



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Atividade biológica *in vitro* e *in silico* de complexos de metais de
transição puros e nanoformulados**

Aluno: Ricardo Campos Lino

Orientador: Robson José de Oliveira Júnior

UBERLÂNDIA - MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Atividade biológica *in vitro* e *in silico* de complexos de metais de
transição puros e nanoformulados**

Aluno: Ricardo Campos Lino

Orientador: Robson José de Oliveira Júnior

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).**

UBERLÂNDIA - MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L758 2022	Lino, Ricardo Campos, 1978- Atividade biológica in vitro e in silico de complexos de metais de transição puros e nanoformulados [recurso eletrônico] / Ricardo Campos Lino. - 2022. Orientador: Robson José de Oliveira Júnior. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.231 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Genética. I. Oliveira Júnior, Robson José de ,1984- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título. CDU: 575
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: NLC, *Docking* molecular, autofagia,
clivagem de DNA, antitumoral, metais de transição, cobre.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta de maio de dois mil e vinte e dois.	Hora de início:	14:05h	Hora de encerramento:	14:35h
Matrícula do Discente:	11922GBI010				
Nome do Discente:	Ricardo Campos Lino				
Título do Trabalho:	Atividade biológica <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de complexos de metais de transição puros e nanoformulados.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização da atividade citotóxica e/ou genotóxica e antitumoral de moléculas biotivas naturais e sintéticas.				

Aos trinta dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois, às 14:05 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Robson José de Oliveira Júnior (Orientador), Alcione Silva Arruda e Sandra Morelli. A participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Oliveira Junior, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4001295&infra_siste... 1/2



fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Morelli, Membro de Comissão**, em 30/05/2022, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alcione da Silva Arruda, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3563154** e o código CRC **143E9141**.

Dedico este trabalho a minha família, mãe, pai, irmã, filha e minha amada esposa, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando, e àqueles que nunca desistem frente aos percalços do acaso.

*“Nas garras ardis das circunstâncias,
Não titubeei nem sequer chorei.
Sob os golpes do infortúnio,
Minha cabeça sangra ainda erguida.
Não importa quão estreita a passagem,
Ou quantas punições ainda sofrerei.
Sou o senhor do meu destino
E o condutor de minha alma.”*

Trecho do poema *Invictus*, Willian Ernest Henley.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio financeiro da UFU, CAPES, CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/FAPEMIG (APQ-00704-21 and APQ-01087-21), INCT-TERANANO, REMITRIBIC. O auxílio financeiro destas instituições e redes de pesquisa foram essenciais para a realização do trabalho.

Agradeço aos meus pais, José Roberto e Maria, que sempre foram meu alicerce e sempre me ensinaram a ser perseverante, me dando bons exemplos e me apoiando nesta caminhada.

À minha irmã, Roberta, que sempre me apoiou com palavras de incentivo e carinho, sempre acreditando e querendo meu progresso.

À minha filha, Nathalia, pois é o combustível para sempre seguir em frente em meus sonhos.

À minha esposa, Anna Paula, que é minha inspiração e meu alento, que sempre me apoiou por essa caminhada.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Aos integrantes do Laboratório de Citogenética Animal e todos que contribuíram para a realização deste trabalho, Pedro, Clara, Tiago, Ana Júlia, Lorena e Samuel, os quais sem a colaboração não seria possível concretiza-lo.

Ao meu orientador, Robson José de Oliveira Júnior, que ao me aceitar como orientando possibilitou a realização de um sonho, obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio e principalmente por acreditar que seria possível.

Aos Membros da banca examinadora, que aceitaram de prontidão ao convite para avaliar esse trabalho me transmitindo um pouco de seu conhecimento.

Agradeço a todos que de alguma forma direta ou indireta me ajudaram a estar aqui neste momento, a todas as falhas e percalços do caminho, pois me levantar e seguir em frente sempre foi motivante. E ao fim somos o resultado de todos os eventos que nos acontecem.

Resumo

O câncer é uma enfermidade que vem acometendo cada vez mais um número maior de pessoas em todo o Mundo, sendo um dos principais problemas de saúde enfrentados pelos governos na maioria dos países, ocasionando gastos que vem aumentando em muito nas últimas décadas. Os tratamentos atuais enfrentam dificuldades como resistência celular e efeitos colaterais graves por serem pouco específicos. O surgimento de nanossistemas de liberação de fármacos pode melhorar significativamente a permeabilidade dos tecidos, prolongar o tempo de circulação dos fármacos e reduzir os efeitos colaterais. A redução dos efeitos indesejados conta com o mecanismo de seletividade que algumas moléculas de metais de transição e seus ligantes apresentam. Na busca por alternativas terapêuticas que sejam mais seletivas e menos tóxicas o presente estudo apresenta uma formulação com um complexo de cobre(II), já conhecido pela sua atividade citotóxica, a base de nanocarreadores lipídicos e a sua caracterização quanto a estabilidade e sua atividade biológica. Esse complexo formulado apresentou estável, indicando uma boa associação entre o nanocarreador carreador lipídico e o complexo. E ainda atividade biológica, pois apresenta um bom Índice de Seletividade e capacidade de quebrar a fita simples e dupla de DNA, por possível interação com o sulco menor, como é apresentado pelo Docking molecular. E também exibiu a capacidade de causar disfunção na via autofágica. Com a capacidade de possuir ação antitumoral a nanoformulação NLC/CBP01 é um excelente candidato a fármaco antitumoral.

Palavras-chave: NLC, *Docking* molecular, autofagia, clivagem de DNA, antitumoral, metais de transição, cobre.

Abstract

Cancer is a disease that is increasingly affecting a greater number of peoples around the world, being one of the main health problems faced by governments in most countries, causing expenses that have increased greatly in recent decades. Current treatments face difficulties such as cellular resistance and serious side effects because they are unspecific. The emergence of drug delivery nanosystems can significantly improve tissue permeability, prolong drug circulation time and reduce side effects. The reduction of unwanted effects relies on the selectivity mechanism that some transition metal molecules and their ligands present. In the search for therapeutic alternatives that are more selective and less toxic, the present study presents a formulation with a copper(II) complex, already known for its cytotoxic activity, based on lipid nanocarriers and its characterization regarding stability and biological activity. . This formulated complex was stable, indicating a good association between the lipid carrier nanocarrier and the complex. And yet biological activity, as it has a good Selectivity Index and ability to break single and double strands of DNA, by possible interaction with the minor groove, as shown by molecular Docking. It also exhibited the ability to cause dysfunction in the autophagic pathway. With the ability to have antitumor action, the NLC/CBP01 nanoformulation is an excellent candidate for antitumor drug.

Keywords: NLC, molecular docking, autophagy, DNA cleavage, antitumor, transition metals, copper.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de casos e mortes de câncer em todo o mundo em ambos os sexos por continentes e suas regiões	5
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidente estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma	6
Figura 3 – Estrutura de nucleotídeos de DNA (1); Padrões de ligações de base definidos por Watson & Crick (2); Estrutura adaptativa do sulco maior e menor do DNA	7
Figura 4 – Representação esquemática de possíveis modos de interações complexos-DNA	8
Figura 5 – Classificação de agentes antineoplásicos	11
Figura 6 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) Dan01, (b) Dan02, (c) Dan03, (d) Dan04, (e) Dan5 e (f) Lu03	26
Figura 7 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) Lu01 e (b) Lu02	27
Figura 8 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente do R06.	28
Figura 9 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) R16, (b) R17, (c) R18, (d) R20	28
Figura 10 – Estrutura química molecular (A) e tridimensional (B) do complexo CBP01	29

Figura 11 – Interação entre Dan01 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio	37
Figura 12 – Interação entre Dan02 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	37
Figura 13 – Interação entre Dan03 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	37
Figura 14 – Interação entre Dan04 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	38
Figura 15 – Interação entre Dan05 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	38
Figura 16 – Interação entre Lu01 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio	39
Figura 17 – Interação entre Lu02 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	39
Figura 18 – Interação entre Lu03 e DNA e sua ampliação mostrando as interações.	40
Figura 19 – Interação entre R06 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	40
Figura 20 – Interação entre R16 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	41
Figura 21 – Interação entre R17 e DNA e sua ampliação mostrando as interações.	41

Figura 22 – Interação entre R18 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	42
Figura 23 – Interação entre R20 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.	42
Figura 24 – Interação entre CBP01 e DNA (A) e sua ampliação (B) mostrando as ligações de hidrogênio.	43
Figura 25 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações de NLC (A) e NLC/CBP01 (B), aumento 2000x.	46
Figura 26 – Monitoramento do tamanho de partícula (nm) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 µM, m/v), ao longo de seis meses à 25 °C	47
Figura 27 – Monitoramento do índice de polidispersão (PDI) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 µM, m/v), ao longo de seis meses à 25 °C . . .	47
Figura 28 – Monitoramento dos valores de potencial Zeta (mV) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 µM, m/v), ao longo de seis meses à 25 °. . .	48
Figura 29 – (A) Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento; (B) Dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human–hMGFP). Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose	50
Figura 30 – Imagem expositiva da presença de vacúolos autofágicos marcados com MDC nas células tumorigênicas de sarcoma 180 tratadas não tratadas (A) e tratadas com 1 µM (B), 10 µM (C) e 50 µM (D) de CBP01	52
Figura 31 – Gráfico representativo da intensidade fluorescência da marcação dos vacúolos autofágicos com MDC	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Energia de ligação das interações entre metalocomplexos e a molécula de DNA e número de ligações de hidrogênio entre as interações. 36

Tabela 2 – IC_{50} e Índice de seletividade dos compostos metálicos nas linhagens celulares 45

Tabela 3 – IC_{50} nas linhagens celulares e índice de Seletividade (IS). 48

Tabela 4 – Tabela demonstrativa de publicações recentes de complexos a base de platina e paládio com modo de ligação por intercalação 54

LISTA DE ABREVIATURAS

B16-F10 – Melanoma murino
C2C12 – Mioblasto murino
CBP01 - [Cu(BTA)(Phen)ClO₄]
CTR – Transportadores de cobre
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPI – Distância tamanho de partículas
FDA – Food and Drug Administration
FEN – Fenantrolina
IC₅₀ – Dose de 50% da viabilidade celular
ICH – Conferência internacional de harmonização de técnicas
IDH – Índice de desenvolvimento humano
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IS – Índice de seletividade
MDC – Monodansilcadaverina
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
NIH3/T3 – Fibroblasto murino
NLC – Carreadores lipídicos nanoestruturados
NLC – Nanocarreadores lipídicos
NSCLC – Câncer pulmonar de células não pequenas
OCT – Transportadores de cátions orgânicos
OMS – Organização Mundial da Saúde
PDB – Base de dados de proteínas
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SBDD – Ligações baseadas no estudo de biorreceptores
SFB – Soro fetal bovino
SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas
TG180 – Sarcoma murino
TMP – Timidina 5-monofosfato
VM-26 – Teniposida
VP-16 – Etoposida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer: história e peculiaridades	1
1.2 Epidemiologia do câncer	4
1.3 DNA: o alvo a ser alcançado	6
1.4 Terapias antitumorais	8
1.5 Metalocomplexos	12
1.5.1 Complexos de platina	14
1.5.2 Complexos de cobre.....	15
1.6 Modelagem molecular.....	17
1.6.1 <i>Docking</i> Molecular	18
1.7 Sistemas de nanotecnologias para liberação de fármacos	20
1.7.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados, as NLC's	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Metalocomplexos	26
3.1.1 Complexos de cobre.....	26
3.1.2 Complexos de níquel.....	27
3.1.3 Complexo de paládio	27
3.1.4 Complexos de platina	28
3.2 Síntese e caracterização do CBP01	29

3.3 <i>Docking</i> molecular	29
3.4 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC).....	30
3.5 Caracterização estrutural e avaliação da estabilidade físico-química.....	31
3.6 Manutenção das linhagens celulares	31
3.7 Ensaio de redução da resazurina.....	32
3.7.1 Índice de seletividade (IS)	33
3.8 Ensaio de interação e clivagem de DNA por eletroforese	33
3.9 Ensaio de autofagia.....	34
3.10 Tratamento de dados	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 <i>Docking</i> molecular	35
4.1.1 <i>Docking</i> molecular dos metalocomplexos.....	35
4.1.2 <i>Doking</i> Molecular do CBP01.....	42
4.2 Ensaio de redução da resazurina e IS dos metalocomplexos	44
4.3 Caracterização estrutural das formulações de NLC e NLC/CBP01	45
4.4 Ensaio de redução da resazurina e IS do CBP01 e NLC/CBP01.....	48
4.5 Ensaio de interação e clivagem de DNA por eletroforese	49
4.6 Ensaio de autofagia.....	51
5 DISCUSSÃO	53
5.1 <i>Doking</i> molecular	53
5.1.1 Metalocomplexos.....	53
5.1.2 <i>Doking</i> molecular do CBP01.....	55
5.2 Citotoxicidade e IS	56

5.2.1 Metalocomplexos.....	56
5.2.2 CBP01 e NLC/CBP01.....	56
5.3 Caracterização estrutural e estabilidade físico-química das formulações de NLC e NLC/CBP01	57
5.4 Ensaio de clivagem de DNA por eletroforese	59
5.5 Ensaio de autofagia.....	60
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer: história e peculiaridades

Câncer é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças que tem como característica comum sua origem, que está diretamente relacionada ao crescimento e multiplicação anormal e descontrolada das células, as quais passam a apresentar capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes (INCA, 2017).

A origem da palavra câncer vem do grego, “*Karkínos*”, significa caranguejo, e adentrou na língua portuguesa por meio da tradução para o latim, “*cancer*”. Palavra também usada para designar o símbolo no zodíaco e da constelação de mesmo nome. Era usada entre os gregos, para designar tanto o animal, caranguejo, quanto os tumores. Dizia-se que os vasos ao redor da área afetada tinham a aparência de patas de caranguejo (MUKHERJEE, 2012).

As células de um organismo vivo, em condições normais, em seus primeiros anos de vida, se dividem rapidamente para sustentar seu crescimento. Depois na fase adulta, as células normais se dividem para repor células desgastadas ou mortas, reparando danos e substituindo-as. O corpo humano tem trilhões de células, que se dividem, crescem e morrem de forma controlada e ordenada por seu DNA (ALBERTS et al., 2017).

O câncer tem sua origem no momento em que uma determinada célula, de algum órgão ou tecido, começa a se dividir de forma sucessiva e sem controle, provocando um crescimento desordenado. No entanto, as células iniciais não morrem ou são descartadas, elas continuam se dividindo, formando mais células. Acontece uma alteração em seu DNA, uma mutação genética, interferindo na programação de suas funções e causando essa alteração na divisão, de forma que a célula nunca alcance seu limite divisional (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Os agentes cancerígenos exercem efeito acumulativo e são responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. Cerca de um terço das mortes por câncer se devem aos cinco principais riscos comportamentais e alimentares: alto índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física e uso de álcool e tabaco (INCA, 2019).

A carcinogênese ou oncogênese é o processo de formação do câncer, e é dado pela exposição à agentes cancerígenos em uma dada frequência, em um dado período de tempo e pela interação entre eles (JORDE L. B. et al., 2017).

O câncer tem como causa uma variedade de fatores, e é resultado da exposição a um grande número deles. Fatores como a idade, a composição genética ou desenvolvimento de doenças que debilitem o sistema imune, não podem ser evitados. No entanto, um terço dos casos de câncer pode ser prevenido com a redução de riscos comportamentais e alimentares. Esses fatores ambientais e externos tem a capacidade de fazer alterações no DNA (OLIVEIRA et al., 2010).

As alterações acontecem em genes específicos, proto-oncogenes, que inicialmente, em células normais, são inativos. No entanto, quando ativados por agentes cancerígenos, se tornam oncogenes, que transformam células normais em células cancerosas (KONTOMANOLIS et al., 2020). O processo de formação de neoplasias, como também é chamado o câncer, é um processo lento, podendo levar anos para uma célula cancerosa inicial se dividir e crescer, até se tornar um tumor visível (ZAKIRYANOVA et al., 2018).

A célula iniciada, sofre ação de agentes cancerígenos denominados oncopromotores, se transforma de forma lenta e gradual em uma célula maligna. A exposição ao agente promotor é determinante neste estágio, cessando o contato, muitas vezes interrompe o processo da oncogênese nesta fase. Tanto alimentos como hormônios são exemplos de agentes promotores (ZAKIRYANOVA et al., 2018).

Continuando a exposição ao agente, o progresso da oncogênese se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células anômalas, até que seja visível e tenham as primeiras manifestações clínicas da doença. Fatores chamados, oncoaceleradores ou carcinógenos, promovem a iniciação e ou progressão nesta fase. O tabaco é um exemplo de agente cancerígeno que atua em todos os estágios (SINGHAVI et al., 2018).

Com a inativação do sistema de reparo do DNA, há um aumento nos níveis de mutações do material genético, afetando genes chaves que controlam vários processos como a divisão celular. Esta é controlada por diversos genes que, quando danificados e não reparados, resultam em disfunções divisionais, levando as células a se dividirem de maneira descontrolada (KASHYAP & DUBEY, 2022).

O silenciamento de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes geram um ambiente propício para o desenvolvimento das mutações no DNA. Esse comportamento se origina na mudança no perfil da expressão gênica nas células, nas mutações que influenciam o controle da expressão gênica, e nas alterações epigenéticas anormais (AHMED et al., 2016).

As células cancerosas possuem seis características principais que as distinguem das células normais:

- A proliferação descontrolada, que causa um excesso de células, que invade tecidos ou órgãos vizinhos e que gera uma necessidade nutricional, que será resolvida com a capacidade de formar novos vasos sanguíneos (QUINTERO-FABIÁN et al., 2019);
- Autossuficiência em fatores de crescimento;
- Insensibilidade aos fatores de inibidores de crescimento;
- A diferenciação em relação as células normais da qual se originou, dando origem ao tumor (PHILIP & SCHIETINGER, 2021);
- A perda de função, pois as células modificadas não são programadas para realizar as suas funções originais (PHILIP & SCHIETINGER, 2021);
- E por último, a capacidade de se desprender do tumor e se deslocar, invadindo tecidos vizinhos com possibilidade de atingir vasos sanguíneos ou linfáticos. Nos quais, poderá se deslocar para tecidos e órgãos distantes do local de origem, com maior alcance, o que define a metástase. Em outras palavras é um crescimento a distância, uma expansão independente do foco primário (WILLIAMS et al., 2019).

Os tumores podem ser benignos ou malignos. Os benignos, de tratamento mais simples, são de baixa agressividade e suas células tem características morfológicas em comum com as células as quais se originou tendo massa e delimitações bem definidas (GONG et al., 2019). Por outro lado, os tumores malignos são mais agressivos, com grande potencial mitótico e metastático. Manipulam o microambiente favorecendo o próprio desenvolvimento e induzem a angiogênese emitindo sinais pró-angiogênicos (LOW et al., 2020).

As centenas de tipos de cânceres são classificados de acordo com o tipo de célula da qual se originou. Aqueles oriundos de células epiteliais são classificados de carcinomas. E aqueles originados de tecidos conjuntivos ou células musculares

são denominados sarcomas. Ainda temos os linfomas e mielomas, que tem origem nas células do sistema imunológico, sendo o linfoma de origem no sistema linfático e o mieloma nos glóbulos brancos do sangue que produzem anticorpos, os plasmócitos. Temos também as leucemias que originam nos glóbulos brancos do sangue e medula óssea. E por fim, o câncer no sistema nervoso, cérebro e medula espinhal (SNUSTAD & SIMMONS, 2017).

Cerca de 90% dos cânceres humanos são carcinomas, pois as células epiteliais apresentam elevada taxa de proliferação celular, o que propicia mais alterações funcionais. E ainda estão mais expostas, e mais propensas a sofrerem danos físico e químicos. Por outro lado, as células diferenciadas nervosas ou musculares que não precisam se dividir constantemente, possuem menor probabilidade de originar células tumorais, sendo um local com menor incidência de câncer (DAI et al., 2019).

1.2 Epidemiologia do câncer

Com aumento de 19,3 milhões de casos em 2020, o câncer é a segunda maior causa de óbitos em todo o mundo antes dos 70 anos. Neste mesmo ano, 9.958.133 pessoas morreram vítimas da doença, excluindo o câncer de pele não melanoma, conforme pode ser visto na Figura 1.

Vale destacar que uma em cada seis mortes no mundo são relacionados a doença, dessas mortes, 70% aconteceram em países de médio e baixo índice de desenvolvimento humano (IDH). Além disso, a enfermidade é uma das principais responsáveis por manter baixa a expectativa de vida da população em muitos países. Há ainda uma certa predominância no sexo masculino em relação ao sexo feminino, tanto na taxa de mortalidade, 55,5% quanto na de incidência, 52,2% (SUNG et al., 2021).

Entre os cânceres com maior incidência estão, o de mama (11,7%), de pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). Em relação ao sexo masculino, o câncer de pulmão (14,3%) tem maior taxa de incidência, seguido por próstata (14,1%), colorretal (10,6%), estômago (7,1%) e fígado (6,3%). Já nas mulheres, o de maior taxa de incidência, é o de mama (24,5%), seguido por

colorretal (9,4%), pulmão (8,4%), colo do útero (6,5%) e tireoide (4,9%) (SUNG et al., 2021).

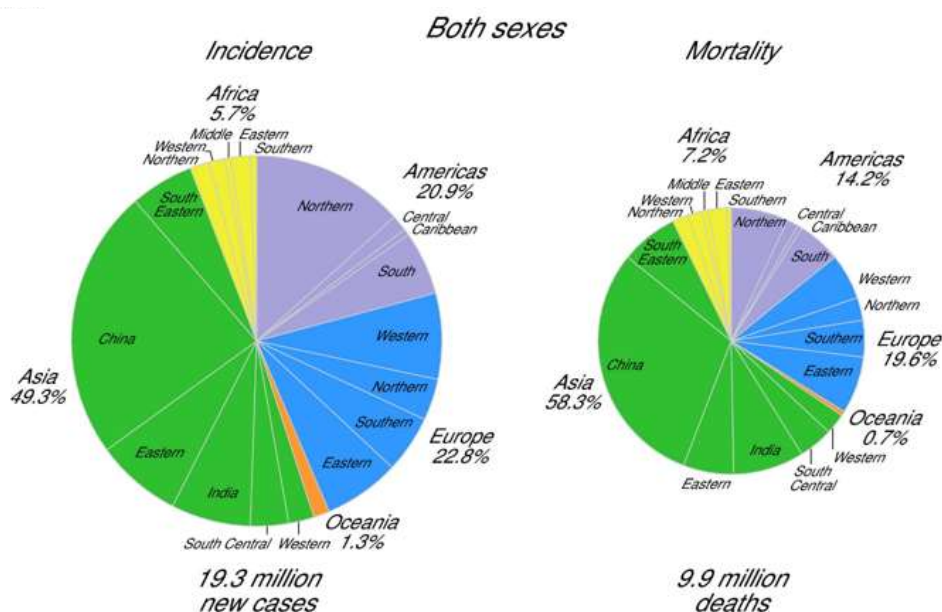


Figura 1 – Distribuição de casos e mortes de câncer em todo o mundo em ambos os sexos por continentes e suas regiões (SUNG et al., 2021).

O impacto econômico do câncer é uma realidade dura para muitos países, e teve um aumento significativo nos últimos anos. Só para ter uma dimensão, o custo anual com procedimentos terapêuticos para o câncer na população mundial no ano de 2010 foi estimado em mais de U\$ 1 trilhão, considerando gastos diretos e indiretos (STEWART & WILD, 2014).

Segundo estimativas da Sociedade Norte-Americana de Câncer, os gastos com tratamento em todo o mundo, aumentarão de US\$ 290 para US\$ 458 bilhões entre 2010 e 2030. Vale destacar que a Organização Mundial da Saúde (OMS) projeta para os próximos 20 anos um aumento de 56% nos casos da doença (SUNG et al., 2021).

No Brasil, a estimativa é de 450 mil novos casos de câncer por ano, no triênio (2020-2022), excluindo o câncer de pele não melanoma. Os cânceres de próstata e de mama serão os mais incidentes com 66 mil novos casos cada, seguidos por colorretal com 41 mil, pulmão com 30 mil e estômago com 21 mil, mostrados na Figura 2. As taxas de incidência ajustadas por idade, à exceção do câncer de pele não melanoma, tanto em homens (215,86/100 mil) quanto para mulheres

(145,00/100 mil) são consideradas intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento (INCA, 2019).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidente estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2019).

A Região Sudeste tem a maior incidência (60%), seguida pelas Regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). Existe variações na quantidade e no tipo de câncer entre as Regiões do Brasil. Predominando na Regiões Sul e Sudeste, os cânceres de próstata e mama feminina, além de pulmão e de intestino. A Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste, também apresentam incidência maior de câncer de próstata e mama feminina, no entanto, em adição a estes, incorporam o câncer do colo do útero e o de estômago. A Região Norte é a única região onde as taxas de câncer de mama e colo do útero são iguais entre as mulheres (INCA, 2019).

1.3 DNA: o alvo a ser alcançado

A partir de 1965 com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, que é um fármaco que pertence ao grupo dos metais que se ligam ao DNA, alcançou-se a cura do câncer de testículos. Promoveu-se então, uma procura por complexos metálicos com ação antitumoral. A Cisplatina e seus derivados ainda hoje são usados para tratamento de 50% de cânceres, principalmente tumores sólidos como de ovário, próstata e bexiga (FRANCO MACHADO & MORAIS, 2022).

Atingir o DNA é o objetivo principal de muitos fármacos atualmente usados em tratamentos e pesquisas clínicas (TRENNER & SARTORI, 2019). Os ácidos nucleicos são as moléculas que carregam e transmitem a informação genética na célula, modulando de acordo com suas necessidades, quais proteínas e em que

quantidade deverão ser sintetizadas. Regulam as funções celulares modulando a expressão gênica e a replicação celular, entre outras muitas funções (HOCEK, 2019).

Sua estrutura consiste em duas longas cadeias polinucleotídicas, duas fitas de DNA. Composta cada uma por um açúcar de cinco carbonos, ao qual estão ligados covalentemente, um ou dois grupos fosfato e uma base nitrogenada. As duas fitas estão unidas por ligações de hidrogênio entre as porções das bases nitrogenadas (Figura 3). Nos nucleotídeos do DNA, o açúcar é desoxirribose ligado a um único grupo fosfato e a base pode ser adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T) (ALBERTS et al., 2017).

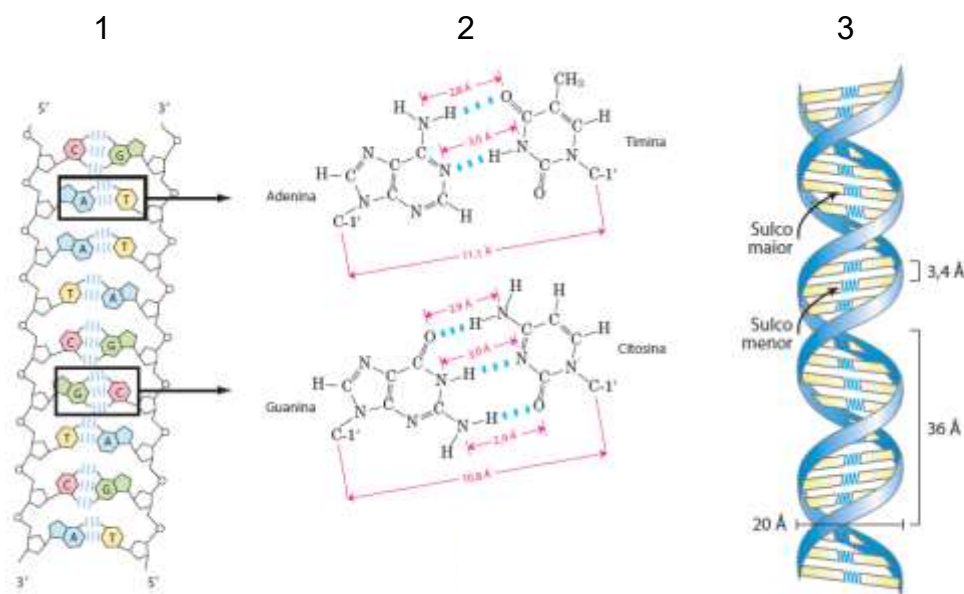


Figura 3 – Estrutura de nucleotídeos de DNA (1); Padrões de ligações de base definidos por Watson & Crick (2); Estrutura adaptativa do sulco maior e menor do DNA (NELSON et al., 2019).

Na espécie humana, assim como em outros eucariotos, o DNA no núcleo se encontra enrolado em uma espécie de matriz, as proteínas histonas. Elas têm um papel importante na regulação dos genes. Ao compactarem o DNA, permitem que os genomas dos eucariotos caibam dentro do núcleo das células, podendo sofrer modificações pós-traducionais, que desempenham um papel importante na regulação dos genes, de maneira epigenética (NELSON et al., 2019).

As proteínas reguladoras de genes devem reconhecer as sequências de nucleotídeos específicas, que estão na parte externa da dupla hélice, apresentando

um padrão distinto de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. Reconhecem também manchas hidrofóbicas diferenciando assim o sulco maior e menor para realizar suas funções reguladoras de maneira mais exata (ALBERTS et al., 2017).

Esse reconhecimento e posterior ligação, pelas proteínas reguladoras, sinalizará para iniciar ou finalizar a transcrição e a replicação. Tais processos são imprescindíveis para sobrevivência, proliferação celular e bom funcionamento bioquímico e fisiológico do organismo. Por isso a região do DNA, onde essas proteínas se ligam, são alvos de interesse para desenvolvimento de fármacos antitumorais e antibióticos (DELGADO et al., 2018).

Os nucleotídeos são covalentemente ligados entre si em uma corrente por meio dos açúcares e fosfatos, que formam assim uma "espinha dorsal". Essa estrutura possibilita uma grande quantidade de possíveis tipos de interações, como ligações direta do fármaco ao DNA por meios de suas bases nitrogenadas ou ainda pelo grupo fosfato (Figura 4). Apresenta também interações de forma não-covalente, como interações eletrostática e hidrofóbicas no sulco menor ou mesmo por meio de intercalação (BARRA & NETTO, 2015).

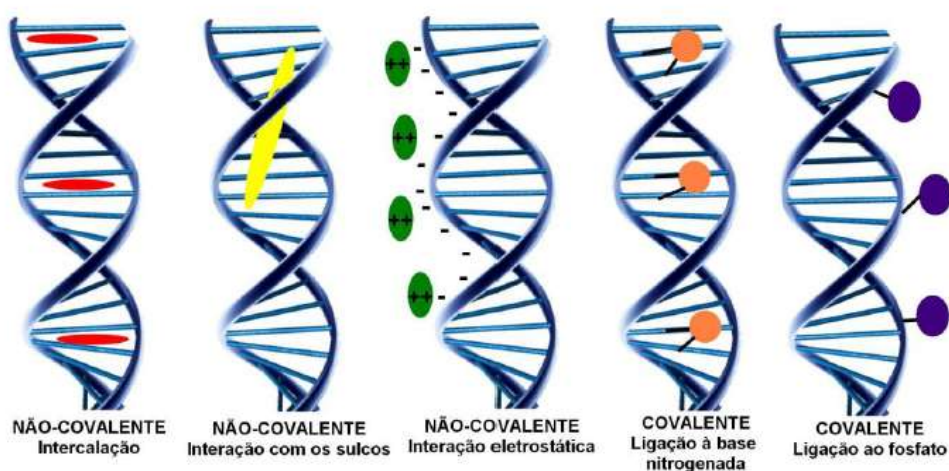


Figura 4 – Representação esquemática de possíveis modos de interações complexos-DNA (BARRA & NETTO, 2015).

1.4 Terapias antitumorais

As células tumorais apresentam um importante diferencial em relação as células normais, a proliferação acelerada. Sendo assim o ciclo celular é o alvo principal no combate a células tumorais, visando sempre a eliminação destas

células. No entanto, como as células tumorais são células com a mesma origem das células normais, estas também serão afetadas, o que desencadeia muitos efeitos colaterais (ROMA-RODRIGUES et al., 2019).

Entre inúmeros tratamentos para o câncer, cirurgia, radioterapia e quimioterapia são as mais utilizadas. Contudo, recentemente o uso de fotorradiação com derivados de hematoporfirínicos e imunoterapia também estão sendo utilizados em menor escala. Os tratamentos não são realizados de uma maneira exclusiva, de uma forma individual, mas sempre adotando várias abordagens em concomitância (KESSEL, 2019; MARTIN et al., 2020).

Um em cada três pacientes atinge a cura total do câncer, quando o tratamento inicia antes do tumor atingir a metástase. Entretanto, a maioria dos tumores quando diagnosticados já estão realizando metástase, ou ainda já desenvolveram precocemente micrometástases, fazendo-se necessário uma abordagem sistêmica, como a quimioterapia (CHIN et al., 2018).

A quimioterapia foi introduzida e documentada como tratamento do câncer entre os anos de 1946 e 1948, quando Goodman e Gilman mostraram a redução do tumor de um paciente com linfoma, ao ser tratado com uma mostarda nitrogenada, a mecloretamina (GOODMAN et al., 1946). Era a primeira droga quimioterápica usada na oncologia moderna (FALZONE et al., 2018).

A mecloretamina, assim como outras mostardas, é capaz de se ligar ao nitrogênio N7 da guanina e inibir a replicação do DNA. Destinada a pacientes com câncer de próstata e doenças malignas linfóides, como doença de Hodgkin, linfoma, reticulosarcomatose e leucemia linfática (CHAN et al., 2017).

As mostardas nitrogenadas de primeira geração caíram em desuso devido sua alta toxicidade e aos mecanismos de resistência farmacológica desenvolvidos pelas células tumorais. A mostarda nitrogenada atualmente utilizada em tratamentos oncológicos é a ciclofosfamida, capaz de interferir no ciclo celular de células ativas e quiescentes. É usada no tratamento de linfoma, mieloma múltiplo, leucemia, câncer de ovário, câncer de mama, carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC), neuroblastoma, sarcoma, bem como no tratamento de várias doenças autoimunes (OGINO & TADI, 2022; SOUZA & SILVA, 2021).

A administração de fármacos citotóxicos, que inibem o crescimento celular e promovem a morte celular, erradicando ou reduzindo o crescimento do tumor é o

objetivo da quimioterapia. Esta visa a redução dos sintomas relacionados a doença, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente (AL-BADR & ALODHAIB, 2016). Entre os agentes quimioterápicos mais usados na terapia do câncer estão, os alquilantes polifuncionais (mostarda nitrogenada, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, bussulfano e ciclofosfamida), os antimetabólitos, os antibióticos antineoplásicos e os inibidores mitóticos (SOUSA et al., 2021).

Os principais compostos alquilantes se ligam ao DNA, impedindo a separação da dupla fita, bloqueando assim a replicação. Afetam todas as fases do ciclo celular, de maneira não específica e são muito empregados em associação com agentes fase-específicos do ciclo celular, para obter um melhor resultado no tratamento (ROSENBERG et al., 1965; SOUSA et al., 2021).

A descoberta da cisplatina em 1965, foi um grande avanço para a quimioterapia moderna. Deu esperanças para pacientes com câncer testicular e mais tarde também seria usado no tratamento de outros tumores sólidos e abriu o campo para pesquisa de compostos baseados em platina e mais tarde em outros metais de transição (ROSENBERG et al., 1965).

Durante as décadas seguintes, os derivados da cisplatina e alguns novos fármacos contribuíram substancialmente como opções para a terapia antitumoral. Entre eles, o taxol, usado no câncer de mama, o irinotecano, um inibidor da topoisomerase e os antimetabólitos fludarabina e cladribina, usados em alguns linfomas (SZYMCZYK et al., 2019).

Os trabalhos atuais se norteiam em estudos sistemáticos e aprofundados a procura de moléculas que possam ser usadas como agentes antineoplásicos, levando em conta os grupos funcionais, estrutura da molécula química e seu mecanismo de ação. Dificilmente se classifica compostos quimioterápicos, pois é um grupo bem heterogêneo acerca de suas características químicas e mecanismos farmacológicos (BOROS et al., 2020; REJHOVÁ et al., 2018).

Os agentes hormonais não são citotóxicos, modulam a proliferação celular, e são classificados a parte. Sua ação depende de ligações entre o hormônio e o seu receptor citoplasmático específico, o que provoca a síntese de RNA mensageiro que, por sua vez, direciona a síntese de novas proteínas necessárias para o crescimento e a multiplicação celular. São utilizados no tratamento do câncer das glândulas mamárias e próstata. Os hormônios sexuais estimulam e controlam

a proliferação e função destes tecidos, inibindo ou estimulando o desenvolvimento do câncer por alterações apropriadas no equilíbrio hormonal (SPRATT et al., 2018).

Os agentes quimioterápicos antineoplásicos mais estudados interagem de alguma forma com o DNA, nas diferentes etapas da replicação, transcrição e tradução, que é o alvo mais almejado. O que permite uma classificação levando em consideração seus mecanismos de ação (Figura 5):

- Inibidores da síntese de Timidina 5-monofosfato (TMP), desoxiribonucleotídeos de timina: análogos das bases nitrogenadas, agentes antimetabólitos;

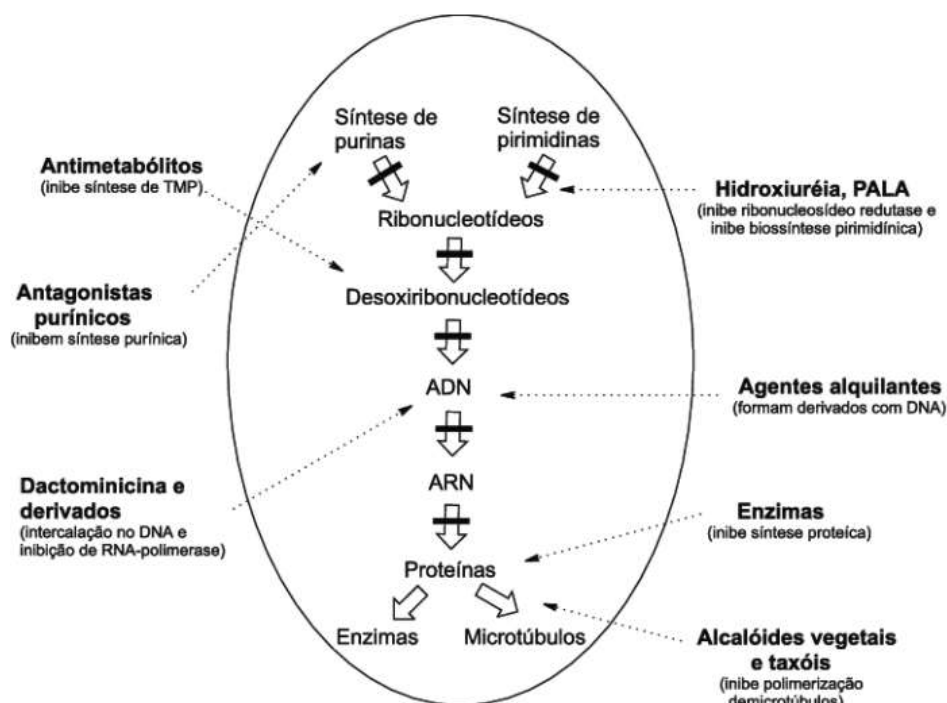


Figura 5 – Atuação de antineoplásicos no ciclo celular (CHABNER & CALABRESI, 1996).

- Inibidores da síntese de bases purínicas: antagonistas purínicos;
- Inibidores da ribonucleosídeo redutase e inibidores da biossíntese pirimidínica: hidroxiuréia, entre outros;
- Inibidores da Topoisomerase: doxorubicina.
- Intercalantes ao DNA, impedem o pareamento de bases e Inibidores da RNA polimerase: dactomicina, proflavina, amsacrina, entre outros;

- Os que exercem efeito direto no DNA formando derivados: alquilantes como as mostardas nitrogenadas, nitrosouréias, cisplatina entre outros;
- Enzimas que inibem a síntese proteica
- Ligantes que interagem no sulco menor do DNA: pentamidina e análogos;
- Inibidores da polimerização de microtúbulos: alcalóides vegetais e taxóis (CHABNER & CALABRESI, 1996).

Os alcalóides vegetais são moléculas nitrogenadas e são derivados biossintéticos dos aminoácidos:

- Alcalóides da vinca, como a vimblastina e vincristina – Inibem o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares interrompendo a divisão durante a metástase;
- Taxol, um éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), registrado como Paclitaxel® – Inibe o fuso mitótico, bloqueando a multiplicação celular, tendo como causa a dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização, perda de viabilidade celular;
- Podofilotoxinas, etoposida (VP-16) e teniposida (VM-26), derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) – Bloqueiam nas células das fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II, lesionando o DNA (ZHANG & KANAKKANTHARA, 2020).

1.5 Metalocomplexos

Metalocomplexos são compostos de coordenação em que o ácido de Lewis em sua composição, é um metal de transição. Biomoléculas com natureza negativa, como o DNA e proteínas, têm grande afinidade pelo seu centro metálico com carga positiva. Essas interagem com o DNA e causam desequilíbrio oxidativo no ambiente celular, levando ao estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PEDROSA et al., 2018; THOMPSON et al., 1999).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induz a peroxidação lipídica das membranas celulares e interrompe o potencial de membrana mitocondrial, promovendo a despolarização da membrana. Acaba por provocar

quebras na fita simples do DNA e a oxidação de resíduos de cisteína em proteínas (FARINHA et al., 2022; PEDROSA et al., 2018).

Alguns metais, como cobre, ferro e zinco, são essenciais para o organismo humano, totalizando em pelo menos dez, participam de vários processos biológicos, como a química redox, as funções enzimáticas e o transporte de oxigênio. Outros, não essenciais, podem ser usados em terapias medicamentosas ou ainda como agente de diagnóstico (NEHA DESAI et al., 2021).

Metais são amplamente usados em uma série de aplicações medicinais, apresentam um conjunto de características próprias. Como atividade redox, variação de carga e polaridade, uma gama de variações da geometria de coordenação e reatividade para substratos orgânicos por meio de suas propriedades cinéticas e termodinâmicas (FARINHA et al., 2022).

Carga neutra, baixa massa molecular, biodisponibilidade oral e estabilidade hidrolítica e termodinâmica, são algumas das características importantes que compostos devem apresentar para serem um possível candidato a fármaco. Além disso, os complexos devem ter a capacidade de atravessar membranas biológicas, o que está relacionado com sua hidrossolubilidade ou lipossolubilidade, volatilidade, massa molecular e a existência de mecanismos específicos especializados em seu transporte (KARGES et al., 2021).

Alguns íons metálicos essenciais possuem mecanismos específicos de transporte, ativo ou facilitado. No entanto, a maioria consegue atravessar por difusão passiva, o que requer baixa massa molecular, carga neutra, e uma certa resistência a hidrólise. Compostos metálicos lipofílicos atravessam de forma mais rápida que hidrofílicos, uma vez que as membranas biológicas são compostas em sua maioria por lipídeos (GALCZYNSKA et al., 2021).

A multiplicidade de características que o centro metálico pode expressar, segundo sua conformação e de seus ligantes, apresentam uma grande variedade estrutural para formação de seus compostos. Conferindo funcionalidades químicas que não são observadas em compostos que são puramente orgânicos. Apresentam ainda uma ampla variedade de interações com potenciais alvos biomoleculares (ERXLEBEN, 2018).

As moléculas orgânicas presentes nos complexos metálicos (ligantes) têm um papel primordial, pois, além de limitar os efeitos tóxicos dos metais,

potencializam suas propriedades terapêuticas. Modulam sistematicamente seu potencial redox ou a taxa de transferência de elétrons. Essas partes orgânicas possibilitam a descoberta de um fármaco que garanta maiores índices de cura, com maior especificidade biológica, e maior qualidade de vida aos pacientes, com mínimo de efeitos adversos (ANTHONY et al., 2020).

1.5.1 Complexos de platina

Em 1978 a cis-diaminodicloroplatina (II), a cisplatina, foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), e usada inicialmente para tratamentos de câncer de ovário e testículos. Estimulou-se o interesse clínico em metalofármacos, desencadeando uma série de pesquisas em torno da platina e outros metais de transição com grande potencial para serem usados como fármacos antitumorais (ANTHONY et al., 2020).

A cisplatina tem dois principais mecanismos bioquímicos de entrada celular, por difusão passiva e por transporte ativo mediado por transportadores de cobre (CTR's) e transportadores de cátions orgânicos (OCT's). Uma vez dentro da célula, onde a concentração de cloreto é menor (4 mM) que o meio extracelular (100 mM), acontece a formação de espécies hidrolisadas. Os íons cloreto serão substituídos por moléculas de água, gerando espécies aquosas carregadas positivamente que poderão reagir com sítios nucleofílicos de macromoléculas como proteínas, RNA e DNA (MAKOVEC, 2019).

A formação dos adutos com a cisplatina provoca distorções significativas na dupla hélice do DNA, causando desenovelamento e torção da sua estrutura. Ocasionalmente assim, o bloqueio da replicação e da transcrição do DNA, induzindo a morte celular por meio de indução das vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose. Resultante da produção de espécies reativas de oxigênio que culminará com a peroxidação lipídica, ativação de várias vias de transdução de sinal, indução de sinalização da proteína p53 e parada do ciclo celular (TCHOUNWOU et al., 2021).

Esses adutos podem ser, monofuncionais, onde cada átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA, ou bifuncionais, onde cada átomo de platina se liga a duas posições do DNA. Podendo ocorrer na mesma fita, entre fitas diferentes

ou entre uma fita de DNA e uma outra macromolécula como proteína ou aminoácido (TCHOUNWOU et al., 2021).

A molécula de cisplatina apresenta dois ligantes transitórios, íons cloreto, em configuração cis e é administrada aos pacientes pela via intravenosa. Estudos evidenciaram que os átomos do nitrogênio 7 das bases purínicas, guanina e adenina, localizadas no sulco maior, são os sítios preferenciais de coordenação com a platina, pois são mais acessíveis e mais nucleofílicos, comparado aos outros átomos de nitrogênio (ALDOSSARY, 2019).

A atividade antitumoral da cisplatina foi inicialmente atribuída pela inibição da síntese do DNA, onde como agente alquilante promove ligações cruzadas com o DNA. Contudo, foi elucidado que a cisplatina promove a morte das células tumorais induzindo o bloqueio do ciclo celular em G2 e por ativar mecanismos apoptóticos (GHOSH, 2019).

Com intuito de diminuir a toxicidade e a resistência, foram desenvolvidos dois novos fármacos de platina, a carboplatina e a oxaliplatina. Atualmente fármacos de platina, são usados em metade dos tratamentos de câncer em todo o mundo. No entanto, os metalocomplexos de platina apresentam também muitas das reações demonstradas por outros quimioterápicos, como resistência celular, baixa especificidade, perfil de biodistribuição insatisfatório além de nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, supressão mielóide, náuseas e vômitos (HANIF & HARTINGER, 2018).

1.5.2 Complexos de cobre

Dentre os compostos metálicos utilizados como fármacos antitumorais, os complexos que contêm metais endógenos como ferro, zinco e cobre são menos tóxicos ao organismo. O uso de cobre é de grande importância na biossíntese de cofatores enzimáticos e de grupos prostéticos de proteínas, sendo assim, essencial para processos bioquímicos. Motivo pelo qual sua homeostase é rigorosamente regulada em organismos vivos (MARTÍN GIMENÉS et al., 2021).

Nos últimos anos os complexos de cobre têm sido estudados para o tratamento de uma grande variedade de condições fisiológicas, como doença de

Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, tuberculose, câncer e também como antibióticos (MEZZARROBA et al., 2019; SENSI et al., 2018).

Após o reconhecimento do cobre como fator limitante para progressão de tumores, como seu desenvolvimento, angiogênese e metástase, seu uso na terapia antitumoral teve um crescente interesse no meio científico. Complexos de cobre têm sido investigados com vários ligantes diferentes, sendo uma forma de elucidar o mecanismo de ação e de encontrar um complexo com características que permitam uma boa efetividade frente às neoplasias com mínimo de efeitos adversos (MCGIVEM et al., 2018).

Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, sendo possível sua ação por meio da sua natureza redox, podendo interagir e reagir diretamente com moléculas de oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido e superóxido de oxigênio (KHAN et al., 2018).

Ou ainda podendo induzir clivagem direta nas moléculas de DNA e RNA, se ligando de maneira não covalente, por intercalação, por ligações eletrostáticas e podendo interagir com os sulcos desta molécula. O que contrapõe com a ação da cisplatina, que interage com o DNA por meio de ligação covalente (MACHADO et al., 2021).

Essa interação com o DNA culmina com sua clivagem, consequente bloqueio da replicação e conclui com a interrupção do ciclo celular, induzindo a morte celular por meio de apoptose. Causada pela produção de espécies reativas de oxigênio por intermédio da peroxidação lipídica (KHAN et al., 2018).

Apesar do cobre apresentar três estados de oxidação estáveis (Cu I, Cu II e Cu III) o uso de compostos de cobre II em estudos científicos predomina em relação aos outros estados de oxidação. Dois complexos de cobre (II), pertencente à família das Casiopeínas®, estão na fase de estudos clínicos pois apresentaram maior eficiência que compostos a base de cisplatina (PAIXÃO et al., 2017).

Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, as Casiopeínas® apresentam citotoxicidade comprovada contra diversas linhagens de células de câncer sensíveis e resistentes à cisplatina. Utilizam mecanismo citotóxico por ativação de processos pró-apoptóticos em células tumorais e causam a parada do ciclo celular. Esses compostos podem também interagir e clivar a

molécula de DNA, *in vitro* e *in vivo* por meio da liberação de espécies reativas do oxigênio (ALBERTO et al., 2022; PAIXÃO et al., 2017).

1.6 Modelagem molecular

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. É a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica. Visa prover uma representação tridimensional sob um dado conjunto de circunstâncias. O que reduz custos e tempo do processo de pesquisa no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que se baseia em um desenvolvimento racional e planejado de novos compostos (PINZI & RASTELLI, 2019).

A grande variedade de programas computacionais de química e de bancos de dados, cada vez maiores, ofertados em rede, são atualmente ferramentas imprescindíveis para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Permite a relação entre atividade biológica e propriedades físico-químicas da molécula de interesse. Considera também os parâmetros farmacocinéticos como, absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Além dos parâmetros toxicológicos que poderão excluir futuros candidatos a um estudo clínico (SALMASO & MORO, 2018).

A interação entre molécula bioativa e os receptores moleculares, provoca a resposta biológica e depende de um mecanismo de reconhecimento molecular que determina a seletividade dos biorreceptores. Estes apresentam grande seletividade, e seu mecanismo de reconhecimento molecular depende da estrutura química, e esta determina a atividade farmacológica de uma substância. O padrão de seletividade é a expressão do reconhecimento, à nível molecular de apenas uma substância complementar, estereoquimicamente, ao biorreceptor (GARTNER & JAYARAMAN, 2019).

Na busca pela síntese de novas moléculas, a triagem virtual de novos compostos, minimiza o número de compostos a serem testados experimentalmente. A intenção de utilizar novos derivados funcionais ou análogos sintéticos terá a colaboração da modelagem molecular de macromoléculas, em

estudos de ligantes baseados na estrutura do biorreceptor (SBDD). Lembrando que a modelagem terá o papel de auxiliar e direcionar os estudos laboratoriais (SCHAWALLER et al., 2019).

1.6.1 *Docking* Molecular

Docagem molecular, atracamento, ancoragem, acoplamento ou *docking* molecular é uma técnica computacional que busca identificar a interação mais confortável entre duas moléculas, simulando o processo de reconhecimento molecular. É uma das técnicas mais usadas da modelagem molecular, baseadas nas propriedades estruturais. Tem seu uso para estimar a afinidade de ligação ou a força de associação entre duas moléculas, para identificar as moléculas que melhor interagem com seu alvo específico (PINZI & RASTELLI, 2019).

Estudos de *docking* molecular tipo receptor-ligante (SBDD) são métodos computacionais utilizados para a identificação do mecanismo de ligação, de moléculas candidatas a fármacos, no sítio ativo de proteínas consideradas como alvos moleculares para o tratamento de determinadas doenças. Chamamos de alvos, as macromoléculas, como proteínas, DNA, RNA e alguns peptídeos, enquanto os ligantes são pequenas moléculas, como fármacos ou ainda ligantes endógenos. Podendo ocorrer também o estudo de interações entre macromoléculas (RUDRAPAL & CHETIA, 2020).

A identificação das conformações de ligação mais provável entre ligante e molécula alvo depende de duas etapas. Uma de varredura por meio de um algoritmo de busca, que investiga um certo número de conformações dos ligantes, utilizando os graus de liberdade de sua estrutura, desse modo minimizando a energia conformacional. E uma função de pontuação que classifica as soluções geradas, que avaliam a qualidade das poses, que são todas as possíveis orientações e conformações do ligante (FAN et al., 2019).

O estudo de *docking* molecular permite distinguir o modo de ligação entre ligante e receptor que seja mais promissor entre as possíveis poses. Um bom algoritmo de posicionamento fornece todos os modos de ligação possíveis, enquanto o sistema de pontuação classifica todas as soluções e identifica o modo

de ligação mais provável do ligante. Existem atualmente diferentes metodologias de busca e diferentes funções de pontuações e classificação (LU et al., 2019).

Os algoritmos de busca devem levar em conta a flexibilidade dos sistemas biomoleculares que será tratada de três formas em *docking*: A molécula alvo e ligante são considerados rígidos e somente os graus de liberdade rotacionais e translacionais do ligante são explorados; a molécula alvo é considerada rígida e o ligante flexível e todos os graus de liberdade do ligante são explorados, translacionais e rotacionais; a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível e todos os graus de liberdade são explorados (ROSELL & FERNÁNDEZ-RECIO, 2020).

A docagem rígida é o método mais simples a ser aplicado, onde o algoritmo simplesmente explora os graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante, filtrando aqueles com baixa complementariedade antes de aplicar a pontuação final. Já a docagem flexível permite mudanças conformacionais do ligante que não será mais rígido, necessitando assim de mais recursos computacionais e bases de dados. Leva-se em conta na hora de fazer a escolha a capacidade do hardware que será usado, assim como, as características do sistema a ser estudado (SAIKIA & BORDOLOI, 2019).

A busca pela melhor conformação do ligante é realizada pelos algoritmos de *docking*, sua flexibilidade pode ser explorada aplicando três formas de busca:

- Métodos sistemáticos: exploram todos os graus de liberdade do ligante durante a busca por meio de pequenas variações nos parâmetros estruturais, mudando de forma gradual a conformação do ligante, permitindo ao algoritmo investigar o cenário energético do espaço conformacional (CRAMPON et al., 2022);
- Métodos aleatórios ou estocásticos: as modificações estruturais nos ligante são realizadas de forma aleatória, de forma que o algoritmo gere um conjunto de conformações moleculares, povoando assim uma ampla gama de cenários energéticos (NIGAM et al., 2021);
- Métodos de simulação: É utilizado como técnica complementar aos outros métodos por ser limitado e insuficiente sozinho. Onde são utilizados a dinâmica molecular e a minimização de energia (TAO et al., 2020).

A classificação do sistema de pontuação deve ser capaz de avaliar e discriminar cada uma das interações propostas entre ligantes e molécula alvo. O sistema de pontuação é dividido em:

- Métodos baseados no campo de força, estimam a energia de ligação por meio da soma dos termos de ligação e dos não-ligantes em uma função mestre, descrevem por termos clássicos da mecânica molecular (EBERHARDT et al., 2021);
- Métodos empíricos e semi-empíricos, sofrem ajustes teóricos para reproduzir os dados experimentais, como energias de ligação, e trabalha com o conceito que as energias de ligação correspondem a soma dos termos não correlacionados, em uma regressão linear (DUDUKALOV et al., 2020);
- E com base no conhecimento, utilizam dados estatísticos dos potenciais de pares atômicos de interação, os quais são derivados de conjuntos de dados provenientes de complexos cristalográficos, em vez das energias de ativação, entre ligantes e moléculas alvo (KONG et al., 2019).

A modelagem molecular auxilia a proposição de novos derivados funcionais e análogos sintéticos, por meio de estudos de ligantes baseados na estrutura do biorreceptor. Essa técnica tem sido associada a descoberta de novos ligantes de alvos terapêuticos. Com a utilização da triagem virtual por docking molecular, pode-se guiar a síntese de novos complexos, diminuindo a quantidade de compostos a serem estudados, e desenvolvendo complexos mais eficientes para atingir alvos específicos. O que casa com o novo conceito de design molecular de complexos a partir de seus ligantes, constituintes de sua molécula (TARZIA & JELFS, 2022).

1.7 Sistemas de nanotecnologias para liberação de fármacos

A aplicação da nanotecnologia à medicina emprega materiais que são projetados para interagir com o corpo em escalas celulares e subcelulares, ou seja, moleculares. Pensando na máxima eficácia terapêutica, os nanomateriais possibilitam aplicações clínicas direcionadas e específicas, diminuindo assim os efeitos adversos e a resistência aos medicamentos (GRILC et al., 2021).

A nanotecnologia é um ramo da formulação, que utiliza materiais sintéticos ou naturais como carreadores e introduz drogas utilizando métodos como enxerto,

adsorção ou encapsulamento. A dupla, droga mais carreador, constitui o nanossistema de liberação de drogas. A grande maioria dos nanocarreadores não tem função aditiva, no entanto alguns especiais podem apresentar um desempenho fototérmico ou antioxidante (SHI et al., 2021).

Há uma grande diversidade de sistemas de liberação, que usam nanocarreadores como lipossomas, nanopartículas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas poliméricas e vesículas extracelulares. Os nanocarreadores permitem melhorar a biodisponibilidade de muitos compostos bioativos, possibilitando o aumento da solubilidade em soluções aquosa, melhorando assim sua absorção e distribuição tecidual. Melhoram a sua farmacocinética, e diminuem também possíveis efeitos tóxicos (LI et al., 2019; O'BRIEN et al., 2020).

Dentre as principais vantagens podemos destacar:

- Proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo;
- Liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio, como variações de pH e temperatura, diminuição da instabilidade de fármacos sensíveis;
- Possibilidade de direcionamento a alvos específicos;
- Possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas;
- Diminuição de efeitos adversos locais e sistêmicos;
- E uma maior eficiência de encapsulação quando comparadas aos sistemas convencionais (LI et al., 2019).

O tratamento bem sucedido de neoplasias depende muito da sua detecção precoce, que é dificultada pelos limites intrínsecos dos métodos já existentes de diagnóstico. A nanotecnologia fornece alta sensibilidade, especificidade e capacidade de medição e vem sendo pesquisada no contexto da detecção de biomarcadores de câncer extracelular e células cancerígenas, bem como para imagens *in vivo*. O que facilitaria o diagnóstico precoce e consequente tratamento obtendo maior êxito no combate ao câncer (ZHANG et al., 2019).

O sucesso clínico das nanopartículas depende da sua estabilidade e tempo em circulação, sua capacidade de atravessar barreiras fisiológicas e obter acesso aos locais anatômicos afetados, sua biodisponibilidade no local da doença e o seu

perfil de segurança. Algumas nanoformulações têm sido utilizadas com grande êxito na entrega de fármacos no combate de fungos, protozoários e doenças bacterianas, como a candidíase, leishmaniose e tuberculose (JIN et al., 2018).

O design de nanocarreadores no tratamento do câncer visa o direcionamento passivo, que depende de propriedades como tamanho e forma, e propriedades de superfície e rigidez mecânica. A eficácia de drogas anticancerígenas baseadas em nanomedicina tem como objetivo transpor as barreiras fisiológicas incluindo a permeabilidade de microvasos e a difusão intratumoral (GRODZINSKI et al., 2019).

O efeito de permeabilidade e retenção aprimorados é o principal mecanismo responsável pelo acúmulo de nanocarreadores na região perivascular dos tumores. Nos últimos anos tem aumentado o interesse na implantação da nanomedicina para modular a função das células imunes para melhorar as taxas de resposta à imunoterapia (GRODZINSKI et al., 2019).

1.7.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados, as NLC's

Os nanomateriais surgiram no início dos anos 80, quando cientistas suíços utilizaram o procedimento de emulsificação, entre um lipídeo e um ativo, com o emprego de agitação sob alta velocidade para mistura da fase oleosa e da fase aquosa, em alta temperatura e adicionando tensoativos. Como resultado obteve partículas contendo substâncias ativas e que inicialmente chamaram de “nanopelletes” lipídicos (FERNANDO et al., 2020).

A partir do ano de 1991, utilizando do método de produção por homogeneização em alta pressão, foi introduzido o termo, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). O grande diferencial das SLN's é a sua excelente estabilidade físico-química, que proporciona maior proteção contra a degradação de fármacos instáveis. As SLN's atingem tamanho entre 50 a 1000 nm, o que facilita serem usadas por todas as vias de administração, como a oral, parenteral e cutânea (BORGES et al., 2020).

Os métodos de produção de SLN permitem incorporar princípios ativos hidrossolúveis e lipossolúveis, em face da natureza lipídica da matriz, são melhores veículos para ativos apolares. Apresenta assim algumas limitações como, a

capacidade limitada de encapsulações, expulsão do fármaco durante a estocagem e alto conteúdo de água na dispersão (MISHRA et al., 2018).

Em 1999, surgem os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC's) com o intuito de minimizar as limitações deixadas pelas SLN's. Esses possibilitam uma maior incorporação do fármaco e mantêm o controle de liberação dessas substâncias. Os NLC's são o resultado da substituição de uma fração dos lipídios sólidos por lipídios líquidos para formar a matriz que fica incorporada ao fármaco (CHAUHAN et al., 2020).

Os NLC's apresentam excelente biocompatibilidade e propriedades de formulação superiores às SLN's. Aumentam a biodisponibilidade de drogas pouco solúveis em água. A mistura líquido-sólido gera uma estrutura mais densa e com mais imperfeições, o que acomoda o fármaco de forma mais eficiente, gerando bom resultado de encapsulação (HAIDER et al., 2020).

São três as classes estruturais de NLC's, a primeira classe é do tipo imperfeita, em que gorduras sólidas e líquidas são misturadas em várias estruturas lipídicas, levando a um processo extremamente desordenado. A estrutura da matriz lipídica imperfeita acomoda melhor o ativo farmacêutico e facilita sua entrada na matriz (TEKADE et al., 2021).

A segunda classe é do tipo sem forma, matriz não cristalina, este é um tipo de NLC que não possui estrutura cristalina e, portanto, impede a expulsão do fármaco carregado. Podendo cristais serem formados durante o resfriamento, o que pode ser evitado utilizando uma proporção correta na mistura de lipídios (CHAUHAN et al., 2020).

A terceira classe é do tipo múltiplo, semelhante às emulsões, onde a solubilidade do fármaco em lipídios líquidos será maior do que em sólidos, sendo assim ele ficará protegido durante a decomposição dos lipídeos sólidos (HAIDER et al., 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e *in silico* de metalocomplexos como possíveis drogas antitumorais para desenvolvimento de fármacos, e caracterizar os mecanismos citotóxicos e genotóxicos *in vitro* e *in silico* do metalocomplexo de Cobre(II) formulado NLC/CBP01.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar modo de ligação e interações entre metalocomplexos e a molécula de DNA utilizando *Docking* molecular;
- Avaliar modo de ligação e interações entre um complexo de Cu(II), CBP01 e a molécula de DNA utilizando *Docking* molecular;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de metalocomplexos utilizando as linhagens tumorigênicas murinas sarcoma (TG180) e melanoma (B16-F10) e suas linhagens correspondentes não tumorigênicas murinas de mioblastos (C2C12) e fibroblastos (NIH/3T3) respectivamente;
- Definir a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) e índice de seletividade (IS) *in vitro* de metalocomplexos em diferentes linhagens celulares.
- Formular a caracterizar a formulação de nanocarreadores lipídicos (NLC) do complexo de Cu(II), NLC/CBP01, quanto a sua estabilidade e atividade;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do NLC/CBP01 utilizando a linhagem, tumorigênica murina sarcoma (TG180) e sua linhagem não tumorigênica correspondente de mioblastos murino (C2C12), por intermédio dos ensaios de citotoxicidade Alamar Blue;
- Definir a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) *in vitro* do NLC/CBP01 nas duas linhagens celulares;
- Investigar a capacidade de interação e clivagem do NLC/CBP01 com o DNA plasmidial, por meio de eletroforese em gel de agarose;

- Investigar se o NLC/CBP01 tem a capacidade ativar a via autofágica, utilizando a marcação da monodansilcadaverina (MDC), por microscopia de fluorescência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metalocomplexos

Os complexos metálicos foram sintetizados e caracterizados pelo laboratório do professor Dr. Wendel Guerra do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foram disponibilizados metalocomplexos com centros de cobre, níquel, paládio e platina.

3.1.1 Complexos de cobre

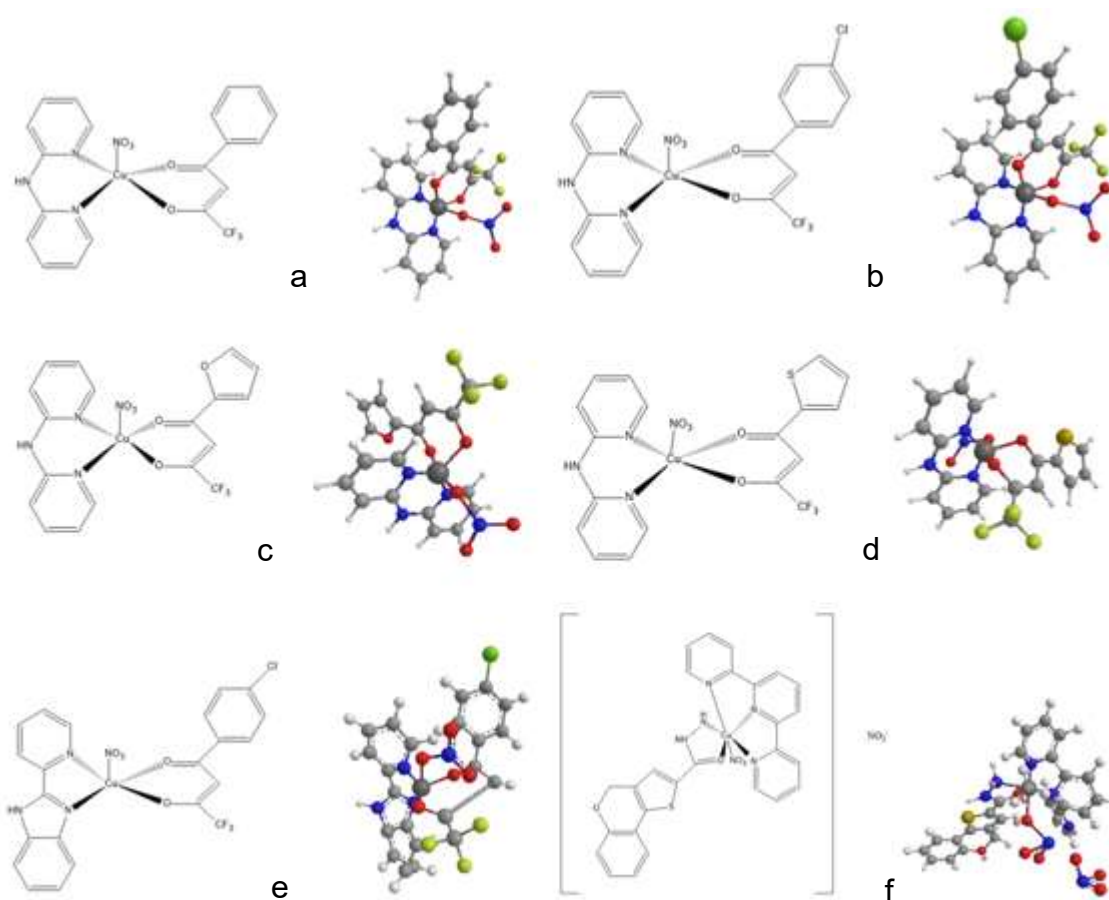


Figura 6 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) Dan01, (b) Dan02, (c) Dan03, (d) Dan04, (e) Dan05 e (f) Lu03.

Os metalocomplexos Dan01, Dan02, Dan03, Dan04 e Dan05 (Figura 6), todos de cobre(II), foram obtidos por meio da reação entre 0,125 mmol de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e o 0,125 mmol do ligante β -dicetona. Onde ambos os reagentes

foram solubilizados em 3,0 mL de metanol e a solução formada ficou sob agitação constante por 24 horas. Foram adicionados após esse período 0,125 mmol do ligante N,N-doador previamente solubilizados em 2,0 mL de metanol. A reação prosseguiu por mais 24 horas e a solução foi colocada em repouso para cristalização.

O metalocomplexo Lu03 de cobre(II), foi obtido em uma reação onde 0,5 mmol do ligante bth foi adicionada em 0,5 mmol de nitrato de cobre(II) formando um precipitado verde claro. Após 24 horas em agitação, uma solução metanólica 0,5 mmol do ligante N,N-doador foi adicionada lentamente ao balão da reação. Após 48 horas de agitação, um precipitado verde formado foi filtrado, lavado com metanol e éter e seco sob pressão reduzida.

3.1.2 Complexos de níquel

Os complexos Lu01 e Lu02 (Figura 7), ambos de Níquel(II), foram obtidos em uma reação entre 0,5 mmol do ligante β -dicetona e 0,5 mmol do sal $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ previamente solubilizado em 2 mL de acetonitrila. A reação ficou em agitação durante 30 minutos quando foi adicionado, gota a gota, 0,5 mmol de fenantrolina (FEN) previamente dissolvida em 1 mL de acetonitrila. A mistura resultante foi agitada por 24 horas quando o produto final foi removido por filtração, lavado com acetonitrila e seco sob pressão reduzida.

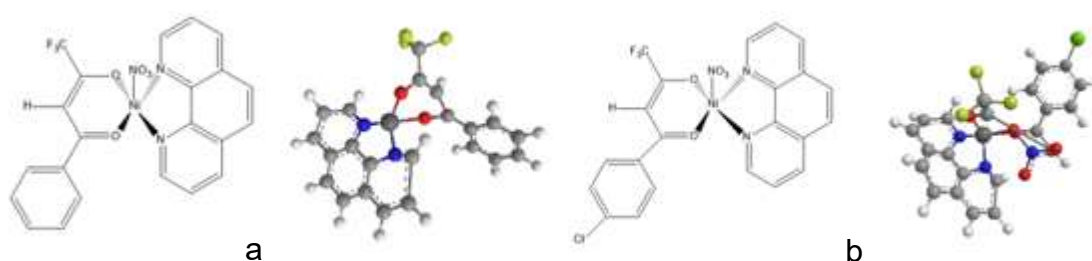


Figura 7 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) Lu01 e (b) Lu02.

3.1.3 Complexo de paládio

O complexo R06 (Figura 8), de paládio(II), foi obtido em uma reação equimolar entre *trans*- $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e galato de metila que foram dissolvidos em 5

mL de hidróxido de metanol, que foi adicionado gota a gota. Após diluir, foram adicionadas algumas gotas de trietilamina para desprotonar o ligante. A mistura foi mantida sob refluxo de 60 a 70°C e agitada constantemente por 48 horas. O produto final foi removido por filtração, lavado com metanol e seco sob pressão.

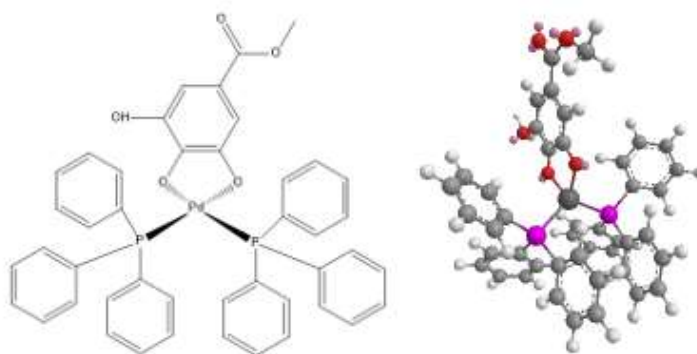


Figura 8 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente do R06.

3.1.4 Complexos de platina

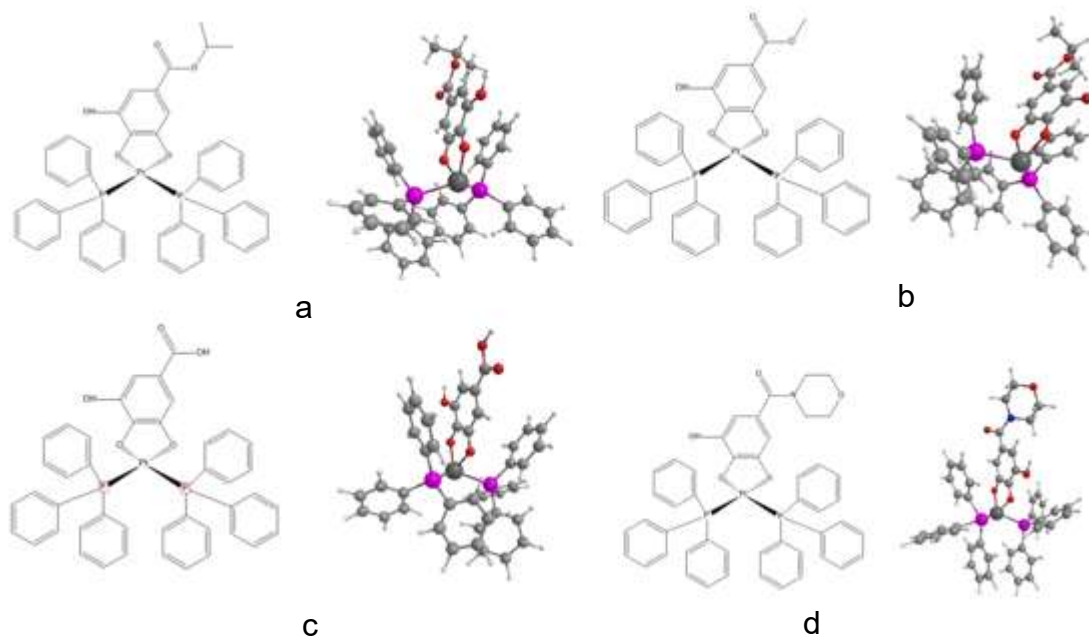


Figura 9 – Estrutura química molecular e tridimensional respectivamente, (a) R16, (b) R17, (c) R18, (d) R20.

Os complexos R16, R17, R18 e R20 (Figura 9), ambos de platina(II), foram obtidos em uma reação equimolar entre *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] e ácido gálico que foram dissolvidos em 5 mL de metanol, que foi adicionado gota a gota. Após diluir, foram

adicionadas algumas gotas de trietilamina para desprotonar o ligante. A mistura foi mantida sob refluxo de 60 a 70°C e agitada constantemente por 48 horas. O produto final foi removido por filtração, lavado com metanol e seco sob pressão.

3.2 Síntese e caracterização do CBP01

O complexo $[\text{Cu}(\text{BTA})(\text{Phen})\text{ClO}_4]$, (CBP01), foi preparado pela reação de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,0603981 g, 0,25 mmol) com 0,25 mmol do composto orgânico 4,4,4- trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (HBTA) em acetonitrila (5 mL). A mistura foi agitada durante 20 minutos, seguida pela adição de 1,10-fenantrolina (0,25 mmol). Após alguns dias à temperatura ambiente, os cristais verdes foram filtrados, lavados com água e secos sob pressão reduzida (ALMEIDA et al., 2015).

O complexo CBP01 (Figura 10) foi sintetizada pelo Instituto de química da Universidade Federal de Uberlândia. A análise elementar que foi empregada para verificar a pureza do composto e sua caracterização está na publicação de ALMEIDA et al., 2015).

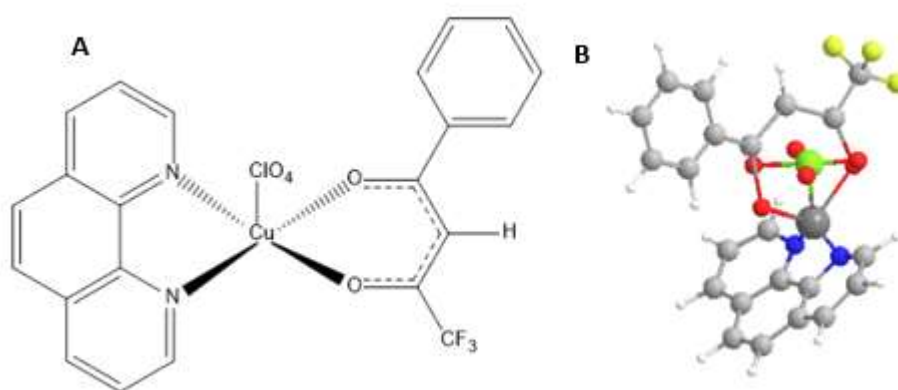


Figura 10 – Estrutura química molecular (A) e tridimensional (B) do complexo CBP01.

3.3 Docking molecular

As estruturas dos metalocomplexos foram primeiramente tratadas com base na teoria semi-empírica ao nível MP3, usando os softwares *ChemDraw* versão 12.0 e *ChemBio3D* versão 12.0, *CambridgeSoft Corporation*, Cambridge, MA, USA. Onde as estruturas foram otimizadas para obter maior estabilidade, com o recurso de minimização de energia de conformação.

As ferramentas *MGLTools* versão 1.5.7, *Autogrid4* e *Autodock4* foram utilizadas para realizar os cálculos de encaixe entre os complexos metálicos e uma molécula de DNA obtida a partir do *Protein Data Bank*, PDB DOI: 10.2210/pdb126D/pdb, NDB: BDJ051 (<http://www.rcsb.org>).

O receptor, a molécula de DNA, foi selecionado como uma molécula de estrutura rígida, enquanto os ligantes, os metalocomplexos, foram tratados como moléculas de estrutura flexível, o que mantém todas as torções da sua cadeia. Os arquivos relativos ao DNA e aos complexos metálicos foram gerados por meio da interface do programa (JANSON & PAIARDINI, 2021).

Átomos diferentes das estruturas dos ligantes e do receptor, foram removidos, inclusive das moléculas de água. A adição de hidrogênios polares foi realizada na molécula de DNA, e as cargas foram calculadas pelos métodos *Kollman* e *Gasteiger* para cada uma das moléculas e complexos (GÜNGÖR et al., 2021).

O DNA foi selecionado por uma caixa de varredura (*grid box*) com coordenadas atômicas, 62 x 58 x 96 e espaçamento de 0,375 Angstrom. Para realização dos cálculos de ligações, entre ligante e receptor, foram utilizados algoritmos genéticos lamarkianos, e o número de algoritmos genéticos executados foi definido para 100 e o número de avaliações foi definido para 2,5 milhões (KHEIRDOOSH et al., 2020; J. H. SHI et al., 2015).

Para cada uma das interações avaliadas, o Autodock classificou em um ranking de conformação de menor energia, do primeiro, para o de maior energia, o último. Conformações que exigem menos energia são mais favoráveis e espontâneas.

3.4 Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC)

O preparo das formulações de NLC e NLC/CBP01 foi realizado pelo método da emulsificação-ultrasonicação. A fase lipídica é composta por palmitato de cetila, o lipídio sólido e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, o lipídeo líquido (15 %, m/v). A fase lipídica foi aquecida em banho-maria em 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido, que é aproximadamente 60 °C. Para o

preparo de NLC/CBP01, 200 μ M, o ativo sólido, na forma de pó, foi solubilizado na fase oleosa.

Paralelamente, a fase aquosa composta por poloxamer (3%, mv) foi aquecida em temperatura idêntica da fase lipídica. Para formar a pré-emulsão, a fase aquosa foi gotejada na fase lipídica, sob agitação de 10000 rpm, por 2 minutos em agitador Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18). E a pré-emulsão formada foi sonicada por 15 minutos. Por fim, a nanoemulsão resultante foi submetida a banho de gelo, até alcançar 25 °C, a fim de solidificar as nanopartículas obtidas (RIBEIRO et al., 2018).

3.5 Caracterização estrutural e avaliação da estabilidade físico-química

As formulações resultantes, NLC (controle) e NLC/CBP01 foram caracterizadas em relação a morfologia (MEV), tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV). A caracterização de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV) foi realizada pela diluição, em triplicata, das formulações (1:1000 v/v) em água deionizada.

Foi usada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), por meio do equipamento Particle Analyzer (Anton Paar). A fim de se estabelecer o tempo de estocagem das formulações resultantes, os parâmetros foram monitorados em um período predeterminado de seis meses, em temperatura ambiente (RIBEIRO et al., 2020).

Os testes estatísticos tipo ANOVA e Tukey post test foram empregados para elucidar as possíveis alterações inter e intragrupo significativas ao longo do tempo de análise, onde $p < 0,05$.

3.6 Manutenção das linhagens celulares

Todas as linhagens celulares, TG180, C2C12, B16-F10 e NIH/3T3, foram cultivadas *in vitro*, utilizando garrafas de cultura com volume de 25 cm² contendo em seu interior meio RPMI-1640 (Gibco®, Paisley, UK) suplementado com 2 mM/L de glutamina, 25 mM HEPES, 100 μ g/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, (Sigma Chemical Co.®, St. Louis, USA), 10% de volume de soro fetal

bovino inativado por aquecimento (Cultilab®, Campinas, Brasil). Todas as garrafas foram mantidas em incubadora de CO₂ a 5% em temperatura de 37°C.

3.7 Ensaio de redução da resazurina

Para estimar o potencial citotóxico dos demais metalocomplexos e do CBP01 formulado com o NLC foram realizados testes de viabilidade pela redução da resazurina à resorufina. Em uma microplaca estéril de 96 poços, as diversas linhagens celulares na concentração de 1×10^5 células por poço. Foram cultivadas em 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% soro fetal bovino soro fetal bovino (SFB). O complexo metálico formulado e não formulado e o NLC sem a presença do complexo foram diluídos, em concentrações de 1 a 100 µM, e foram testados nas linhagens celulares.

Armazenou-se as microplacas em incubadora de CO₂ a 5% e temperatura de 37 °C por 48 horas. Após 40 horas de tratamento, a cada poço da microplaca foi adicionado 20 µL de reagente colorimétrico, Alamar Blue, com intuito de realizar a leitura em um espectrofotômetro de microplaca, ao completar 48 horas, e foi utilizado os comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte fórmula (MACHADO et al., 2021):

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{(O2 \times A1)(O1 \times A2)}{(O2 \times P1)(O1 \times P2)} \times 100$$

Na qual: A1 = absorbância das células tratadas à 570nm; A2 = absorbância das células tratadas à 600nm; O1 = coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 570nm (pré-determinado em 117216); O2 = valor de coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 600nm (pré-determinado em 80586); P1 = valores de absorbância do controle negativo à 570nm; P2 = valores de absorbância do controle negativo à 600nm.

Foram utilizados para este ensaio as linhagens TG180, C2C12, B16-F10 e NIH/3T3, no entanto para os ensaios com o CBP01 e NLC/CBP01 foram utilizadas somente as linhagens TG180 e C2C12.

3.7.1 Índice de seletividade (IS)

Para verificar a seletividade da formulação frente às células tumorais, foi necessário calcular o índice de seletividade (IS), que é dado pela relação entre as concentrações necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) das células não tumorais em relação as tumorais. Utilizou-se a seguinte fórmula (PAIXÃO et al., 2020):

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

Onde, $IS \geq 2$ qualificam o composto como mais seletivo para as linhagens tumorais, ou seja, mata o dobro de células neoplásicas frente às células saudáveis e serão considerados promissores.

3.8 Ensaio de interação e clivagem de DNA por eletroforese

Para avaliar a interação do complexo com o DNA, o NLC/CBP01 formulado foi combinado com DNA plasmidial. O plasmídeo extraído foi utilizado de modo que foram preparadas 13 conjunto de misturas (volume total de 10 μ L) contendo 30ng/ μ L do plasmídeo, o tratamento em concentrações de 10 μ M e 50 μ M em PBS 1X contendo ou não dimetil sulfoxido (DMSO – 0,05%), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – 15mM) e ambos juntos.

O plasmídeo também foi avaliado na presença dos controles, isto é, sem o tratamento, na presença da enzima de restrição adequada (Nhe I) e na presença de H_2O_2 . As misturas das reações foram incubadas a 37°C por 12 horas e posteriormente foram adicionados 2 μ L do tampão de carga (loader - 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol, 10 mM de EDTA).

As amostras foram submetidas a eletroforese, em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,05% (10 μ g/mL) em tampão Tris-borato 90mM, pH 8,0, EDTA 20 mM (0,5X TBE). O gel foi submetido a 80 volts por 3 horas e fotografado sob luz ultravioleta. A quantificação das bandas foi realizada pelo software ImageJ versão 1.53k (Java 1.8.0_172).

3.9 Ensaio de autofagia

Para verificar ativação da via autofágica, a linhagem de sarcoma 180 foi tratada com o complexo NLC/CBP01 nas concentrações de 1, 10 e 50 μ M, e meio de cultura (controle negativo) em uma placa de cultura de 24 poços (2 x 10⁵ células por poço) com 250 μ l de meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% SFB.

As células foram tratadas por 24 horas e logo após foi adicionada de 0.05mM Monodansilcadaverina (MDC) – Sigma-Brasil – por poço e incubado a 37°C, no escuro, em estufa de CO₂ (5%) por trinta minutos. Em seguida as células foram recolhidas, centrifugadas e o pellet lavado com PBS gelado 1X (processo repetido três vezes). O pellet foi ressuspensionado em uma solução de PBS+Glicina 0,1 M e colocados 500 μ l dessa solução de células-PBS-Glicina em placa de 24 poços e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss L5M510, Alemanha).

3.10 Tratamento de dados

As análises de docking molecular foram avaliadas usando os programas PyMol versão 0.99 e Chimera versão 1.16.

No que tange às análises do IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA), a partir de uma regressão não linear, em que a porcentagem da viabilidade celular foi determinada como uma função logarítmica de base 10 das concentrações testadas, assumindo um intervalo de confiança de 95% (p <0,05).

4 RESULTADOS

4.1 *Docking* molecular

4.1.1 *Docking* molecular dos metalocomplexos

Para contribuir com o desenvolvimento de fármacos com planejamento e mais especificidade, a ancoragem molecular fornece dados de interações de forma mais precisa. Uma vez que nos apresenta mecanismos de ligações e interações entre uma molécula alvo, nesse caso o DNA e pequenas moléculas como os metalocomplexos utilizados. Fornece dados sobre as complexações mais favorável entre ambos, prevendo qual o local de ligação e a sua energia relativa de formação, predizendo se essa interação será favorável ou não.

Foram utilizados os metalocomplexos, Dan01, Dan02, Dan03, Dan04, Dan05, Lu01, Lu02, Lu03, R06, R16, R17, R18 e R20. Os quais foram utilizados como ligantes de possível interação com a molécula de DNA. Cada uma de suas estruturas químicas foram modeladas e posteriormente submetida ao processo de minimização de energia pela conformação mais favorável.

As moléculas em sua estrutura tridimensional foram exportadas para o autodock para interação individual com o DNA. Foram analisadas as conformações de estabilidade, uma a uma, e os valores negativos de energia mostram que a ligação entre os metalocomplexos e a molécula alvo são favoráveis. A Tabela 1 foi elaborado levando-se em conta a conformação mais favorável de cada complexo metálico, ou seja, a menor energia para manter a estabilidade da interação.

A interação com o DNA se apresenta como mecanismo de ação destes metalocomplexos. É apresentado também que as interações são não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e de Van de Waals. Com preferência para os sulcos, interagindo diretamente com as bases nitrogenadas, suas pentoses e seus grupamentos fosfato. Compostos de platina e complexos com anéis aromáticos apresentam uma afinidade por intercalação, pois esta interação por empilhamento π - π apresenta-se mais estável.

Serão levantados para discussão apenas a conformação de menor gasto energético de cada metalocomplexo, ou seja, a mais favorável, demonstrando

preferencialmente as ligações de hidrogênio. Todos os compostos interagem com as duas fitas de DNA por meio de interações mais fracas como hidrofóbicas e Van de Waals.

Tabela 1 – Energia das interações entre metalocomplexos e a molécula de DNA e número de ligações de hidrogênio entre as interações.

Metalocomplexos	Energia da ligação (Kcal/mol)	Ligações de hidrogênio
Dan01	-8,21	3
Dan02	-8,63	3
Dan03	-7,65	2
Dan04	-7,74	2
Dan05	-8,90	2
Lu01	-9,21	3
Lu02	-9,39	4
Lu03	-9,73	-
R06	-6,93	2
R16	-7,83	1
R17	-7,90	-
R18	-9,09	2
R20	-7,57	1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Foi demonstrado que os complexos Dan01 e Dan02, estruturalmente semelhantes e com centro de cobre, interagem concomitantemente com as duas hélices do DNA, tendo preferência pelo seu sulco menor. De forma mais contundente por meio de ligações de hidrogênio, entre seu hidrogênio 23 e adenina 8 na cadeia A e entre seus hidrogênios 23 e 3 com guanina 15 na cadeia B, conforme pode ser visto na Figura 11 e 12, e na ampliação destacado por meio das esferas vermelhas.

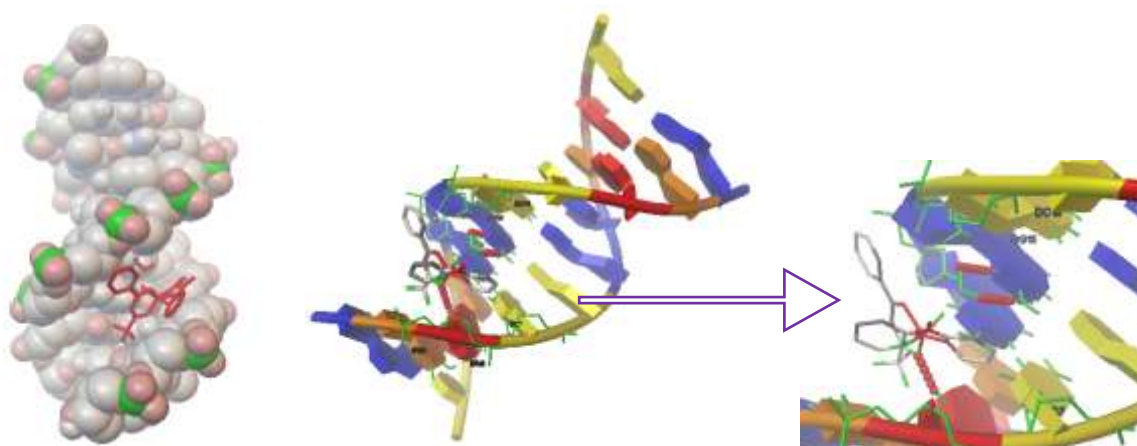


Figura 11 – Interação entre Dan01 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio. Z

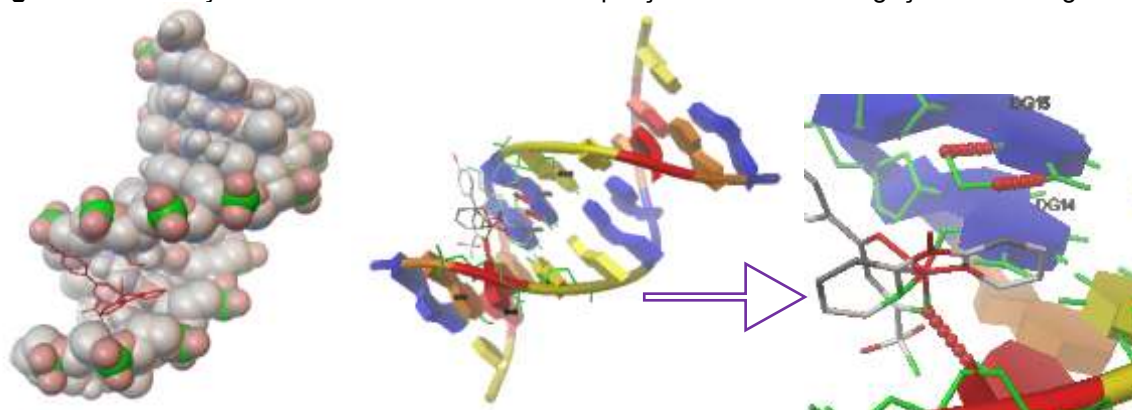


Figura 12 – Interação entre Dan02 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

O complexo Dan03, também interage com as duas hélices da molécula de DNA, por meio de duas ligações de hidrogênio, que ocorrem entre seus hidrogênio 3 e a adenina 8 da cadeia A, e na cadeia B entre seus hidrogênios 22 e a guanina 14. As ligações de hidrogênio estão demonstradas na ampliação da Figura 13, por meio das esferas vermelhas.



Figura 13 – Interação entre Dan03 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

Os complexos Dan04 e Dan05 interagem com apenas uma fita do DNA, tendo preferência pelos sulcos menores, por meio de ligações de hidrogênio. Que ocorrem, em ambos, entre o hidrogênio 22 e a guanina 4 e entre o hidrogênio 3 e a guanina 5, conforme demonstrado nas Figuras 14 e 15 e sua ampliação. Lembrando que o complexo interage com todo o sulco do DNA por meio de outras forças de interação em ambas as fitas.

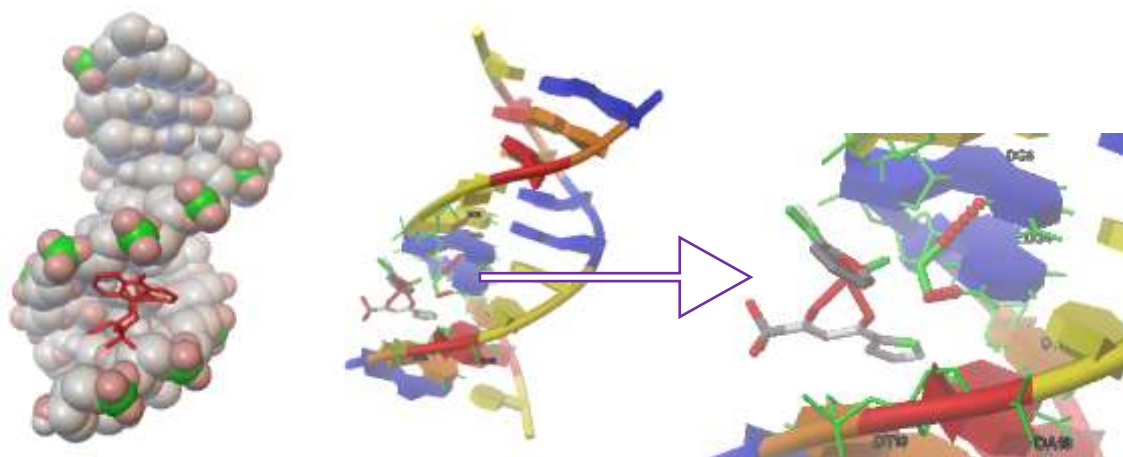


Figura 14 – Interação entre Dan04 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

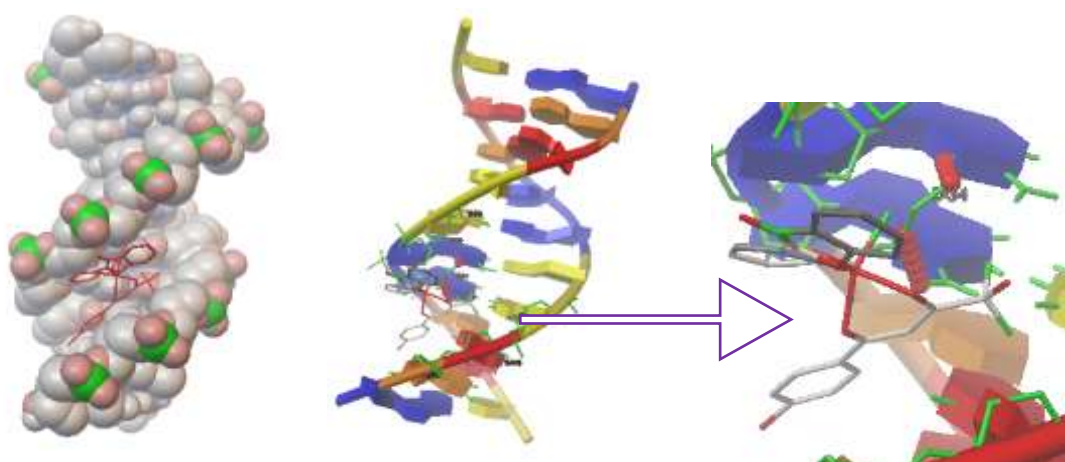


Figura 15 – Interação entre Dan05 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

Os complexos Lu01 e Lu02, interagem com três e quatro ligações de hidrogênio, respectivamente. Lu01 interage apenas com a fita simples do DNA, entre seu hidrogênio 3 e a adenina 8, e entre os oxigênios do grupo nitrato e o hidrogênio da hidroxila da pentose, da adenina 8 e da guanina 9. Que pode ser visto na Figura 16, destacado na ampliação.

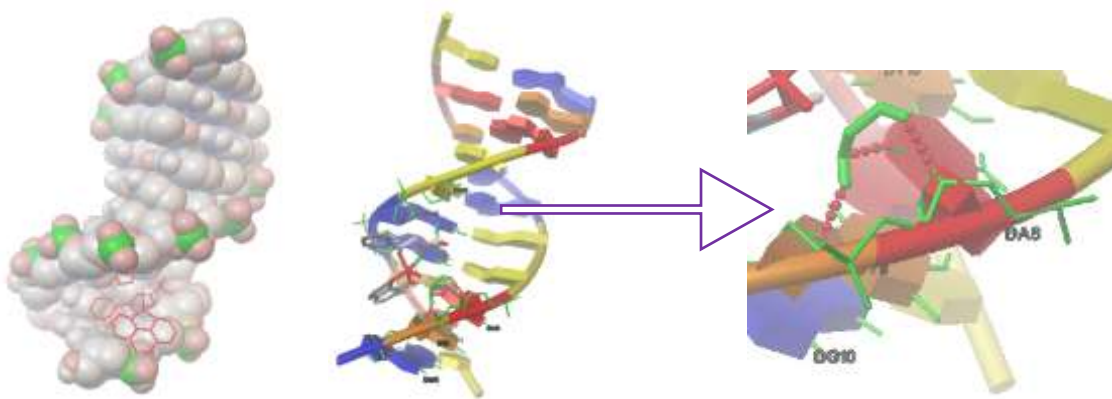


Figura 16 – Interação entre Lu01 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

Já o complexo Lu02 interage com as duas cadeias sendo que na cadeia A acontece entre seu hidrogênio 3 a a adenina 8, entre os oxigênios do grupo nitrato e o hidrogênio da hidroxila da pentose, da timina 9 e da adenina 8. E na cadeia B entre seu hidrogênio 22 e guanina 14, conforme está demonstrado nas Figura 17 e destacado com esferas vermelhas na ampliação.

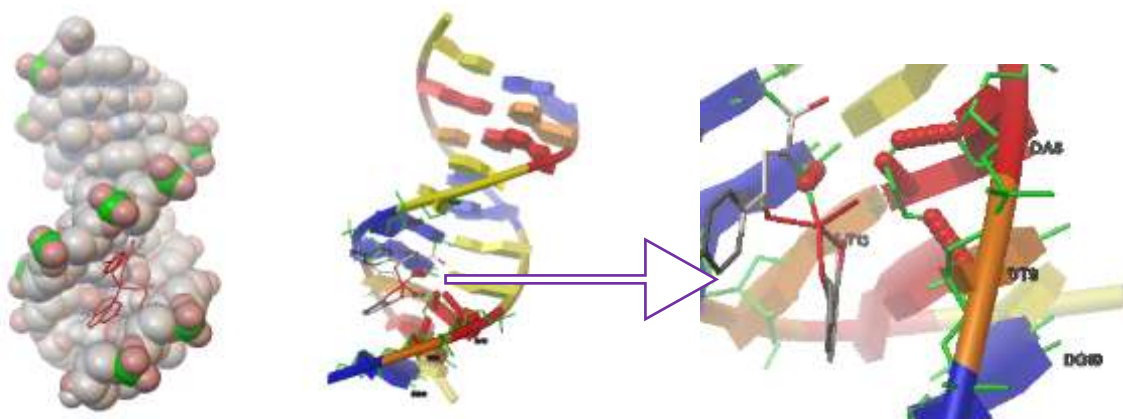


Figura 17 – Interação entre Lu02 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

Complexo Lu03, com centro de cobre, não apresenta interações do tipo ligações de hidrogênio, conforme pode ser visto na Figura 18. Apresentando sua conformação mais estável, interagindo com a dupla fita, por meio de interações hidrofóbicas e de Van de Waals, que podem ser vistas representadas pelas esferas transparentes, que mostram seu alcance energético.



Figura 18 – Interação entre Lu03 e DNA e sua ampliação mostrando as interações intermoleculares.

O complexo R06, com centro de paládio, interage com a dupla fita da molécula de DNA, com três ligações de hidrogênio, mostrando interação na cadeia A, entre seu hidrogênio 22 e a guanina 4 e o seu hidrogênio 3 e a guanina 5. E na cadeia B apresenta entre o hidrogênio de sua hidroxila e o grupo fosfato da citosina 17, como pode ser observado na Figura 19. Este complexo ainda apresenta interação por intercalação, do tipo empilhamento π - π , que ficou ranqueada na posição 5 entre as 100 posições por quantidade de energia.

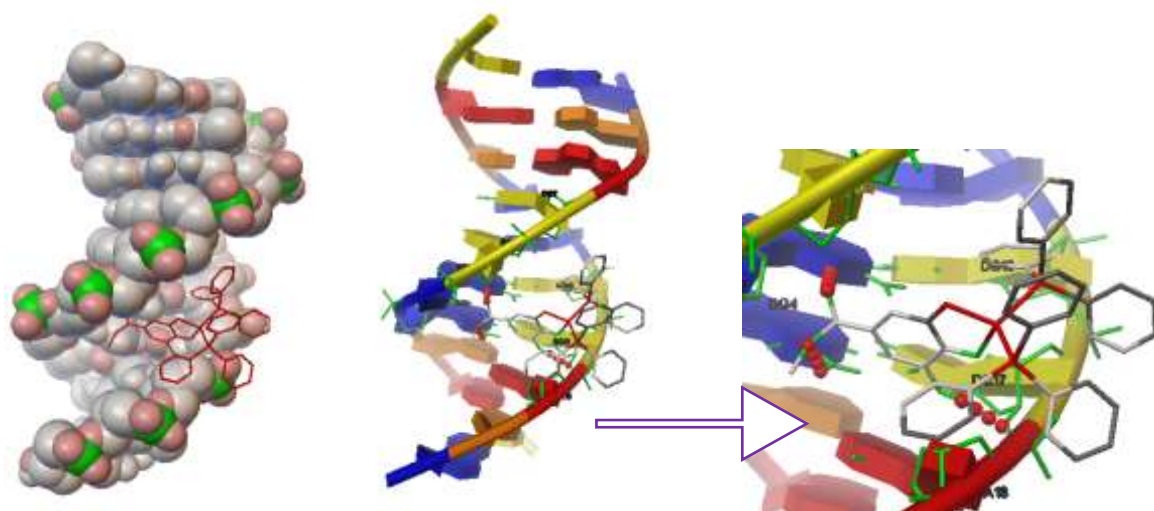


Figura 19 – Interação entre R06 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

O complexo R16, com centro de platina, apresenta interação por meio de ligação de hidrogênio, em apenas uma fita, entre o hidrogênio de sua hidroxila e o grupo fosfato da citosina 16, destacados na ampliação da Figura 20, por meio das esferas vermelhas.

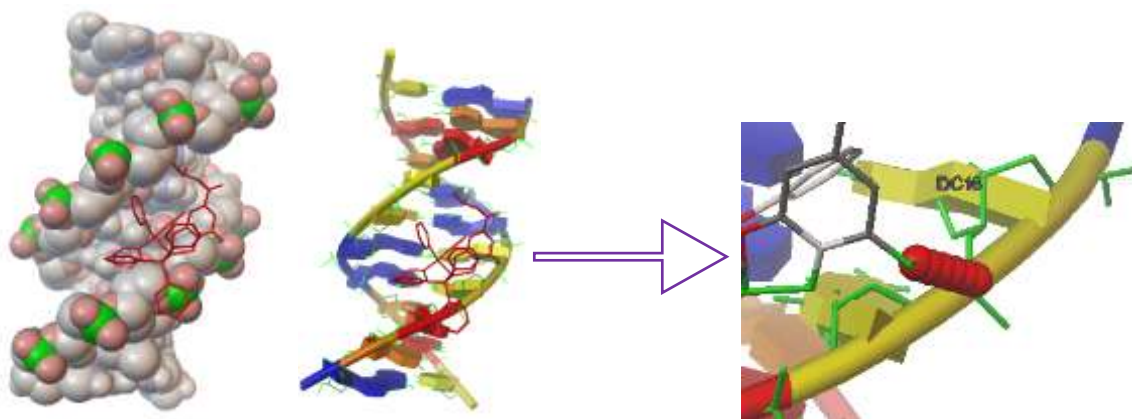


Figura 20 – Interação entre R16 e DNA e sua ampliação mostrando a ligação de hidrogênio.

O complexo R17, também com centro de platina, interage em sua conformação mais favorável, apenas por meio de interações hidrofóbicas e de Van der Waals. As interações estão demonstradas na Figura 21 por meio de esferas transparentes, que mostram o raio do alcance de suas interferências.

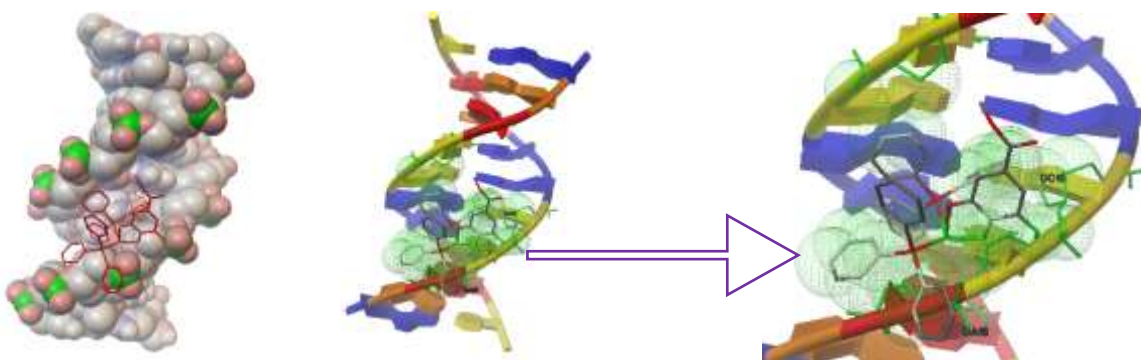


Figura 21 – Interação entre R17 e DNA e sua ampliação mostrando as interações intermoleculares.

O complexo R18, também com centro de platina, apresenta interações do tipo ligações de hidrogênio que acontecem nas duas fitas do DNA, sendo que na fita A, ocorre entre o hidrogênio 3 e a guanina 5, e entre o hidrogênio de sua hidroxila e o fosfato da citosina 17, na cadeia B, conforme demonstrado pela Figura 22 e destacado com esferas vermelhas na ampliação.

O complexo R20, também com centro de platina, interage com a molécula de DNA por meio de uma ligação de hidrogênio que ocorre em uma de suas fitas, entre seu hidrogênio 21 e a guanina 5, conforme demonstrado pela Figura 23 e na sua ampliação destacado com esferas vermelhas. Embora o complexo apresente a propriedade de intercalação por empilhamento π - π , que ficou ranqueado na

posição 28, não se apresenta como sua conformação mais favorável energeticamente, ele manteve o menor esforço energético em sua preferência pelo sulco menor.

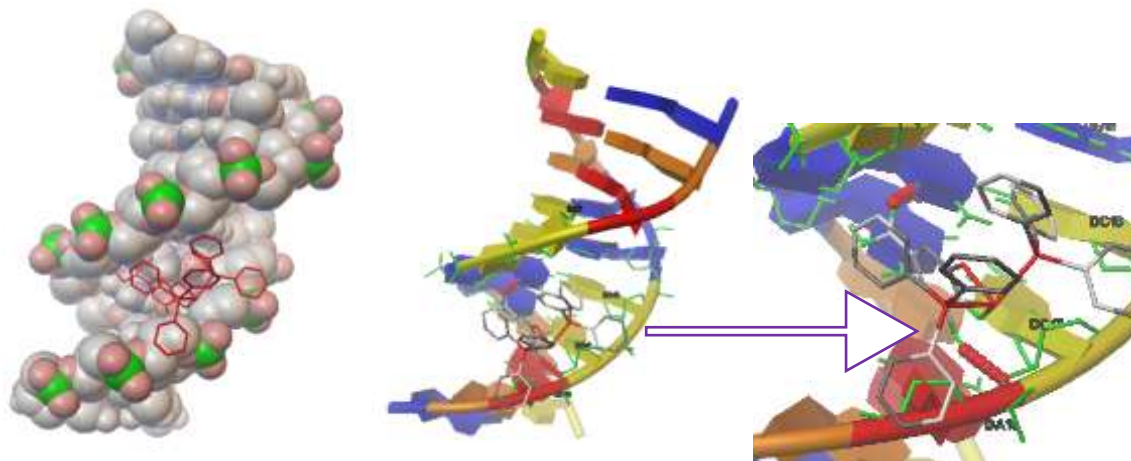


Figura 22 – Interação entre R18 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

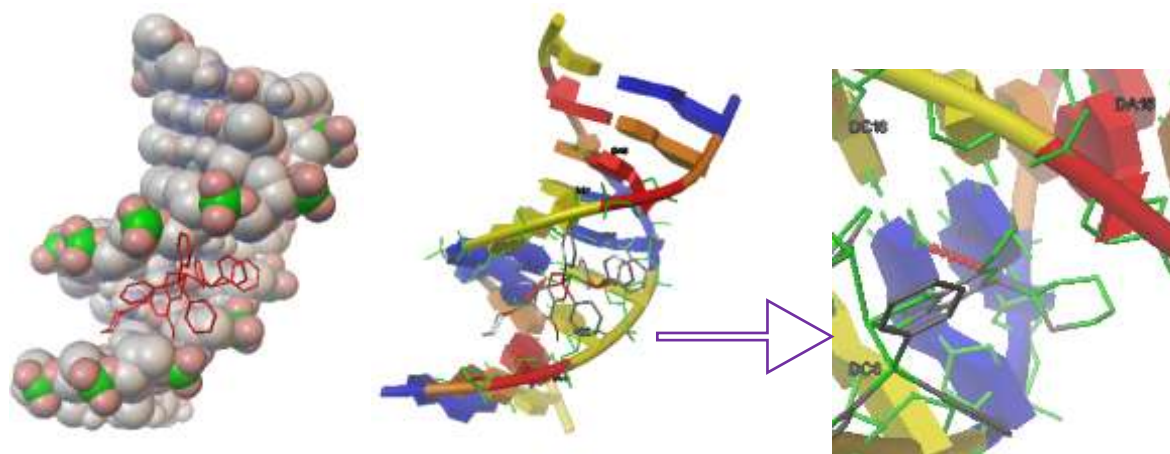
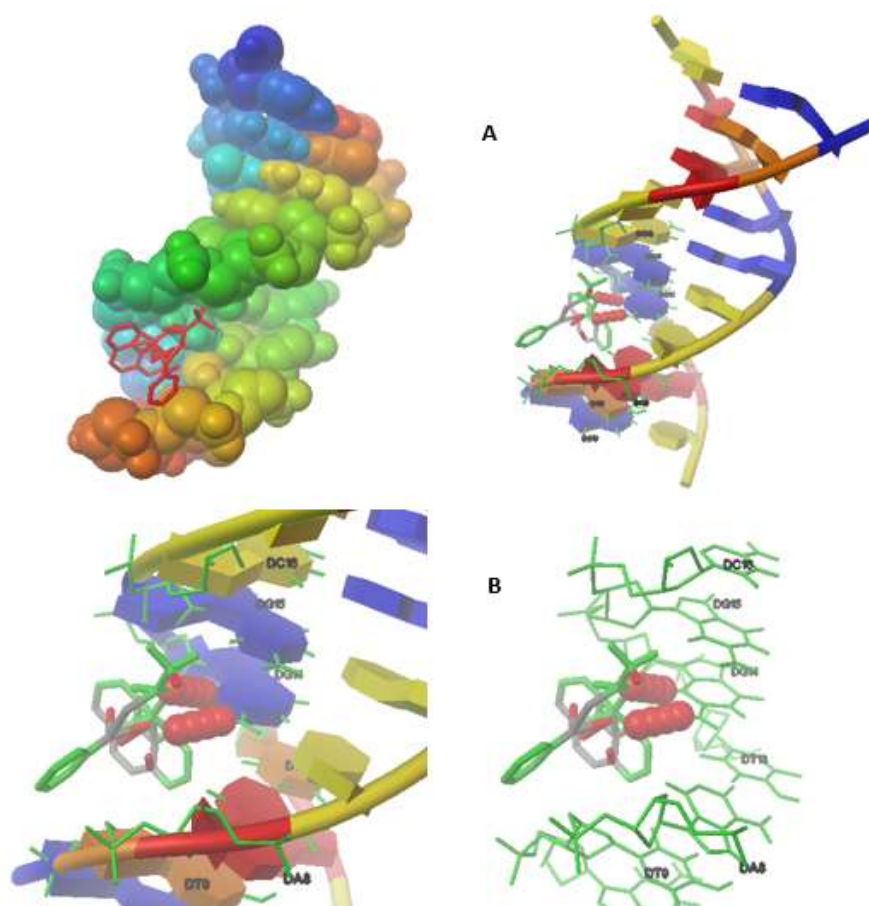


Figura 23 – Interação entre R20 e DNA e sua ampliação mostrando as ligações de hidrogênio.

4.1.2 *Docking* Molecular do CBP01

A ancoragem molecular fornece dados de interações de forma mais específica, uma vez que nos apresenta mecanismos de ligações e interações entre uma molécula alvo, o DNA e a molécula do complexo CBP01. Fornece dados sobre as complexações mais favoráveis entre ambos, prevendo qual o local de ligação e

A interação com o DNA se apresenta como mecanismo de ação de metalocomplexos de cobre. Sendo essas interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e de Van de Waals. Tem preferência pelo sulco menor e interage diretamente com as bases nitrogenadas (Figura 24).



43

Será discutido apenas a conformação de menor gasto energético do metalocomplexo, ou seja, a mais favorável, demonstrando preferencialmente as ligações de hidrogênio.

Foi demonstrado, na classificação de menor energia, que o complexo CBP01, com centro de cobre, interage, preferencialmente com uma das fitas do DNA, tendo predileção pelo seu sulco menor. De forma mais contundente por meio de ligações de hidrogênio, entre seu hidrogênio 22 e guanina 14 na cadeia B e entre seu hidrogênio 3 e guanina 14 na mesma cadeia, conforme pode ser visto na Figura 24 (A), e na ampliação destacado por meio das esferas vermelhas na Figura 24 (B). Em classificações com maior emprego de energia o CBP01 apresenta interações com a dupla hélice, no entanto, não são a conformação mais estável.

4.2 Ensaio de redução da resazurina e IS dos metalocomplexos

Para a avaliação da atividade antitumoral de metalocomplexos, sintetizados pelo Instituto de Química da UFU, iniciou-se por um screening e avaliou-se os respectivos resultados encontrados do IC₅₀ e IS nas linhagens murinas de sarcoma 180 e sua linhagem correspondente não carcinogênica, mioblastos C2C12. E nas linhagens de melanoma murino, B16-F10 e sua linhagem correspondente não carcinogênica de fibroblastos, NIH/3T3.

Foram testados os seguintes compostos: Dan01, Dan02, Dan03, Dan04, Dan05, Lu01, Lu02, Lu03, R06, R16, R17, R18 e R20. Obteve-se o IS por meio da relação entre o IC₅₀ da linhagem não tumoral e IC₅₀ da linhagem tumoral, onde valores de IS ≥ 2 serão considerados promissores para desenvolvimento de fármacos antitumorais (BADISA et al., 2009).

Como pode ser observado na Tabela 2, nenhum dos complexos apresentou IS igual ou maior que 2, e embora mostrassem real atividade contra linhagens tumorais, mostraram atividade semelhante contra as linhagens não tumorais. Sendo assim, não apresentaram seletividade frente às células normais. Os melhores resultados foram obtidos, na relação entre as linhagens de mioblastos e sarcoma, pelos complexos de Cobre (II), Lu03 com IS igual a 1,87 e Dan03 com 1,66, seguidos pelo complexo de níquel (II), Lu01 com 1,56 e pelo complexo de platina, R20 com 1,54.

Tabela 2 – IC₅₀ e Índice de seletividade dos compostos metálicos nas linhagens celulares.

Compostos	Linhagens celulares					
	IC ₅₀ C2C12	IC ₅₀ TG-180	IS	IC ₅₀ NIH/3T3	IC ₅₀ B16-F10	IS
Dan01	42,31	62,11	0,68	50,06	49,15	1,02
Dan02	32	72,06	0,45	47,76	54,99	0,87
Dan03	46,89	28,34	1,66	45,89	67,31	0,68
Dan04	42,16	67,85	0,62	41,18	30,95	0,90
Dan05	12,46	14,07	0,89	16,48	31,08	0,53
Lu01	39,75	25,53	1,56	48,17	45,53	1,06
Lu02	31,39	37,24	0,84	50,1	32,12	1,56
Lu03	41,12	22,01	1,87	29,16	33,11	0,88
R06	>100	>100	-	>100	>100	-
R16	>100	>100	-	>100	>100	-
R17	>100	>100	-	>100	>100	-
R18	50,27	35,82	1,4	17,52	30,56	0,57
R20	29,89	19,39	1,54	21,56	59,94	0,36

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Já na relação das linhagens de fibroblastos e melanoma o complexo de níquel (II), Lu02 apresentou um IS igual a 1,56. Alguns complexos de platina, como R06, R16 e R17 não mostraram atividade nas dosagens até 100 µM, podendo apresentar atividade em valores maiores que os testados o que poderá apresentar uma certa toxicidade.

4.3 Caracterização estrutural das formulações de NLC e NLC/CBP01

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de ambas as amostras analisadas, mostraram que as nanopartículas apresentam morfologia esférica, contornos bem delimitados e distribuição homogênea (Figura 25).

Notando-se que a integridade das nanopartículas não foi perturbada pela presença do ativo CBP01.

Os tamanhos de partículas médios iniciais obtidos foram de $243,5 \pm 3,72$ nm e $248,3 \pm 3,64$ nm para NLC e NLC/CBP01, respectivamente. No que tange à distribuição dos tamanhos iniciais, a formulação de NLC exibiu valor médio de PDI de $0,142 \pm 0,018$, enquanto que para NLC/CBP01 o valor médio foi de $0,163 \pm 0,009$. A presença do ativo não resultou em um aumento do tamanho ou da heterogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas, sugerindo compatibilidade entre a matriz e o CBP01.

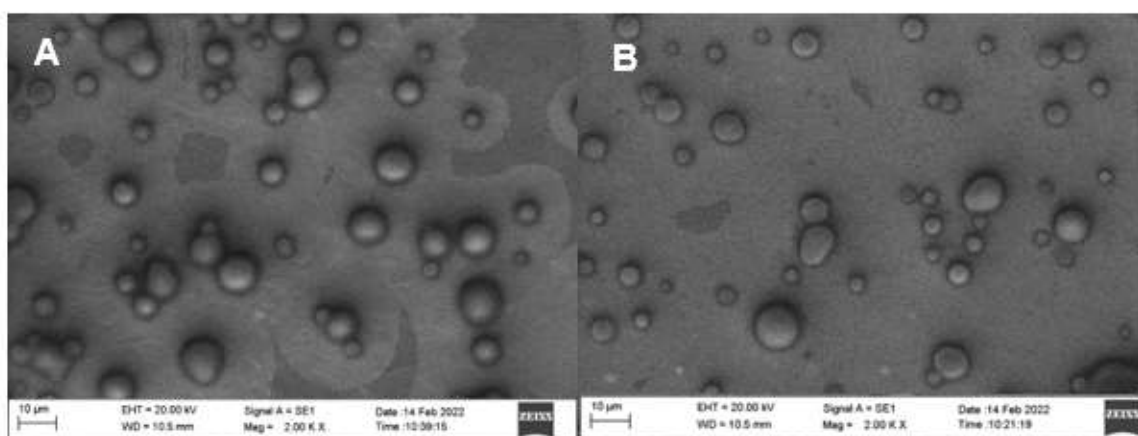


Figura 25 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações de NLC (A) e NLC/CBP01 (B), aumento 2000x.

Quanto ao potencial Zeta, as formulações de NLC e NLC/CBP01 apresentaram valores médios iniciais de $-26,43 \pm 0,67$ mV e $-31,73 \pm 0,76$ mV, respectivamente.

Conforme mostrado na Figura 26, os tamanhos de partículas de ambas as formulações se mantiveram estáveis durante os seis meses da análise à temperatura de 25°C , não apresentando diferenças estatísticas significativas entre si, onde $p > 0,05$. Após os seis meses de análise, os tamanhos médios de partículas foram de $246,0 \pm 4,27$ nm para NLC e $244,03 \pm 1,55$ para NLC/CBP01.

A Figura 27 mostra a variação dos valores de PDI ao longo de seis meses da análise à 25°C . Os valores de PDI, após o período de 180 dias de análise, foram de $0,131 \pm 0,019$ e $0,167 \pm 0,006$, para NLC e NLC/CBP01 respectivamente. Estes valores correspondem a uma distribuição monodispersa dos tamanhos, de acordo com os valores requeridos para formulações nanoestruturadas (RIBEIRO et al.,

2017). Além disso, na análise intragrupo, ou seja, na análise das variações dos valores de PDI da formulação NLC/CBP01 ao longo do tempo, não foi observada diferenças estatísticas significativas, garantindo a homogeneidade do sistema, onde $p > 0,05$.

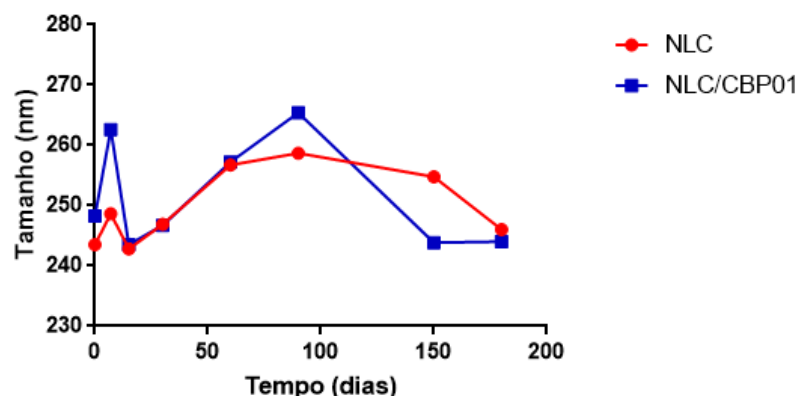


Figura 26 – Monitoramento do tamanho de partícula (nm) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 μ M, m/v), ao longo de seis meses à 25 °C (n=3).

A Figura 28, no que tange aos valores das variações do potencial Zeta, demonstrou que apesar das flutuações de valores comuns aos coloides, resultou em diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Ambas as formulações mantiveram valores de potencial Zeta maiores que -25 mV, com valor médio de $-7,9 \pm 0,5$ mV para NLC e de $-25,9 \pm 0,12$ mV para NLC/CBP-DRI-12, o que sugere uma excelente estabilidade físico-química das amostras pelo período de análise.

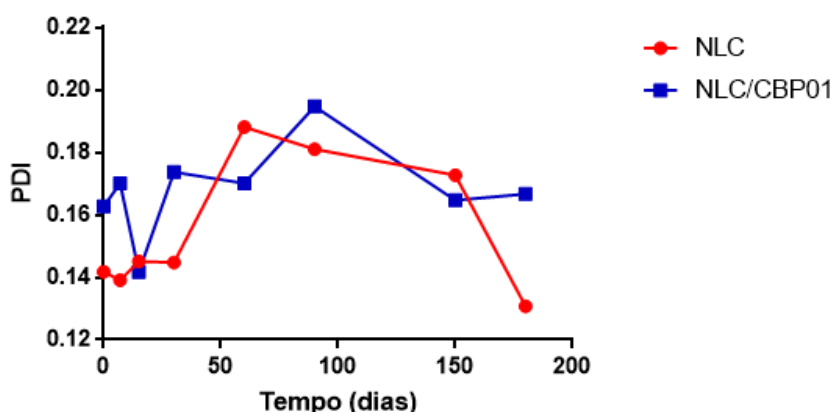


Figura 27 – Monitoramento do índice de polidispersão (PDI) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 μ M, m/v), ao longo de seis meses à 25 °C (n=3).

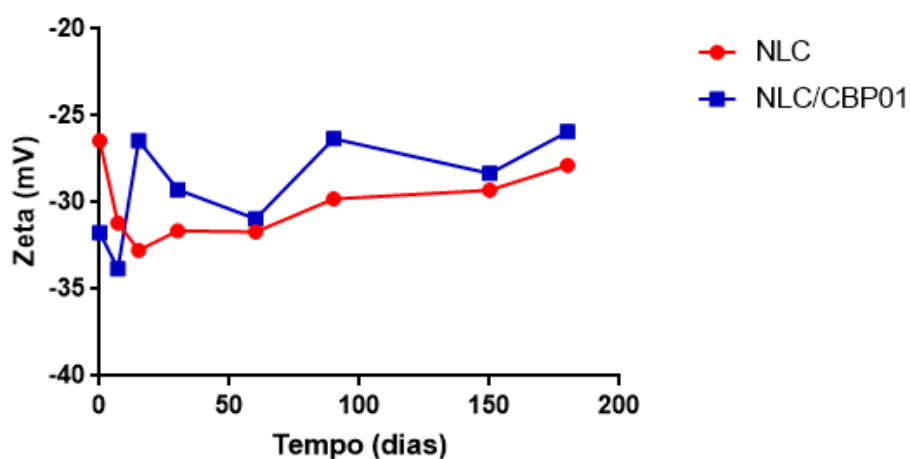


Figura 28 – Monitoramento dos valores de potencial Zeta (mV) das formulações de NLC (controle) e NLC/CBP01 (200 μ M, m/v), ao longo de seis meses à 25 °C (n=3).

4.4 Ensaio de redução da resazurina e IS do CBP01 E NLC/CBP01

Foi realizado o teste de citotoxicidade, pela técnica de redução da resazurina, da formulação NLC sem o complexo ativo e do complexo nanoformulado, NLC/CBP01. Foram utilizadas no total duas linhagens celulares, sendo uma delas tumoral (murinas: sarcoma 180) e sua linhagem correspondente não tumoral (murinas: mioblastos C2C12).

O complexo de cobre(II) formulado, NLC/CBP01, apresentou ótimo resultado na linhagem de sarcoma 180, onde seu IC_{50} foi 7,202 e IS de 2,80 (Tabela 3).

Tabela 3 – IC_{50} nas linhagens celulares e índice de Seletividade (IS).

	IC_{50} C2C12	IC_{50} TG-180	IS
Complexos			
NLC	43,39	69,09	-
NLC/CBP01	20,18	7,202	2,80

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.5 Ensaio de interação e clivagem de DNA por eletroforese

Ao realizar o ensaio de eletroforese do DNA plasmidial, em gel de agarose, foi apresentado três padrões de bandas distintos, nos quais são encontradas três formas plasmidiais diferentes, dependendo da integridade das hélices do DNA:

- A forma I, Super espiralada, onde o plasmídeo permanece com sua fita de DNA intacta, sem a presença de quebras nas fitas de DNA. Esta forma torna a passagem mais rápida ao migrar na malha do gel, na maioria das condições de eletroforese. Por isso é indicada como a banda mais inferior encontrada no gel.
- A forma II, quebra simples, círculo relaxado, é onde acontece as quebras físicas, cortes enzimáticos que ocorrem durante o isolamento de plasmídeos ou tratamento com compostos que interagem com o DNA introduzem quebras em uma das fitas de DNA super espiralada, dando origem à estrutura circular aberta ou um corte no plasmídeo. É a forma com maior dificuldade de migração pela malha do gel, sendo indicada pela banda localizada na parte superior do gel.
- A forma III, quebra da dupla fita ou forma linear, onde o DNA linear é o resultado da ação de uma enzima de restrição ou um complexo como o NLC/CBP01. Que causam um dano no plasmídeo na quebra de suas fitas duplas diretamente opostas uma à outra na hélice do DNA, causando uma conformação linear. Normalmente apresenta o padrão de banda entre as outras duas formas do plasmídeo, obtendo uma formação de banda intermediária.

Os tratamentos no plasmídeo com diferentes concentrações do complexo NLC/CBP01 (10 μ M e 50 μ M) mostraram a capacidade deste composto de interagir e clivar o DNA. No entanto, essa quebra ocorreu apenas na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), quando o complexo realizou cortes na dupla hélice do DNA, produzindo plasmídeos lineares, na forma III, como naquele observado no controle positivo tratado com a enzima de restrição Nhe I (Figura 29). Também foi observado no gel de agarose que a presença de H_2O_2 reduziu as bandas da forma II, com cortes na fita simples, e da forma I, sendo que todas as bandas divergiram estatisticamente do controle tratado apenas com H_2O_2 em concentração de 15 mM.

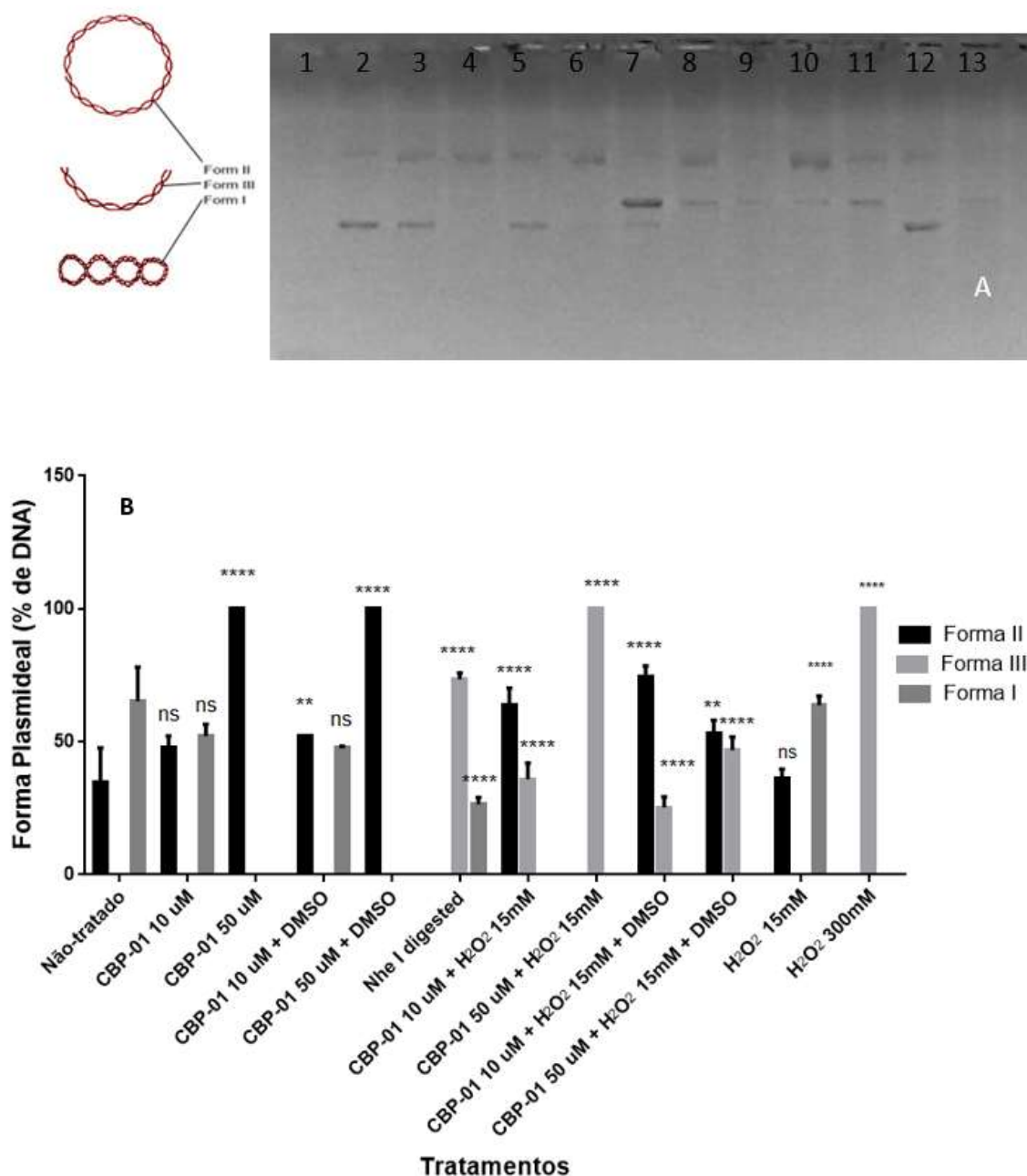


Figura 29 – (A) Imagem do gel de agarose de degradação plasmidial e os padrões de bandas encontrados em cada tratamento, onde: 1: Marcador; 2: Controle sem tratamento; 3: NLC/CBP01 (10 µM); 4: NLC/CBP01 (50 µM); 5: NLC/CBP01 (10 µM) + DMSO; 6: NLC/CBP01 (50 µM) + DMSO (0,05%); 7: Nhe I; 8: NLC/CBP01 (10 µM) + H₂O₂ (15 mM); 9: NLC/CBP01 (50 µM) + H₂O₂ (15 mM); 10: NLC/CBP01 (10 µM) + H₂O₂ (15 mM) + DMSO (0,05%); 11: NLC/CBP01 (50 µM) + H₂O₂ (15 mM) + DMSO (0,05%); 12: H₂O₂ (15 mM); 13: H₂O₂ (300 mM); (B) Dados obtidos a partir do ensaio de degradação do plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) – hMGFP). Gráfico representativo da quantificação de DNA plasmidial nas bandas encontradas a partir da eletroforese em gel de agarose. Dados expressos a partir da média ± desvio padrão de três ensaios. Análise estatística feita por 2way ANOVA e comparação múltipla por teste de Dunnett *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns não significativo comparando com o controle sem tratamento.

Quando o complexo foi associado ao DMSO, que é um agente sequestrador de espécies reativas de oxigênio, observou-se um considerável aumento na intensidade da banda correspondente à forma I, super espiralada, que indica o plasmídeo íntegro. Esse aumento mostra uma inativação da capacidade de clivagem do complexo, o que seria ao fato de possível geração de ROS do complexo.

4.6 Ensaio de autofagia

Com a intenção de identificar os mecanismos de morte celular que é ocasionado pelo complexo NLC/CBP01, células tumorigênicas de sarcoma 180 foram tratadas com três concentrações do complexo (1 μM , 10 μM e 50 μM). Usando a marcação com monodansilcadaverina (MDC), pode-se verificar que na concentração de 10 μM o NLC/CBP01 foi capaz de induzir a via autofágica das células TG180, fato evidenciado pela marcação dos vacúolos autofágicos com MDC.

Conforme mostrado na Figura 30, o complexo NLC/CBP01 estimulou processos autofágicos em células de sarcoma 180 evidenciado pela densidade fluorescente com a presença de partículas marcadas com MDC dentro das células, na concentração mais próxima do IC_{50} , enquanto que no grupo de controle negativo, sem tratamento, não foi observada nenhuma coloração nas células. Este experimento indicou que CBP-01 aumentou o recrutamento de MDC para autofagossomos no citoplasma na concentração de 10 μM , conforme exposto no gráfico da Figura 31.

A autofagia é conhecida por ser uma resposta de proteção celular, que ocorre em nível basal, para manter a homeostase celular e regular os processos catabólicos que elimina organelas e proteínas para posterior formação de precursores macromoleculares. Estando também ligada a morte celular, por ser uma resposta tecidual e celular ao estresse oxidativo, onde ela é induzida para diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) (FAN et al., 2018).

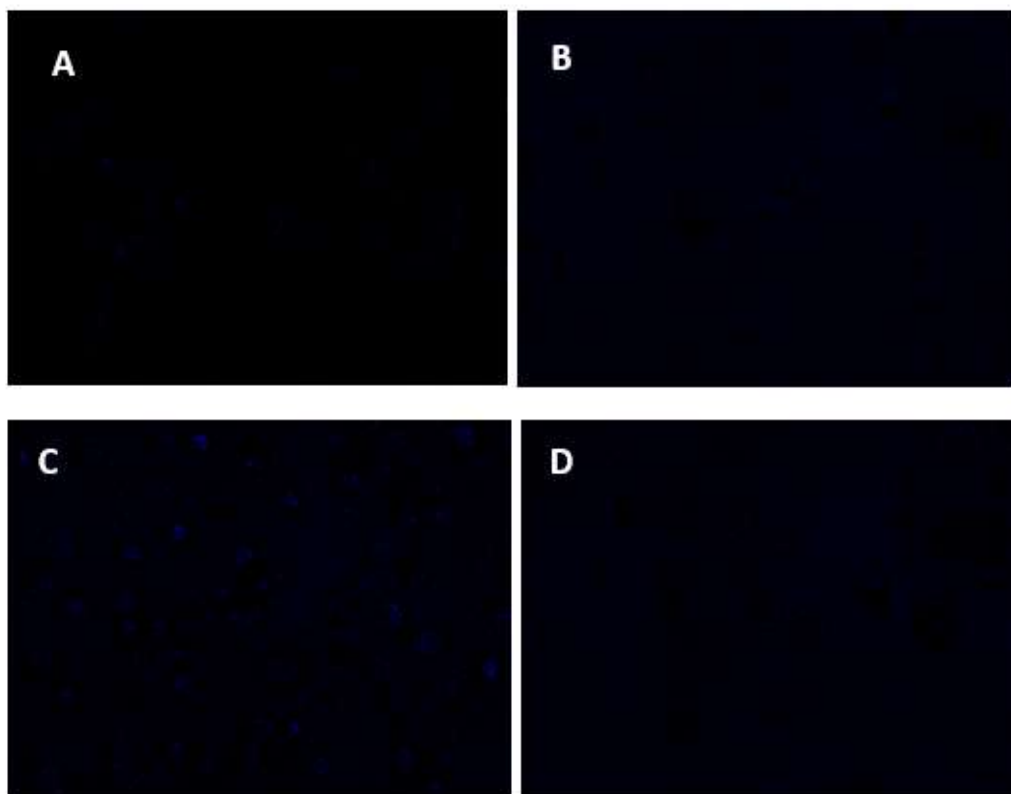


Figura 30 – Imagem expositiva da presença de vacúolos autofágicos marcados com MDC nas células tumorígenicas de sarcoma 180 tratadas não tratadas (A) e tratadas com 1 μ M (B), 10 μ M (C) e 50 μ M (D) de CBP01.

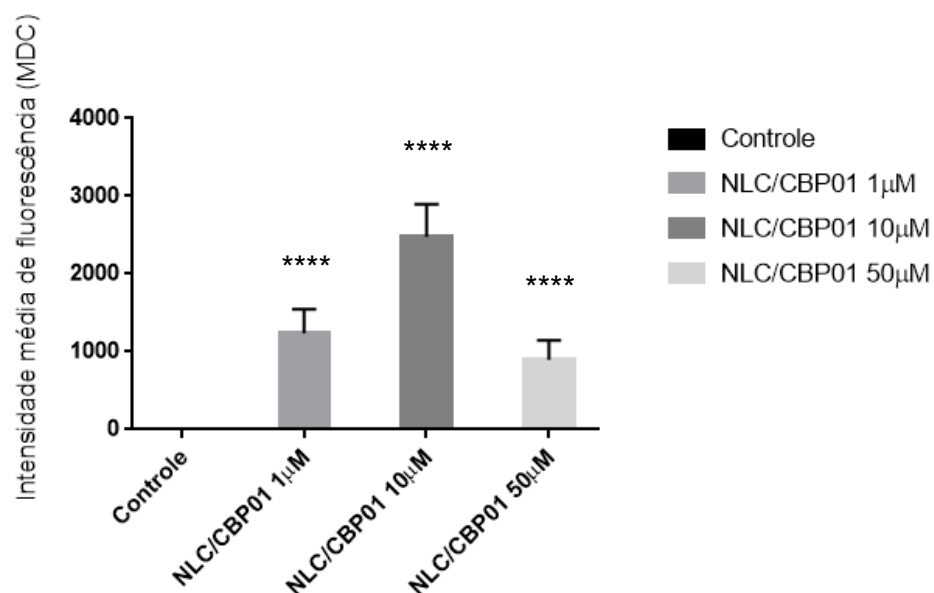


Figura 31 – Gráfico representativo da intensidade fluorescência da marcação dos vacúolos autofágicos com MDC. Os dados representam a média $\pm$ o erro padrão. **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo por one-way anova seguido pelo teste de Bonferroni)

5 DISCUSSÃO

O uso de metalocomplexos, para tratamento ou diagnóstico, como a cisplatina na terapia do câncer, surgiu como incentivo para a busca de novos complexos usando metais de coordenação e seus ligantes (EL-SHAFAI et al., 2021).

Esse incentivo surge com a preocupação de encontrar melhores alternativas com menos efeitos colaterais, em comparação com a cisplatina. Esta apresenta inconvenientes comuns como baixa especificidade, aplicação restrita a um espectro limitado de tumores, evidências de toxicidade (nefrotoxicidade, ototoxicidade e neurotoxicidade) e indução de resistência à replicação do DNA (GHOBADI et al., 2018).

É por isso que o design racional e a síntese de novas drogas anticancerígenas, contendo uma variedade de ligantes e de metais, tem considerável importância. Darão à luz a uma molécula com mais especificidade e com mínimo de reações indesejadas, resultando assim em um aumento da taxa de recuperação e da qualidade de vida de pacientes em tratamento (MA et al., 2020).

São características importantes aos fármacos antitumorais, interagirem com o DNA, causando sua clivagem e consequente paralisação do ciclo celular. E serem seletivos quanto ao seu alvo, com objetivo de atingirem as células tumorais em detrimento das células normais, o que diminui os efeitos colaterais (ABADI et al., 2022).

5.1 *Docking* molecular

5.1.1 Metalocomplexos

Como foi apresentado, as moléculas estudadas demonstraram na docagem molecular, capacidade de se ligar a fita simples e dupla do DNA. Se ligando ao sulco menor ou por intercalação, interagindo com suas bases nitrogenadas ou ainda pentoses ou grupos fosfato, por ligações de hidrogênio e outras interações fracas. As propriedades de intercalação dos compostos R06 de paládio e R20 de

platina são endossadas por recentes publicações na literatura conforme pode ser visto na Tabela 4.

A ligação ao sulco menor, pelos demais complexos, de cobre, níquel e platina é constantemente resultado de publicações o que corrobora com os resultados encontrados (FIGUEROA-DEPAZ et al., 2022b; GABR; PIGGE, 2018; KARGAR et al., 2021; KHANDAR et al., 2020).

Tabela 4 – Tabela demonstrativa de publicações recentes de complexos a base de platina e paládio com modo de ligação por intercalação.

Metalocomplexos de platina e paládio que se ligam ao DNA por intercalação	
Autores	Complexos
ZIANNA et al., 2019	[Pd(3-OCH ₃ -salol) ₂]
	[Pd(5-NO ₂ -salol) ₂]
	[Pd(5-Cl-salol) ₂]
	[Pd(5- Br-salol) ₂]
FEIZI-DEHNAYEBI; DEHGHANIAN; MANSOURI-TORSHIZI, 2021	[Pd(phen)(acac)]NO ₃
KARAMI et al., 2020	<i>trans</i> -Pd(C ₁₅ H ₁₀ NOCH ₃) ₂ (OAc) ₂
	<i>cis</i> -Pd(C ₁₅ H ₁₀ NOCH ₃)(Py) ₂ (OAc)(OAc)
AYYANNAN et al., 2020	[PdCl ₂ (PPh ₃) ₂]
	[PdCl ₂ (AsPh ₃) ₂]
GUO et al., 2019	<i>cis</i> -[Pt(NP)(NH ₃) ₂ Cl]NO ₃
OSAWA et al., 2019	BPy-Pt
	p(PEGMA - co -BPyMA-Pt
SHI et al., 2021	<i>t,t,t</i> -[Pt(py) ₂ (N ₃) ₂ (OH)(gly-R-Nap)]
(ZHANG; YAM, 2020)	(2,6-bis(benzimidazol-2'-il)piridina)platina(II) [Pt(bzimpy)Cl] ⁺

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

5.1.2 *Docking* molecular do CBP01

Compreender as interações eletrostáticas se mostra como uma ferramenta poderosa no projeto de complexos terapêuticos otimizados. O uso *docking* molecular faz compreender melhor a idealização de fármacos, uma vez que possibilita a compreensão dos adutos formados entre o complexo utilizado e sua molécula alvo (BAYRAKTEPE, 2020).

O desenho de fármacos assistido por computador, foi criado a partir da necessidade de armazenar, gerenciar e analisar dados disponibilizados em bancos de dados sobre novos fármacos, construídos a partir do conhecimento da estrutura e propriedades das moléculas (ABDEL-RAHMAN et al., 2018).

O ensaio *in silico* foi utilizado para verificar o mecanismo de interação entre o complexo CBP01 e sua molécula alvo, o DNA. O ensaio possibilita avaliar a melhor conformação entre o ligante e a molécula alvo por meio de uma classificação quanto a quantidade de energia. Quanto menor a energia livre de ligação estimada para formar essa ligação mais estável e propícia ela será (KHAN et al., 2017).

O valor estimado de menor energia livre de ligação para a interação do CBP01 e sua molécula alvo, o DNA, foi de $-7,61$, o que a coloca na posição de favorável para acontecer. O complexo ainda apresentou interações com a molécula de DNA na forma de ligações de hidrogênio com suas bases nitrogenadas localizadas no sulco menor. Como o composto apresentou a capacidade de clivar o DNA na presença de peróxido de hidrogênio, e grande a possibilidade de acontecer por meio do sulco menor.

A interação observada entre complexos de Cobre(II) e os sulcos do DNA corrobora com descobertas já publicadas (SHAHABADI et al., 2019), as quais descrevem interações principalmente com o sulco menor (CHAKRABORTY et al., 2019; ERXLEBEN, 2018; MOLINARO et al., 2020; ZHANG et al., 2020), sendo que em outras publicações um dos ligantes também é a fenantrolina (MOLPHY et al., 2018).

5.2 Citotoxicidade e IS

5.2.1 Metalocomplexos

No que diz respeito a citotoxicidade, com exceção dos complexos R06, R17 e R18 que precisam de outros testes em dosagens maiores, todos apresentaram boa atividade frente as linhagens tumorais. Os IC₅₀ são endossados por outras publicações como em Lopes et al. (2020), onde o valor do IC₅₀ do complexo apresentado, [Cu(dox)(phen)]²⁺, foi de 13,3 e como Machado et al. (2021), no qual o complexo [Cu(4-fh)(phen)(ClO₄)₂], apresentou um IC₅₀ no valor de 4,16. No entanto, não apresentaram boa seletividade, o que impossibilita que as moléculas com sua conformação atual sejam empregadas para o tratamento de tumores. Uma vez que não apresentaram uma das características principais para os fármacos antitumorais (TELES et al., 2020).

Mas o que a princípio pode ser considerado um resultado ruim, por outro lado, possibilita estudos posteriores para o design de novos fármacos antineoplásicos. Uma vez que, apresentando atividade antitumoral e um mecanismo de interação com DNA conhecido, a substituição dos ligantes ao redor do centro metálico, prioriza uma busca racional e investigativa de sua atividade. Isso pode ser um direcionamento necessário para atingir a constituição de uma molécula que apresente todas as características almejadas para ser candidata ao tratamento do câncer (GAO et al., 2021; SIMPSON et al., 2019; ZOU et al., 2018).

5.2.2 CBP01 e NLC/CBP01

A cisplatina foi um marco para os quimioterápicos baseados em metais de transição. As suas limitações como reações adversas e efeitos colaterais são bem conhecidos, assim como sua eficácia no tratamento à diversos tipos de câncer (ALDOSSARY, 2019). Embora haja resistência das células cancerosas aos tratamentos com cisplatina e outros medicamentos, essa limitação se tornou importante para impulsionar a busca por novos compostos alternativos e que alcancem seu alvo de forma mais específica.

Visando o tratamento antitumoral, o complexo NLC/CBP01 se apresenta como uma alternativa mais específica, podendo apresentar efeitos indesejados de forma mais branda, fato fundamentado devido ao alto índice de seletividade encontrado em sua nanoformulação. O complexo em questão em sua forma sem formulação foi alvo de estudos publicados por POLLONI et al., (2019), onde foi avaliado seu efeito citotóxico, a sua capacidade de clivar o DNA e indução de morte celular programada por meio de geração de espécies reativas de oxigênio.

POLLONI et al., (2019), o complexo apresentou um valor de IC_{50} em linhagens de células TG-180 de 7,4 e agora obteve-se que o complexo nanoformulado apresentou 7,202. O que não é uma mudança muito significativa, no entanto, demonstra que o ativo não perdeu sua atividade sob nanoformulação, o que diz muito sob a estabilidade NLC/CBP01. Nas células normais correspondentes, C2C12, no estudo anterior apresentou um valor de IC_{50} de 26,4 e frente ao valor de 20,18 do estudo atual. Sendo uma diminuição no seu IS, mas que ainda se apresenta em um valor considerado de alta seletividade, 2,8 (CUTHBERT et al., 2018; SONG et al., 2019).

Ainda foi considerado a citotoxicidade da nanoformulação de forma isolada, NLC, que apresentou IC_{50} para a linhagem tumoral e não tumoral de 69,09 e 43,39 respectivamente. Valores esses além da janela de atividade do NLC/CBP01, justificando uma não interferência do incipiente frente ao ativo (PATIL; DESHPANDE, 2018).

O presente complexo formulado possui um alto potencial citotóxico na linhagem, uma vez que apresenta baixo IC_{50} e maior seletividade quando comparado a células normais. O que o torna um promissor candidato a quimioterápico. Recentemente o sistema de delivery de drogas baseados em nanocarreadores tem despertado interesse no meio científico, pois busca uma melhor entrega do ativo frente a célula alvo (MEYLINA et al., 2021).

5.3 Caracterização estrutural e estabilidade físico-química das formulações de NLC e NLC/CBP01

A complexidade dos sistemas nano coloidais se dá, por sua composição que é baseada em duas fases imiscíveis entre si e por sua elevada energia cinética,

esta responsável por administrar a organização das partículas dispersas, além de manter sua função biológica (HIEMENZ & RAJAGOPALAN, 2016).

Os excipientes usados na formulação NLC, por serem biocompatíveis são largamente empregados no preparo de formulações injetáveis (ALBANO et al., 2019; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Utilizadas na via intravenosa, as nanopartículas podem apresentar 100% de biodisponibilidade, podendo interagir com proteínas plasmáticas, podem ativar células T no sistema imune ou mesmo apresentar potenciais riscos, entre eles formações de trombos (FAN et al., 2020).

As formulações de NLC devem estar dentro dos padrões de mínimos e de máximos, daquelas designadas à administração intravenosa (IV). Como propriedades de tamanho, que não deve exceder a 250 nm e distribuição de partículas médio homogênea, $PDI \leq 0.2$ (HOSHYAR et al., 2016). O complexo NLC/CBP01 apresentou-se dentro destes padrões, 248,3 e 0,163 respectivamente.

A presença do ativo, CBP01, não resultou em aumento de tamanho ou da heterogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas. Sugerindo assim, uma boa compatibilidade entre a matriz e o ativo.

Por outro lado, a presença do ativo foi responsável pelo aumento e melhora da estabilidade da formulação. Sugerindo que esteja havendo alguma interação entre o ativo, CBP01 e a matriz, NLC.

A maioria dos coloides tem como característica adquirir carga elétrica de superfície quando estão dispersos em um líquido. O potencial Zeta, representa o potencial eletrocinético das partículas suspensas da resultante entre as cargas elétricas da superfície e da camada de hidratação. Seus valores ajudam a analisar a estabilidade de nano coloides (BHATTACHARJEE, 2016).

É procedimento técnico regulamentado na indústria e no meio acadêmico que o acompanhamento do tamanho (nm), da distribuição de tamanho das partículas (PDI) e do potencial Zeta (mV) ao longo do tempo, e sob condições padronizadas, garantem o tempo de estabilidade de formulações. Conforme pode ser visto na RDC nº 29 de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Conferência Internacional de Harmonização de Técnicas (ICH) EXPERT WORKING GROUP de 2003.

Conforme os padrões estruturais avaliados, a formulação NLC/CBP01 apresentou boa compatibilidade entre os excipientes e o ativo, com tempo de

prateleira de até 6 meses, a 25 °C, demonstrando boa estabilidade estrutural e físico-química. Testes biológicos posteriores verificarão que os excipientes usados são biocompatíveis e seguros para serem administrados em todas as vias, inclusive a intravenosa.

5.4 Ensaio de clivagem de DNA por eletroforese

Tratamentos do plasmídeo com diferentes concentrações do complexo NLC/CBP01 mostrou a capacidade deste composto de clivar DNA, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O complexo foi capaz de induzir cortes na dupla fita do DNA, produzindo assim a forma linear do plasmídeo em comparação ao controle positivo, tratado com a enzima de restrição Nhe I.

Foi observado em gel de agarose que a presença de H_2O_2 induz a formação de bandas das formas circular e linear, onde acontecem a quebra da fita simples e dupla especificamente, o que diverge do controle tratado com sendo que todas as bandas divergiram estatisticamente do controle tratado apenas com 15 mM de H_2O_2 .

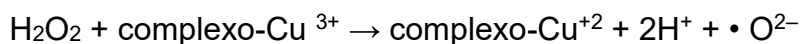
Ficou evidente também que o DMSO, conhecido por ser um sequestrador de espécies reativas de oxigênio, reduz a quantidade de quebras de DNA como acontece na publicação de (ŞENEL et al., 2019), que identificou na adição de DMSO um sequestro dos radicais hidroxila reduzindo assim a atividade clivante de seu complexo.

JOMOVA et al., (2022), usando um complexo com o metal de transição cobre(II), identificou que a maioria dos complexos metálicos necessita de um agente externo para reduzir quebras de DNA. SIMUNKOVA et al., (2021), também observaram que complexos de Cu(II) podem degradar o plasmídeo PBSK por meio de clivagem oxidativa na presença de H_2O_2 induzindo a formação de espécies radicais hidroxila.

Segundo esses autores, reações do tipo Fenton pode explicar esse mecanismo de oxidação pela formação de radicais hidroxila. Também, foi observado que o uso de DMSO como no estudo anterior inibe a atividade de clivagem do DNA. Os radicais hidroxila são responsáveis pela quebra da fita de

DNA. As reações a seguir explicam como os complexos de cobre(II) induzem a formação de radicais (SIMUNKOVA et al., 2021):

Reação do tipo Fenton



5.5 Ensaio de autofagia

Para verificar se o NLC/CBP01 era capaz de induzir a via autofágica foi realizado a marcação por monodansilcadaverina, que permite a coloração dos vacúolos autofágicos para visualização em microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos mostraram que na concentração de 10 μM o complexo é capaz de induzir processo autofágico em células de sarcoma 180, provavelmente devido à produção de ROS, mecanismo que deve ser melhor elucidado em futuros estudos.

Estudos em células humanas de câncer de mama relatam que nanopartículas de complexos a base de cobre apresentam a capacidade de induzir a via autofágica e posteriormente apoptose, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo (LAHA et al., 2014). Esse processo é marcado pela vacuolização expressiva, pois substratos intracelulares serão entregues por lisossomos para degradação e posterior reciclagem de cadeias carbônicas para formação de macromoléculas (AMEH & SAYES, 2019; JIANG et al., 2019; LI & JU, 2018; VAID et al., 2020).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no *docking* molecular e no screening de citotoxicidade, chegou-se ao consenso que os complexos de metais de transição analisados apresentaram boa atividade, no entanto, não são seletivos à suas células alvo. Percalço esse, que pode ocasionar muitos efeitos adversos provenientes de seu uso.

Sua atividade pode ser levantada pela hipótese elucidada pelo *docking* molecular, que mostrou facilidade nas interações com a molécula de DNA, principalmente pela afinidade aos sulcos menores ou mesmo como intercalantes.

Complexos de metais de transição, têm sido utilizados para uma gama de enfermidades, e cabe a estudos futuros apresentar questionamentos sobre esse uso. O presente estudo fornece dados para projetos futuros de design de metalocomplexos a partir dos dados apresentados.

Com os resultados apresentados pelo complexo formulado NLC/CBP01, pode-se dizer que a formulação se mantém estável e não ocorre perda de atividade. A formulação apresentou citotoxicidade semelhante ao CBP01 não formulado, e índice de seletividade em valor aceito para os padrões de uso em complexos antitumorais.

As análises *in silico* demonstraram que o CBP01 possui alta capacidade de ligação ao DNA, com provável afinidade pelo sulco menor, assim como outros compostos apresentados com base em metais de transição, principalmente o cobre. O estudo *in vitro* mostrou que o CBP01 é capaz de induzir a clivagem simples e dupla de DNA quando na presença de peróxido, provavelmente por meio da reação de Fenton, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que deverá ser investigado por estudos futuros.

A via autofágica é disparada, o que foi evidenciado pela presença dos vacúolos autofágicos, cuja disfunção pode levar a morte celular programada, o que poderá ser elucidado por ensaios de apoptose e análises de expressão gênica.

Elucidados esses mecanismos, o complexo NLC/CBP01 se apresenta como um bom candidato como fármaco antitumoral, sendo necessários estudos *in vivo* que demonstrem a eficiência e segurança da formulação NLC/CBP01 no âmbito sistêmico.

REFERÊNCIAS

ABADI, A. J. et al. Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 189–213, 25 jan. 2022.

<https://doi.org/10.1002/ptr.7305>

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 agents. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 12, p. e4527, dez. 2018.

<https://doi.org/10.1002/aoc.4527>

AHMED, A. A. et al. Epigenetic events in male common urogenital organs cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 3, n. 4, p. 104–112, dez. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2016.06.004>

AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Dacarbazine. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 41, p. 323–377, 1 jan. 2016.

<https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.12.002>

ALBANO, J. M. R. et al. Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 56–64, mar. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.077>

ALBERTO, L.-C. A. et al. Antimicrobial effect of Casiopeinas® copper- and ruthenium-based compounds on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *in vitro* cell viability onto osteoblasts cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 179–184, 5 mar. 2022.

<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00648-3>

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artes Médica, 2017.

ALDOSSARY, S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 07–15, 28 mar. 2019.

<https://doi.org/10.13005/bpj/1608>

ALMEIDA, J. DO C. et al. Copper(II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v. 89, p. 1–8, mar. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.12.026>

AMEH, T.; SAYES, C. M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, p. 103220, out. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>

ANTHONY, E. J. et al. Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. **Chemical Science**, v. 11, n. 48, p. 12888–12917, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>

AYYANNAN, G. et al. New Palladium(II) complexes with ONO chelated hydrazone ligand: Synthesis, characterization, DNA/BSA interaction, antioxidant and cytotoxicity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 512, p. 119868, 1 nov. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119868>

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer research**, v. 29, n. 8, p. 2993–6, ago. 2009.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>

BAYRAKTEPE, D. E. A voltammetric study on drug-DNA interactions: Kinetic and thermodynamic aspects of the relations between the anticancer agent dasatinib and ds-DNA using a pencil lead graphite electrode. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 104946, set. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104946>

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

BORGES, A. et al. Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 998, 15 out. 2020.

<https://doi.org/10.3390/antiox9100998>

BOROS, E.; DYSON, P. J.; GASSER, G. Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. **Chem**, v. 6, n. 1, p. 41–60, jan. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.10.013>

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **Chemotherapy of neoplastic disease: bleomycin. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9ª ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996.

CHAKRABORTY, A. et al. DNA minor groove binding of a well known anti-mycobacterial drug dapson: A spectroscopic, viscometric and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 665, p. 107–113, abr. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.001>

CHAN, F. C. et al. Prognostic Model to Predict Post-Autologous Stem-Cell Transplantation Outcomes in Classical Hodgkin Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 32, p. 3722–3733, 10 nov. 2017.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7925>

CHAUHAN, I. et al. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 150–165, 18 fev. 2020.

<https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>

CHIN, V. et al. Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 20 mar. 2018.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011044.pub2>

CRAMPON, K. et al. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 151–164, 1 jan. 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>

CUTHBERT, T. J. et al. Surprising Antibacterial Activity and Selectivity of Hydrophilic Polyphosphoniums Featuring Sugar and Hydroxy Substituents. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 39, p. 12707–12710, 24 set. 2018.

<https://doi.org/10.1002/anie.201806412>

DAI, Z. et al. The role of microbiota in the development of colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 8, p. 2032–2041, 15 out. 2019.

<https://doi.org/10.1002/ijc.32017>

DELGADO, J. L. et al. Topoisomerases as anticancer targets. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 2, p. 373–398, 31 jan. 2018.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20160583>

DUDUKALOV, E. V.; IMTIAZ SUBHANI, M.; USHAKOV, D. Cross Docking as a factor of Distribution Efficiencies Improving in conditions of Governance Digitalization. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 918, n. 1, p. 012188, 1 set. 2020.

<https://doi.org/10.1088/1757-899X/918/1/012188>

EBERHARDT, J. et al. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 23 ago. 2021.

<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>

EL-SHAFAI, N. M. et al. Effect of a Novel Hybrid Nanocomposite of Cisplatin–Chitosan on Induced Tissue Injury as a Suggested Drug by Reducing Cisplatin Side Effects. **Biological Trace Element Research**, 31 out. 2021.

<https://doi.org/10.1007/s12011-021-02994-7>

ERXLEBEN, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 92–121, abr. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.008>

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 13 nov. 2018.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>

FAN, J. et al. Quantum Dots Elicit Hepatotoxicity through Lysosome-Dependent Autophagy Activation and Reactive Oxygen Species Production. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1418–1427, 9 abr. 2018.

<https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>

FAN, J.; FU, A.; ZHANG LE. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 4 jun. 2019.

<https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>

FAN, W. et al. Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 586, p. 119551, ago. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119551>

FARINHA, P. et al. Nanomedicines in the treatment of colon cancer: a focus on metallodrugs. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 1, p. 49–66, 22 jan. 2022.

<https://doi.org/10.1007/s13346-021-00916-7>

FEIZI-DEHNAYEBI, M.; DEHGHANIAN, E.; MANSOURI-TORSHIZI, H. A novel palladium(II) antitumor agent: Synthesis, characterization, DFT perspective, CT-DNA and BSA interaction studies via in-vitro and in-silico approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 249, p. 119215, 15 mar. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119215>

FERNANDO, I. P. S. et al. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 391, p. 123823, jul. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123823>

FIGUEROA-DEPAZ, Y. et al. DNA, a target of mixed chelate copper(II) compounds (Casiopéinas®) studied by electrophoresis, UV–vis and circular dichroism techniques. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 231, p. 111772, jun. 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111772>

FRANCO MACHADO, J.; MORAIS, T. S. Are smart delivery systems the solution to overcome the lack of selectivity of current metallodrugs in cancer therapy? **Dalton Transactions**, v. 51, n. 7, p. 2593–2609, 2022.

<https://doi.org/10.1039/D1DT04079K>

GABR, M. T.; PIGGE, F. C. Platinum(II) Complexes with Sterically Expansive Tetraarylethylene Ligands as Probes for Mismatched DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 12641–12649, 15 out. 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01782>

GALCZYNSKA, K. et al. Experimental and Theoretical Analysis of Metal Complex Diffusion through Cell Monolayer. **Entropy**, v. 23, n. 3, p. 360, 17 mar. 2021.

<https://doi.org/10.3390/e23030360>

GAO, P. et al. Antitumor Agents Based on Metal–Organic Frameworks. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 31, p. 16763–16776, 26 jul. 2021.

<https://doi.org/10.1002/anie.202102574>

GARTNER, T. E.; JAYARAMAN, A. Modeling and Simulations of Polymers: A Roadmap. **Macromolecules**, v. 52, n. 3, p. 755–786, 12 fev. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01836>

GHOBADI, R. et al. How a promising anti-cancer derivative of palladium consisting phen-imidazole ligand affects bovine liver catalase functionality. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 364, p. 288–296, set. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.026>

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, jul. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>

GONG, P. et al. Ultrasensitive Ultrasound Microvessel Imaging for Characterizing Benign and Malignant Breast Tumors. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 45, n. 12, p. 3128–3136, 1 dez. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.08.009>

GOODMAN, L. S. et al. NITROGEN MUSTARD THERAPY. **Journal of the American Medical Association**, v. 132, n. 3, p. 126, 21 set. 1946.

<https://doi.org/10.1001/jama.1946.02870380008004>

GRILC, N. K.; SOVA, M.; KRISTL, J. Drug Delivery Strategies for Curcumin and Other Natural Nrf2 Modulators of Oxidative Stress-Related Diseases. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2137, 12 dez. 2021.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122137>

GRODZINSKI, P. et al. Integrating Nanotechnology into Cancer Care. **ACS Nano**, v. 13, n. 7, p. 7370–7376, 23 jul. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04266>

GÜNGÖR, S. A. et al. Structural characterization, DNA binding properties and molecular docking studies of imine compounds derived from Disperse black 9. **Journal of Molecular Structure**, v. 1243, p. 130776, nov. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130776>

GUO, Y. et al. Enhancing Cytotoxicity of a Monofunctional Platinum Complex via a Dual-DNA-Damage Approach. **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 13150–13160, 7 out. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02033>

HAIDER, M. et al. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 288, 23 mar. 2020.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030288>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANIF, M.; HARTINGER, C. G. Anticancer metallodrugs: where is the next cisplatin? **Future medicinal chemistry**, v. 10, n. 6, p. 615–617, 2018.

<https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0317>

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry, Revised and Expanded**. [s.l.] CRC Press, 2016.

<https://doi.org/10.1201/9781315274287>

HOCEK, M. Enzymatic Synthesis of Base-Functionalized Nucleic Acids for Sensing, Cross-linking, and Modulation of Protein–DNA Binding and Transcription. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 6, p. 1730–1737, 18 jun. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00195>

HOSHYAR, N. et al. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 673–692, mar. 2016.

<https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA ed. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

JANSON, G.; PAIARDINI, A. PyMod 3: a complete suite for structural bioinformatics in PyMOL. **Bioinformatics**, v. 37, n. 10, p. 1471–1472, 16 jun. 2021.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa849>

JIANG, Y.-W. et al. Copper Oxide Nanoparticles Induce Enhanced Radiosensitizing Effect via Destructive Autophagy. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 3, p. 1569–1579, 11 mar. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01181>

JIN, X. et al. Star polymer-based unimolecular micelles and their application in bio-imaging and diagnosis. **Biomaterials**, v. 178, p. 738–750, set. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.051>

JOMOVA, K. et al. The effect of Luteolin on DNA damage mediated by a copper catalyzed Fenton reaction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 226, p. 111635, jan. 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111635>

JORDE L. B.; CAREY J. C.; BAMSHAD M. J. **Genética Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2017.

KARAMI, K. et al. Novel fluorescence palladium-alkoxime complexes: Synthesis, characterization, DNA/BSA spectroscopic and docking studies, evaluation of cytotoxicity and DNA cleavage mechanism. **Journal of Molecular Structure**, v. 1206, p. 127595, 15 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127595>

KARGAR, H. et al. Synthesis, characterization, crystal structures, DFT, TD-DFT, molecular docking and DNA binding studies of novel copper(II) and zinc(II) complexes bearing halogenated bidentate N,O-donor Schiff base ligands. **Polyhedron**, v. 195, p. 114988, fev. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114988>

KARGES, J.; STOKES, R. W.; COHEN, S. M. Metal complexes for therapeutic applications. **Trends in Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 523–534, 1 jul. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.trechm.2021.03.006>

KASHYAP, A. K.; DUBEY, S. K. Molecular mechanisms in cancer development. **Understanding Cancer**, p. 79–90, 1 jan. 2022.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99883-3.00016-0>

KESSEL, D. Photodynamic Therapy: A Brief History. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1581, 2 out. 2019.

<https://doi.org/10.3390/jcm8101581>

KHAN, S. et al. Synthesis of novel coumarin nucleus-based DPA drug-like molecular entity: In vitro DNA/Cu(II) binding, DNA cleavage and pro-oxidant mechanism for anticancer action. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0181783, 1 ago. 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181783>

KHAN, S.; ZAFAR, A.; NASEEM, I. Copper-redox cycling by coumarin-di(2-picolyl)amine hybrid molecule leads to ROS-mediated DNA damage and apoptosis: A mechanism for cancer chemoprevention. **Chemico-Biological Interactions**, v. 290, p. 64–76, jun. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.05.010>

KHANDAR, A. A. et al. Antimicrobial, cytotoxicity, molecular modeling and DNA cleavage/binding studies of zinc-naproxen complex: switching DNA binding mode of naproxen by coordination to zinc ion. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–13, 4 dez. 2020.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1854858>

KHEIRDOOSH, F. et al. Multi-spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of neotame with calf thymus DNA. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 39, n. 5, p. 699–714, 3 maio 2020.

<https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1680999>

KONG, R. et al. CoDockPP: A Multistage Approach for Global and Site-Specific Protein–Protein Docking. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 8, p. 3556–3564, 26 ago. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00445>

KONTOMANOLIS, E. N. et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 27 nov. 2020.

<https://doi.org/10.21873/anticanres.14622>

LAHA, D. et al. Interplay between autophagy and apoptosis mediated by copper oxide nanoparticles in human breast cancer cells MCF7. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 1–9, jan. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.011>

LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 640–653, fev. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>

LI, Y.; JU, D. The Role of Autophagy in Nanoparticles-Induced Toxicity and Its Related Cellular and Molecular Mechanisms. In: [s.l: s.n.]. p. 71–84.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_5

LOPES, J. C. et al. In vitro and in vivo antitumoral activity of a ternary copper (II) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 4, p. 1021–1026, dez. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.104>

LOW, L. E. et al. Tumor-responsive dynamic nanoassemblies for targeted imaging, therapy and microenvironment manipulation. **Journal of Controlled Release**, v. 324, p. 69–103, 10 ago. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.014>

LU, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 15 jun. 2019.

<https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>

MA, Z. et al. TEMPO in metal complex catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 423, p. 213482, nov. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213482>

MACHADO, P. H. A. et al. A selective CuII complex with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phenanthroline displays DNA-cleaving and pro-apoptotic properties in cancer cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 24450, 27 dez. 2021.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03909-1>

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 53, n. 2, p. 148–158, 28 mar. 2019.

<https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>

MARTÍN GIMENÉS, V. M. et al. Metal ion homeostasis with emphasis on zinc and copper: Potential crucial link to explain the non-classical antioxidative properties of vitamin D and melatonin. **Life Sciences**, v. 281, p. 119770, set. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119770>

MARTIN, J. D. et al. Improving cancer immunotherapy using nanomedicines: progress, opportunities and challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 4, p. 251–266, 7 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41571-019-0308-z>

MCGIVEM, T. J. P.; AFSHARPOUR, S.; MARMION, C. J. Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: From Sigman's reagent to next generation anti-cancer agent? **Inorganica Chimica Acta**, v. 472, p. 12–39, mar. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.08.043>

MEYLINA, L. et al. Nanoformulations of α -Mangostin for Cancer Drug Delivery System. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 1993, 24 nov. 2021.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121993>

MEZZAROBBA, L. et al. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. **NeuroToxicology**, v. 74, p. 230–241, set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.07.007>

MISHRA, V. et al. Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 191, 18 out. 2018.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040191>

MOLINARO, C. et al. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2863, 5 out. 2020.

<https://doi.org/10.3390/cancers12102863>

MOLPHY, Z. et al. A phosphate-targeted dinuclear Cu(II) complex combining major groove binding and oxidative DNA cleavage. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 19, p. 9918–9931, 2 nov. 2018.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky806>

MUKHERJEE, S. **O Imperador de todos os males: Uma biografia do câncer**. 1ª ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2012. v. 1

NEHA DESAI et al. Metallic nanoparticles as drug delivery system for the treatment of cancer. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 18, n. 9, p. 1261–1290, 2 set. 2021.

<https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1912008>

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER T. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NIGAM, A. et al. Assigning confidence to molecular property prediction. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 1009–1023, 2 set. 2021.

<https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1925247>

O'BRIEN, K. et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 585–606, 26 out. 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>

OGINO, M. H.; TADI, P. **Cyclophosphamide**. [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA, N. F. P. DE et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493–499, 31 dez. 2010.

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2010v56n4.698>

OSAWA, S. et al. Increase in the apparent intercalation ability of a platinum complex *via* multivalency by installation into the sidechain of a graft copolymer and observation of structural changes in the intercalated DNA. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26429–26434, 2019.

<https://doi.org/10.1039/C9RA03485D>

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, p. 138–146, jul. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PAIXÃO, D. A. et al. Crystal structure, anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 119164, jan. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

PATIL, T. S.; DESHPANDE, A. S. Nanostructured lipid carriers-based drug delivery for treating various lung diseases: A State-of-the-Art Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 209–225, ago. 2018.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.80233>

PEDROSA, P. et al. Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment? In: **Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry**. [s.l.] IntechOpen, 2018.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.80233>

PHILIP, M.; SCHIETINGER, A. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer. **Nature Reviews Immunology**, 12 jul. 2021.

<https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20184331>

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, abr. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 6 dez. 2019.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>

REJHOVÁ, A. et al. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 582–594, jan. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>

RIBEIRO, L. N. DE M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 982, 17 dez. 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18573-7>

RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 253–263, ago. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.066>

ROMA-RODRIGUES, C. et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 840, 15 fev. 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20040840>

ROSELL, M.; FERNÁNDEZ-RECIO, J. Docking approaches for modeling multi-molecular assemblies. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 64, p. 59–65, out. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.016>

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1 fev. 1965.

<https://doi.org/10.1038/205698a0>

RUDRAPAL, M.; CHETIA, D. Virtual Screening, Molecular Docking and QSAR Studies in Drug Discovery and Development Programme. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 225–233, 15 jul. 2020.

<https://doi.org/10.22270/jddt.v10i4.4218>

SAIKIA, S.; BORDOLOI, M. Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 5, p. 501–521, 5 mar. 2019.

<https://doi.org/10.2174/1389450119666181022153016>

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 22 ago. 2018.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>

SCHAWALLER, P. et al. Molecular Transformer: A Model for Uncertainty-Calibrated Chemical Reaction Prediction. **ACS Central Science**, v. 5, n. 9, p. 1572–1583, 25 set. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00576>

ŞENEL, P. et al. Methyl substituent effect on one-dimensional copper(II) coordination polymers containing biologically active ligands: Synthesis, characterization, DNA interactions and cytotoxicities. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 10, 24 out. 2019.

<https://doi.org/10.1002/aoc.5122>

SENSI, S. L. et al. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 12, p. 1049–1063, dez. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.001>

SHAHABADI, N. et al. DNA-binding studies of a new Cu(II) complex containing reverse transcriptase inhibitor and anti-HIV drug zalcitabine. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 1957–1972, 18 jun. 2019.

<https://doi.org/10.1080/00958972.2019.1620216>

SHI, H. et al. DNA-Intercalative Platinum Anticancer Complexes Photoactivated by Visible Light. **Chemistry – A European Journal**, v. 27, n. 41, p. 10711–10716, 21 jul. 2021.

<https://doi.org/10.1002/chem.202101168>

SHI, J. H. et al. Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: Spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, n. PB, p. 443–450, 5 fev. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.056>

SIMPSON, P. V et al. Metal-based antitumor compounds: beyond cisplatin. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 119–135, jan. 2019.

<https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0248>

SIMUNKOVA, M. et al. Antioxidant vs. Prooxidant Properties of the Flavonoid, Kaempferol, in the Presence of Cu(II) Ions: A ROS-Scavenging Activity, Fenton Reaction and DNA Damage Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1619, 5 fev. 2021.

<https://doi.org/10.3390/ijms22041619>

SINGHAVI, H. et al. Tobacco carcinogen research to aid understanding of cancer risk and influence policy. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 3, n. 5, p. 372–376, 3 out. 2018.

<https://doi.org/10.1002/lio2.204>

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2017.

SONG, H. et al. Discovery of selective, antimetastatic and anti-cancer stem cell metallohelices *via* post-assembly modification. **Chemical Science**, v. 10, n. 37, p. 8547–8557, 2019.

<https://doi.org/10.1039/C9SC02651G>

SOUS, D. et al. Cutaneous reactions to pediatric cancer treatment: Part I. Conventional chemotherapy. **Pediatric Dermatology**, v. 38, n. 1, p. 8–17, 10 jan. 2021.

<https://doi.org/10.1111/pde.14418>

SOUSA, F. L. DE et al. Hipossalivação em pacientes oncológicos sob tratamento quimio e radioterápica na fundação centro de controle de oncologia do estado do Amazonas (FCECON)/ hyposalivation in oncological patients under chemical and radiotherapy treatment at the Amazonas state oncology control center foundation (FCECON). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 15971–15981, 2021.

<https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-291>

SOUZA, B. I. C. C. DE; SILVA, M. M. DA. Occlusions in peripherally inserted central venous catheters in pediatric patients in antineoplastic chemotherapy. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 42, 2021.

<https://doi.org/10.1590/1983-1447.2021.20190495>

SPRATT, D. E. et al. A Systematic Review and Framework for the Use of Hormone Therapy with Salvage Radiation Therapy for Recurrent Prostate Cancer. **European Urology**, v. 73, n. 2, p. 156–165, fev. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.06.027>

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer - IARC, 2014.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

<https://doi.org/10.3322/caac.21660>

SZYMCZYK, A. et al. <p>Assessment of microRNA expression in leukemic cells as predictors of sensitivity to purine nucleoside analogs, fludarabine and cladribine, in chronic lymphocytic leukemia patients</p>. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 5021–5031, maio 2019.

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S191311>

TAO, X. et al. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 33–45, 6 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>

TARZIA, ANDREW.; JELFS, K. E. Unlocking the computational design of metal–organic cages. **Chemical Communications**, v. 58, n. 23, p. 3717–3730, 2022.

<https://doi.org/10.1039/D2CC00532H>

TCHOUNWOU, P. B. et al. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. **Journal of experimental pharmacology**, v. 13, p. 303–328, 2021.

<https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>

TEKADE, A. R.; MITTHA, P. S.; PISAL, C. S. Nanostructured Lipid Carriers for Nose to Brain Delivery Targeting CNS: Diversified Role of Liquid Lipids for Synergistic Action. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 4 out. 2021.

<https://doi.org/10.34172/apb.2022.078>

TELES, A. M. et al. Marine-Derived Penicillium purpurogenum Reduces Tumor Size and Ameliorates Inflammation in an Erlich Mice Model. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 541, 29 out. 2020.

<https://doi.org/10.3390/md18110541>

THOMPSON, K. H.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2561–2572, 8 set. 1999.

<https://doi.org/10.1021/cr980427c>

TRENNER, A.; SARTORI, A. A. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 10 dez. 2019.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01388>

VAID, P. et al. Biogenic silver, gold and copper nanoparticles - A sustainable green chemistry approach for cancer therapy. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 16, p. 100247, jun. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100247>

WILLIAMS, E. D. et al. Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 12, p. 716–732, 30 dez. 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>

ZAKIRYANOVA, G. K.; WHEELER, S.; SHURIN, M. R. ImmunoTargets and Therapy Dovepress Oncogenes in immune cells as potential therapeutic targets. p. 7–21, 2018.

<https://doi.org/10.2147/ITT.S150586>

ZHANG, D.; KANAKKANTHARA, A. Beyond the Paclitaxel and Vinca Alkaloids: Next Generation of Plant-Derived Microtubule-Targeting Agents with Potential Anticancer Activity. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1721, 29 jun. 2020.

<https://doi.org/10.3390/cancers12071721>

ZHANG, K.; YAM, V. W.-W. Platinum(<scp>ii</scp>) non-covalent crosslinkers for supramolecular DNA hydrogels. **Chemical Science**, v. 11, n. 12, p. 3241–3249, 2020.

<https://doi.org/10.1039/C9SC05910E>

ZHANG, Q. et al. Copper (II) complexes modified with water-soluble porphyrin and various small molecules ligand for DNA binding and potential selectivity antitumor agents. **Dyes and Pigments**, v. 173, p. 107923, fev. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107923>

ZHANG, Y. et al. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 137, 17 dez. 2019.

<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>

ZIANNA, A. et al. Palladium(II) complexes with salicylaldehyde ligands: Synthesis, characterization, structure, in vitro and in silico study of the interaction with calf-thymus DNA and albumins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 194, p. 85–96, 1 maio 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.02.013>

ZOU, T. et al. Anticancer metal-N-heterocyclic carbene complexes of gold, platinum and palladium. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 43, p. 30–36, abr. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.014>