem. Em contraste, a análise de imagem gera dados específicos e precisos sobre a migração do DNA, como o comprimento da cauda do cometa, a porcentagem de DNA presente na cauda e outros parâmetros, sendo geralmente conduzida com o apoio de um *software* especializado (Møller et al., 2023).

No presente trabalho, o ensaio Cometa foi realizado com o objetivo de avaliar os danos ao DNA causados pelo composto DRI-12, considerando sua interação com células prostáticas humanas PC-3 (tumorigênicas). Essa abordagem permitiu quantificar a genotoxicidade e analisar os padrões de lesão ao DNA. As análises de imagem foram realizadas utilizando o *software Comet Score*, versão 2.0, com base nos parâmetros do ensaio Cometa: porcentagem de DNA na cauda (% *Tail DNA*), momento da cauda (*tail moment*) e comprimento da cauda (*tail length*) (Figura 5), os quais estão diretamente relacionados à extensão do dano ao DNA. O comprimento e a porcentagem de DNA na cauda indicam a extensão do dano, enquanto o momento da cauda é calculado multiplicando o comprimento da cauda pela porcentagem de DNA presente (Stefani et al., 2020).

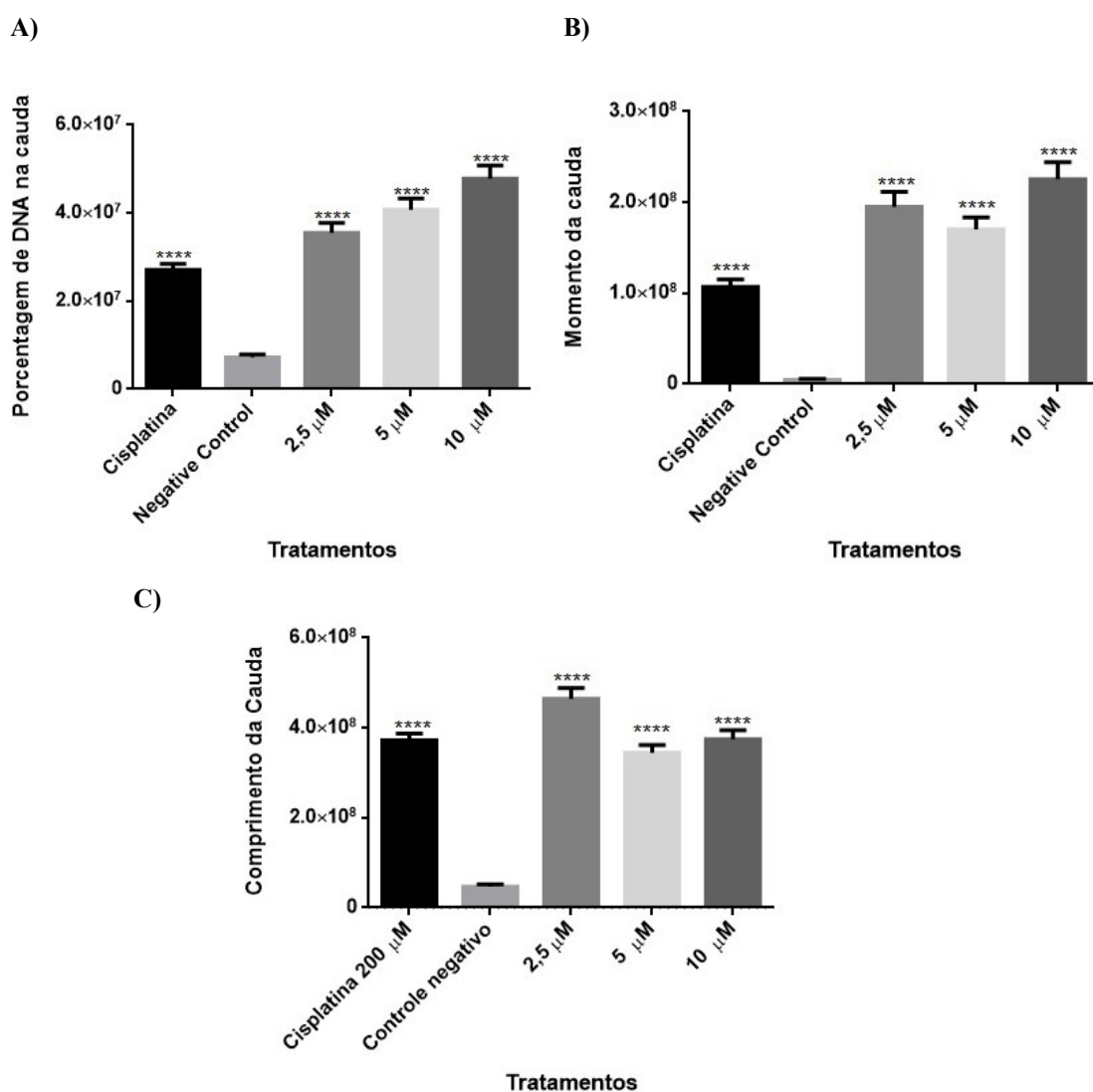


Figura 5. Análises de imagem com o *software Comet Score* para avaliação dos danos ao DNA causados pelo composto DRI-12 em células PC-3, considerando os controles (positivo e negativo) e as três concentrações do tratamento, demonstrados por A) % de DNA na cauda (*% Tail DNA*); B) momento da cauda (*tail moment*); e C) comprimento da cauda (*tail length*), de acordo com o ensaio Cometa. Os dados representam a média \pm o erro padrão, com diferenças significativas em relação ao controle indicadas por asteriscos (ANOVA). Os níveis de significância são representados por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (Fonte: autoria própria).

Comparando os índices analisados no *software*, observa-se que o controle positivo (cisplatina 200 μM) apresentou um alto grau de dano, conforme esperado de um agente quimioterápico com forte genotoxicidade, enquanto o controle negativo manteve valores significativamente baixos, confirmando a ausência de danos em células não tratadas. Todas as concentrações testadas do complexo DRI-12 (2,5 μM , 5 μM e 10 μM) demonstraram danos nucleares para os parâmetros avaliados, com valores significativamente superiores ao controle negativo e, na maioria dos casos, até mesmo superiores ao controle positivo de cisplatina, amplamente utilizado como medicamento.

Os danos genotóxicos observados em todos os parâmetros avaliados corroboram os resultados previamente indicados pelo ensaio de *docking* molecular, evidenciando a forte interação do DRI-12 com o DNA celular. A relação dose-dependente observada sugere que o efeito do metalocomplexo pode ser ajustado de acordo com a dose administrada, permitindo um controle e uma potencial modulação da sua atividade terapêutica. Contudo, os achados também ressaltam a necessidade de desenvolver ou considerar estratégias para minimizar os efeitos em células não tumorais, devido à alta atividade genotóxica demonstrada pelo composto.

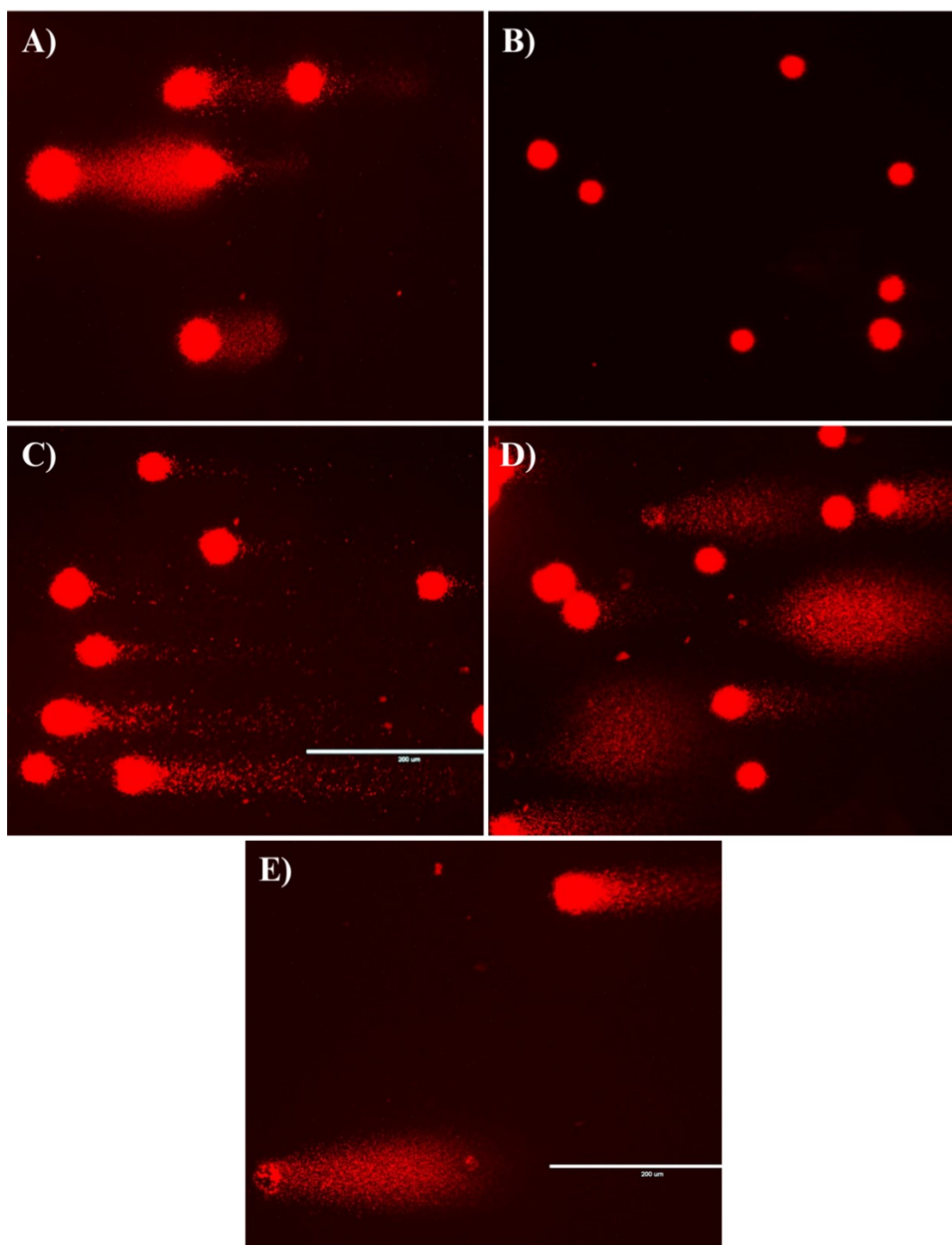


Figura 6. Imagens fotomicrográficas obtidas com microscópio de fluorescência invertido Evos (*Thermo Fisher Scientific®*) representativas do ensaio Cometa realizado para medir o dano ao DNA em células PC-3 tratadas com: A – Cisplatina 200 μM (controle positivo); B – não tratadas (controle negativo); C – 2,5 μM de DRI-12 ($\text{IC}_{50}/2$); D – 5,0 μM de DRI-12 (IC_{50}); e E – 10,0 μM de DRI-12 ($2\times\text{IC}_{50}$). (Fonte: autoria própria)

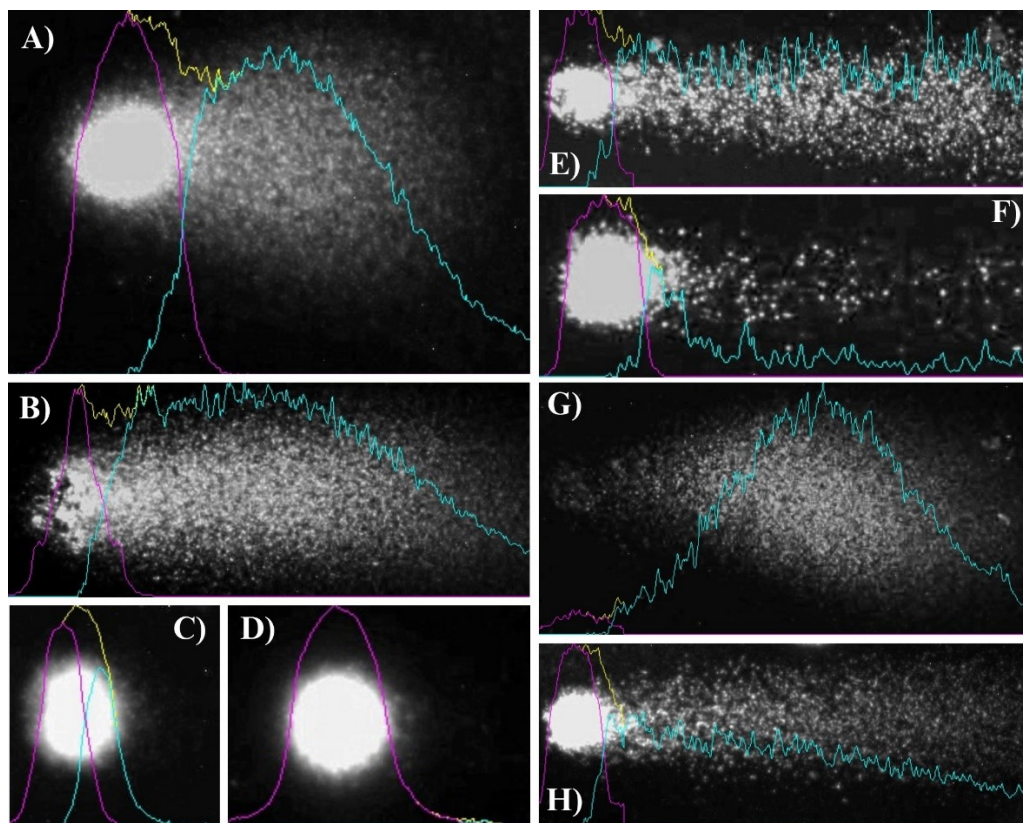


Figura 7. Representação de alguns cometas obtidos neste estudo após análise de imagem com o *software Comet Score*, ilustrando o gráfico de fluorescência referente aos tratamentos: A) – controle positivo; B) – [10,0 μM] de DRI-12; C) e D) – controle negativo; E), F) e H) – [2,5 μM] de DRI-12; G) – [5,0 μM] de DRI-12. (Fonte: autoria própria)

No contexto da classificação visual, Møller et al. (2023) aprimorou o sistema de cinco níveis de dano já descrito na literatura, fornecendo uma descrição detalhada das características que distinguem cada classe (Figura 8), visando orientar e otimizar o processo de classificação dos cometas nas diferentes categorias. A discriminação dos cometas em diferentes classes é feita conforme descrito a seguir:

- Classe 0: Não há migração, apresentando um cometa arredondado e simétrico. É importante observar a ausência de assimetria, ou seja, a borda da cabeça não se mostra irregular na direção de migração do DNA;

- Classe 1: Há migração parcial, resultando em um cometa assimétrico. A classificação confiável é definida quando a cauda se moveu até metade da distância total do cometa;
- Classe 2: Migração clara, com a cauda se movendo até a distância máxima permitida pelas condições de eletroforese (tempo e voltagem);
- Classe 3: Além da migração até a distância máxima, ocorre um alargamento da cauda em direção perpendicular à eletroforese;
- Classe 4: Apresenta migração máxima e alargamento perpendicular da cauda, com a cabeça do cometa frequentemente reduzida em tamanho e menor intensidade fluorescente, enquanto a maior parte do DNA permanece na cauda.

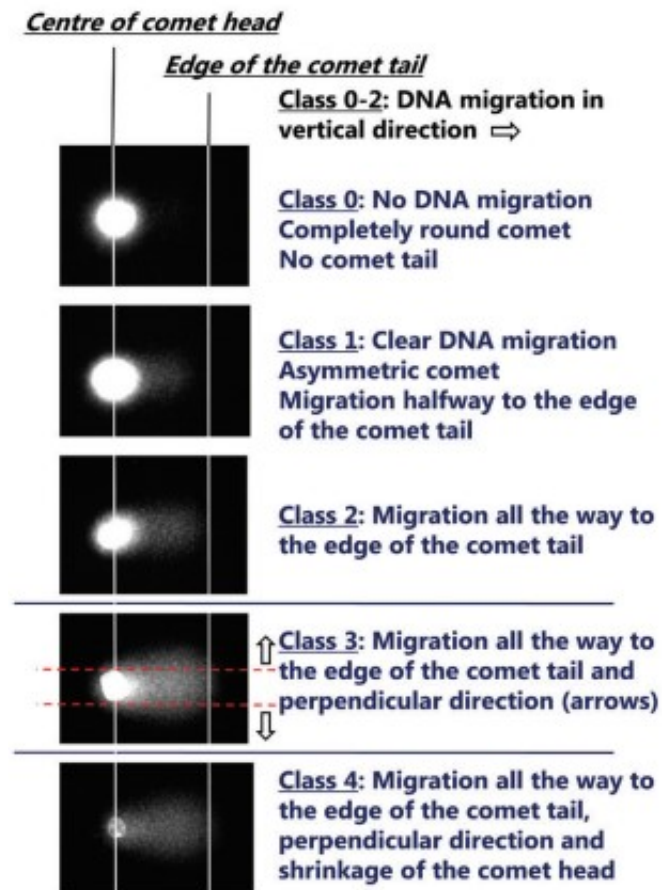


Figura 8. Descrição das classes de cometas no sistema de cinco classes segundo Møller et al. (2023).

Dessa forma, a classificação visual do Ensaio Cometa no presente estudo está representada na Figura 9 e na Tabela 3. Ao sistema de cinco classes anteriormente apresentado (0 – 4), foi acrescentada a classe (*score*) 5, que corresponde a um nível de dano diferenciado, descrito na literatura como cometas "ouriços" (*hedgehogs*), "nuvens" (*clouds*) ou "células fantasma" (*ghost cells*). Esses cometas são caracterizados por uma cabeça (núcleo) muito pequena ou ausente, acompanhada por uma cauda extensa e brilhante, resultado de altos níveis de dano ao DNA (Kumaravel et al., 2009; Møller et al., 2023). A inclusão dessa nova classe é fundamental, pois oferece um parâmetro adicional para avaliar danos mais severos que poderiam ser subestimados pelo sistema tradicional. Cometas "ouriços", por exemplo, indicam fragmentação extrema do DNA, frequentemente associada a mecanismos de morte celular, como apoptose ou necrose. Portanto, a classificação visual em seis categorias (0 – 5) permite uma análise mais abrangente do efeito do DRI-12, correlacionando a intensidade do dano genotóxico às diferentes concentrações testadas e possibilitando comparações mais precisas com dados obtidos em análises quantitativas.

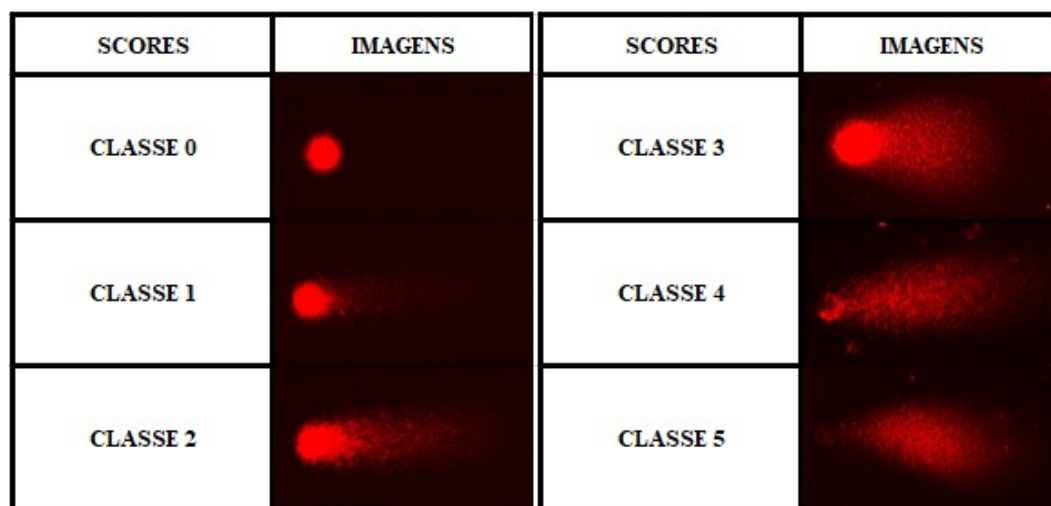


Figura 9. Representação visual da classificação em Scores (0 – 5) para o ensaio cometa com DRI-12 na linhagem de células PC-3. (Fonte: autoria própria)

Tabela 3. Quantificação dos scores para cada concentração testada no ensaio cometa com o DRI-12 na linhagem de células PC-3. Em que: N – não tratadas (controle negativo); P – Cisplatina 200 μ M (controle positivo); [2,5] – concentração de DRI-12 em μ M equivalente ao $IC_{50}/2$; [5,0] – concentração de DRI-12 em μ M equivalente ao IC_{50} ; e [10,0] – concentração de DRI-12 em μ M equivalente a $2x IC_{50}$. (Fonte: autoria própria)

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	TOTAL
Positivo	0	65	16	17	3	1	102
Negativo	77	24	0	0	0	0	101
2,5 μ M	8	35	26	13	10	11	103
5 μ M	13	18	26	12	19	14	102
10 μ M	8	19	14	8	18	33	100

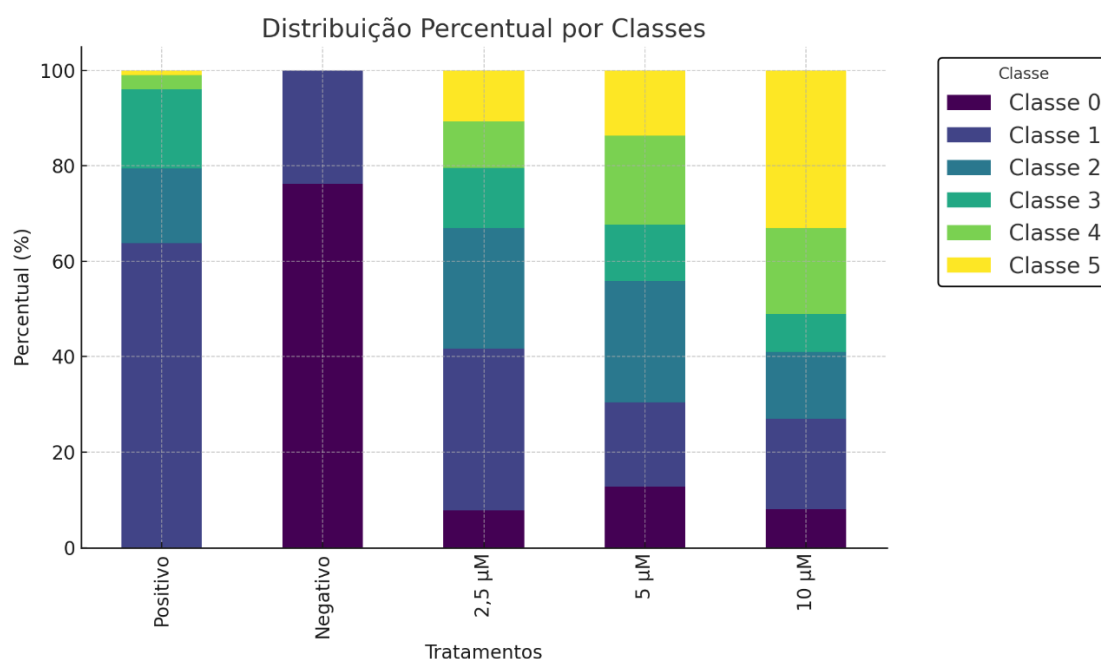


Figura 10. Distribuição percentual (%) das classes (*scores*) 0 a 5 para os diferentes tratamentos do ensaio Cometa. Os valores percentuais foram calculados com base no total de cada tratamento, evidenciando a proporção relativa de cada classe em cada tratamento. (Fonte: autoria própria)

Examinando os resultados obtidos com a análise e a classificação visual, foi possível constatar que o controle negativo apresentou predominância de células na classe 0. O que indica ausência ou mínima migração do DNA e confirma a integridade das células não tratadas, servindo como uma referência crucial para avaliar o impacto dos tratamentos. Em contraste, o controle positivo, tratado com cisplatina, exibiu cometas majoritariamente nas classes 3 e 4, demonstrando um elevado dano genotóxico, conforme esperado para um agente que causa quebras significativas no DNA.

Da mesma forma, as concentrações de 2,5 μM , 5 μM e 10 μM de DRI-12 evidenciaram uma distribuição progressiva do dano ao DNA. O tratamento com 2,5 μM apresentou um aumento moderado de cometas nas classes 1, 2 e 3, sugerindo danos detectáveis e significativos, porém menos severos. O aumento para 5 μM resultou em uma distribuição mais acentuada para classes intermediárias e avançadas, indicando um efeito dose-dependente na indução de lesões genômicas. Por fim, a concentração de 10 μM mostrou uma quantidade significativa de cometas nas classes 4 e 5, com destaque para os cometas "ouriços", representando danos extremamente extensos ao DNA.

Portanto, a classificação visual do ensaio Cometa apresentou excelente correlação com o método de análise de imagem utilizado neste trabalho, e a inclusão da sexta classe contribuiu para uma descrição mais precisa dos níveis extremos de dano. Além disso, ao analisar os resultados percentuais, foi possível identificar padrões claros, como o efeito dose-resposta do DRI-12 em comparação aos controles. O uso dessa abordagem visual, em conjunto com a análise de imagem conduzida com o apoio do *software Comet Score*, mostrou-se fundamental para compreender a extensão do dano genotóxico em diferentes condições experimentais, contribuindo para a caracterização detalhada dos efeitos induzidos.

Neste contexto, um estudo realizado por Machado (2019) com células de mioblasto murino (C2C12) utilizou a formação de micronúcleos como indicador genotóxico em concentrações de DRI-12 variando de 0,1 μM a 2 μM , revelando uma alta frequência de micronúcleos na concentração mais elevada (2 μM), o que refletiu quebras significativas no DNA. Ademais, testes de degradação de DNA realizados por eletroforese em gel com células de sarcoma (180), nas concentrações de 1 μM , 4 μM e 20 μM do composto, demonstraram que o DRI-12, na concentração de 20 μM , causou degradação significativa do DNA genômico em comparação com a cisplatina, utilizada como controle positivo. Esses achados corroboram os resultados do presente estudo e se complementam na caracterização da extensão dos danos ao DNA, evidenciando um efeito dose-dependente e destacando a complexidade e a multifacetada natureza do dano genotóxico induzido pelo complexo metálico de Cobre (II), DRI-12.

Além disso, no estudo de Serment-Guerrero et al. (2011), o ensaio Cometa foi utilizado para avaliar a capacidade genotóxica das metalomoléculas denominadas Casiopeínas em células humanas, incluindo linhagens de células HeLa (câncer cervical) e linfócitos de doadores saudáveis, tratadas com diferentes concentrações (CasII-gly, CasIII-Ea, CasIII-Ha e CasIII-ia). Os resultados mostraram que todas as Casiopeínas testadas induziram danos expressivos ao DNA e que as linhagens de células HeLa (células tumorais) mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com Casiopeínas do que os linfócitos, o que sugere que células tumorais podem ser mais suscetíveis a danos causados por esses compostos. Este estudo, portanto, reforça a relevância e a aplicabilidade dos resultados encontrados com o DRI-12, mostrando que as propriedades genotóxicas observadas em complexos de cobre podem e devem ser exploradas para desenvolver novas abordagens terapêuticas com potencial antitumoral significativo.

Assim, outros diversos complexos metálicos à base de cobre têm sido investigados por suas propriedades antitumorais e possível maior eficácia em comparação com os

metalofármacos comumente empregados na quimioterapia. Como foi observado em dois compostos de Cobre (II) pertencentes à família das Casiopeínas® que já avançaram para a fase inicial de estudos clínicos, o que evidencia a relevância da continuação das pesquisas de novos compostos metálicos de cobre (II) (Paixão et al., 2017), como o DRI-12.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo destacaram o DRI-12, um metalocomplexo de cobre (II), como um potencial agente antitumoral contra o câncer de próstata, evidenciado por sua elevada atividade citotóxica *in vitro*. O composto apresentou valores de IC₅₀ de 5,414 µM para células não tumorais (PNT-2) e 4,543 µM para células tumorais (PC-3), demonstrando uma capacidade significativa de inibir a viabilidade celular mesmo em concentrações reduzidas. Esses dados sugerem uma forte interação do DRI-12 com células tumorais, possivelmente bloqueando vias biológicas essenciais para sua sobrevivência, conforme reforçado pela análise de docking molecular, que indicou afinidade de ligação com alvos moleculares relevantes para o crescimento tumoral.

Os resultados do ensaio de genotoxicidade confirmaram que o DRI-12 induz danos ao DNA de maneira dose-dependente, evidenciado pelo aumento significativo do momento da cauda (*tail moment*) no ensaio Cometa. Esse comportamento sugere uma potencial clivagem de DNA, similar ao observado em outros complexos de cobre com propriedades antitumorais. Embora essa capacidade de causar danos genéticos contribua para seu efeito citotóxico, o índice de seletividade (IS) de 1,19 indica que o DRI-12 ainda requer melhorias para diferenciar com mais precisão entre células tumorais e não tumorais, e aprimorar seu perfil terapêutico.

Para otimizar a eficácia terapêutica e reduzir os impactos em células saudáveis, estratégias como modificações estruturais e a entrega direcionada devem ser consideradas. A comparação com outras classes de complexos metálicos de cobre, como as Casiopeínas,

evidencia que o DRI-12 compartilha um mecanismo de ação baseado na interação com o DNA e geração de genotoxicidade, com um perfil que pode ser aprimorado para aplicações mais seguras e seletivas. Assim, o DRI-12 apresenta-se como uma promissora alternativa terapêutica e um forte candidato a protótipo de fármaco quimioterápico, alinhando-se à busca por tratamentos menos invasivos e mais eficazes para o câncer de próstata.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, L. H. et al. *Synthesis, theoretical investigations, biocidal screening, DNA binding, in vitro cytotoxicity and molecular docking of novel Cu (II), Pd (II) and Ag (I) complexes of chlorobenzylidene Schiff base: Promising antibiotic and anticancer agent. Applied Organometallic Chemistry*, v. 32, n.12, p. 1-21, 2018. <https://doi.org/10.1002/aoc.4527>

ALVES, Erica Assis; TAVARES, Gabriel Guimarães; BORGES, Leonardo Luiz. Importância Da Atenção Farmacêutica Para a Quimioterapia Antitumoral. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, vol. 6, no 15, página 9, 2020. <https://doi.org/10.36414/rbmc.v6i15.35>.

ARRUDA, A.S., et al. *In vitro cytotoxic and genotoxic analysis of Garcinia humilis crude extract. Bioscience Journal*. 2022. <https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-59901>

BACELAR JÚNIOR, Arilton Januário et al. Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**. V. 10, n. 3, página 40-46. Minas Gerais, 2015.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO L. M.; GOODMAN, C. B. *Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. Anticancer Research*, v. 29, n. 8, p. 2993,2996, 2009.

BÉNÉRE, E.; da LUZ, R. A., I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. *A new quantitative in vitro microculture method for Giardia duodenalis trophozoites. Journal of Microbiological Methods*, v. 71, n.2, p.101-106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.014>

BONTEMPO, N. J. S.; PAIXÃO, D. A.; LIMA, P. M. A. P.; BARROS, D. C. T.; BORGES, D. S.; ORSOLIN, P. C.; MARTINS, I. C.; MACHADO, P. H. A.; LINO, R. C.; SOUZA, T. R.; RAMOS, L. M. S.; TEIXEIRA, S. C.; SIQUEIRA, R. P.; GOULART FILHO, L. R.; GUERRA, W.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J.; ARAÚJO, T. G. Copper(II) Complex Containing 4-Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide and 1,10-Phenanthroline: A Prostate Cancer Cell-Selective and Low-Toxic Copper(II) Compound. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 27, n. 20, p. 7097, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27207097>

COLLINS, A. R. et al. *The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells*. *Mutation Research*, v. 336, n. 1, p. 69–77, 1995. [https://doi:10.1016/0921-8777\(94\)00043-6](https://doi:10.1016/0921-8777(94)00043-6)

CROSS, E. D. et al. *Synthesis, characterization, cytotoxicity and antimicrobial activity of copper complexes of N-imine pendant derivatives of 2-(methylthio)aniline*. *Inorganica Chimica Acta*, v. 481, p. 69–78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.09.027>.

DAMIÃO, Ronaldo et al. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. V. 14, página 83. Rio de Janeiro, 2015.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. *The comet assay: a comprehensive review*. *Mutation Research*, n. 339, p. 37-59, 1995. [https://doi:10.1016/0165-1110\(94\)00013-3](https://doi:10.1016/0165-1110(94)00013-3)

IARC. *Cancer Tomorrow*. **World Health Organization**, 2023. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Acesso em 11 de novembro de 2024.

INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Página 57. Rio de Janeiro, 2019a.

INCA. Câncer de próstata: Conheça o que aumenta o risco, como é feito o diagnóstico, o tratamento e as estratégias para detecção precoce do câncer de próstata. **Gov.Br, Ministério da Saúde**, 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata>. Acesso em 13 de novembro de 2024.

INCA. Câncer de próstata: vamos falar sobre isso?. **Instituto Nacional de Câncer**. 3ª reimpressão, página 5. Rio de Janeiro, 2019b.

INCA. Como se comportam as células cancerosas?: Saiba como é o processo de formação dos tumores. **Gov.Br, Ministério da Saúde**, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/como-se-comportam-as-celulas-cancerosas>. Acesso em 8 de novembro de 2024.

INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro, 2022b. Página 29.

INCA. O que é câncer?: É o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. **Gov.Br, Ministério da Saúde**, 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em 3 de novembro de 2024.

INCA. Quimioterapia: Tratamento em que se utilizam medicamentos que se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo. **Gov.Br, Ministério da Saúde**, 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia>. Acesso em 7 de novembro de 2024.

IUCHNO, Clarissa Weiss; DE CARVALHO, Gisele Pereira. Toxicidade e efeitos adversos decorrente do tratamento quimioterápico antineoplásico em pacientes pediátricos:

revisão integrativa. **Ciência & Saúde**, v. 12, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.15448/1983-652X.2019.1.30329>.

KRISHAN, A. *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*. **The journal of cell biology**, v. 66, p. 188-193, 1975. <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; et al. *Comet Assay measurements: a perspective*. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 53–64, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>.

MACHADO, Pedro Henrique Alves. **Avaliação in vitro das atividades citotóxicas e genotóxicas de um metalocomplexo à base de cobre (II) denominado Dri-12**. 2019. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2093>

MØLLER, Peter; AZQUETA, Amaya; SANZ-SERRANO, Julen; BAKURADZE, Tamara; RICHLING, Elke; BANKOGLU, Ezgi Eyluel; STOPPER, Helga; BASTOS, Victoria Claudino; LANGIE, Sabine A. S.; JENSEN, Annie; SCAVONE, Francesca; GIOVANNELLI, Lisa; WOJEWÓDZKA, Maria; KRUSZEWSKI, Marcin; VALDIGLESIAS, Vanessa; LAFFON, Blanca; COSTA, Carla; COSTA, Solange; TEIXEIRA, João Paulo; MARINO, Mirko; DEL BO, Cristian; RISO, Patrizia; ZHENG, Congying; SHAPOSHNIKOV, Sergey; COLLINS, Andrew. *Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results*. **Mutagenesis**, v. 38, n. 5, p. 253–263, 2023. <https://doi.org/10.1093/mutage/gead015>.

MORAES, Rafaela dos Santos; REY, Nicolás Adrián. Complexos homo e heterobinucleares de ligantes derivados da isoniazida como potenciais agentes antitumorais.

Tese (Doutorado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro,
Departamento de Química, Rio de Janeiro, 2016.

NARDONE, R. M. *Toxicity testing in vitro. Growth, nutrition, and metabolism of cells culture*, v.3, p. 417-495, 1977. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-598303-7.50017-5>

NDAGI U.; MHLONGO N.; SOLIMAN ME. *Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. Drug design, development and therapy.* África do Sul, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>.

OPAS. **Folha informativa: Câncer.** OMS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em 17 de novembro de 2024.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, p. 291-298, 1984. [https://doi:10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X)

PAIXÃO, D. A. et al. *Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 172, n. Ii, p. 138–146, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PINZI, L.; RASTELLI, G. *Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. International journal of molecular sciences*, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>

PRADO, Bernardete Bisi Franklin do. *Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. Ciência e Cultura*, vol. 66, no 1, p. 21–24, 2014. <https://doi.org/10.21800/s0009-67252014000100011>.

PRAVIN, N. et al. *Water-soluble Schiff base Cu(II) and Zn(II) complexes: Synthesis, DNA targeting ability and chemotherapeutic potential of Cu(II) complex for hepatocellular carcinoma – in vitro and in vivo approach. **Applied Organometallic Chemistry***, v. 31, n. 10, p. 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1002/aoc.3739>.

PRIHANTONO, Muhammad Faruk. *Breast cancer resistance to chemotherapy: When should we suspect it and how can we prevent it? **Annals of Medicine and Surgery***, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102793>.

RISS, T.L., et al. *Cell viability assays. **Assay Guidance Manual***, 2016.

RUIZ-AZUARA, L.; BRAVO-GÓMEZ, M. E. *Copper compounds in cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry***, v. 17, p. 3606-3615, 2010. <https://doi.org/10.2174/092986710793213751>.

SALMASO, V.; MORO, S. *Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in pharmacology***, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>

SAWADA, Namie Okino et al. *Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP***, São Paulo, v. 43, 2009. Página 581-587. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342009000300012>

SCHINDLER, K.; CORTAT, Y.; NEDYALKOVA, M.; CROCHET, A.; LATTUADA, M.; PAVIC, A.; ZOBI, F. *Antimicrobial Activity of Rhenium Di- and Tricarbonyl Diimine Complexes: Insights on Membrane-Bound S. aureus Protein Binding. **Pharmaceuticals***, 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15091107>

SERMENT-GUERRERO, J.; CANO-SANCHEZ, P.; REYES-PEREZ, E.; VELAZQUEZ-GARCIA, F.; BRAVO-GOMEZ, M. E.; RUIZ-AZUARA, L. *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®. Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 1376-1384, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>

SILVA, A. G.; AZEVEDO, C.; DA MATA, L. R. F.; VASQUES, C. I. Adesão De Pacientes Ao Tratamento Com Antineoplásicos Orais: Fatores Influentes. **Revista Baiana De Enfermagem**, [S. L.], V. 31, N. 1, Bahia, 2017. Página 2. <https://doi.org/10.18471/rbe.v31i1.16428>.

STEFANI, G. P., et al. Quantificação de dano em DNA em diferentes tecidos em ratos com insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2020. <https://doi.org/10.36660/abc.20180198>

TARZIA, A.; JELFS, K. E. *Unlocking the computational design of metal-organic cages. Chemical communications, England*, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2cc00532h>

TAVARES, Isabella Morais; BOTELHO, Bruno Henrique Lopes Lourenço; DONADEL, Guilherme; COLLA, Itaruã Marchi; BELETTINI, Salviano Tramontin; LOURENÇO, Emerson Luiz Botelho; VELASQUEZ, Leonardo Garcia. Efeitos da Curcuma longa em animais sadios submetidos a quimioterapia. **Brazilian Journal of Development**, vol. 5, no 12, p. 30697–30719, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n12-183>.

WILSON, T. R.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. *Chemoresistance in solid tumours. Annals of oncology: Official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2006. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl280>.