

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA  
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**Felipe Alves de Oliveira Pires**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DE COMPLEXOS  
METÁLICOS COM LIGANTES BIOATIVOS SOB O CONCEITO DA  
ELETROQUIMIOTERAPIA**

**Araraquara, SP**

**2025**

**Felipe Alves de Oliveira Pires**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DE COMPLEXOS  
METÁLICOS COM LIGANTES BIOATIVOS SOB O CONCEITO  
ELETROQUIMIOTERAPIA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

**Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri**

**Araraquara, SP**

**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

P744a Pires, Felipe Alves de Oliveira

Avaliação dos efeitos antiproliferativos de complexos metálicos com ligantes bioativos sob o conceito da eletroquimioterapia/Felipe Alves de Oliveira Pires. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.  
74f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

1. Complexos metálicos. 2. Câncer. 3. Eletroquimioterapia.  
4. Oncologia comparada. I. Título.


CDU 60

# FELIPE ALVES DE OLIVEIRA PIRES


Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 13 de fevereiro de 2025.


## BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 **WILTON ROGERIO LUSTRI**  
Data: 18/02/2025 15:56:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI (Orientador)  
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente  
 **MARCELO MONTE MOR RANGEL**  
Data: 17/02/2025 10:33:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. MARCELO MONTE MOR RANGEL  
Empresa Vet Câncer Care – Moema - SP

Documento assinado digitalmente  
 **ALZIR AZEVEDO BATISTA**  
Data: 13/02/2025 14:38:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ALZIR AZEVEDO BATISTA  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Dedico este trabalho a todos os meus pacientes

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri, por todo empenho e dedicação em sua orientação, pela humildade em sempre compartilhar seus conhecimentos durante toda a trajetória que tivemos, pelo exemplo como profissional e pesquisador, como também, por apresentar áreas de atuação em pesquisa até então inimagináveis para um médico veterinário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante papel em desenvolver ações que promovam à pesquisa acadêmica nacional.

Aos membros da banca, por participarem e opinarem neste trabalho dando sua honrosa contribuição.

As minhas colegas de grupo de pesquisa, Dr<sup>a</sup> Silmara Lazarini, Isabela Polson, Tatiane Carvalho e Caroline Yamada, por toda troca e parceria que compartilhamos neste período.

As alunas de iniciação científica, Nara Tasso, Keren Yuki e Marcela Goes, por todo empenho em seus trabalhos e pela valiosa ajuda nos projetos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

Ao Igor Henrique Cerqueira, por todo auxílio, ensinamentos e ajuda prestada no cultivo das células.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Aparecida Resende Nogueira, por toda ajuda prestada e por permitir que eu utilizasse a infraestrutura do laboratório em que coordena, o LAMUT – UNIARA.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar), por ter cedido células tumorais ao nosso laboratório e por permitir que as pesquisas relacionadas ao câncer em nosso grupo de pesquisa prosseguissem.

As secretarias do PPGB-MRQM, Sandra e Rosana, por toda atenção, ajuda e carinho que sempre tiveram comigo neste período.

A minha mãe, Leida Alves de Oliveira, por sempre acreditar na minha capacidade, por todo amor e carinho ofertado e pelo incentivo para que eu me torne um profissional cada vez melhor.

E por fim, mas não menos importante, ao meu parceiro de vida, Allef Leite dos Santos, por acreditar em mim, por todo amor e respeito, pelos conselhos e dicas acadêmicas e por fazer deste período tenso cada vez mais leve.

*Males que crescem desesperadamente  
Só podem ser aliviados com mecanismos  
desesperados*

*(William Shakespeare, Hamlet)*

## RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade de cães, gatos e humanos. Na medicina veterinária, durante muito tempo associou-se essa doença com o óbito e a eutanásia dos animais acometidos. A eletroquimioterapia é uma modalidade terapêutica de controle local contra diversos tipos de neoplasia e já é uma realidade tanto na medicina humana, como na veterinária. Ela é uma técnica que utiliza a associação da eletroporação, que permite a entrada de moléculas geralmente não permeáveis à membrana plasmática para o interior das células através de pulsos elétricos, e de quimioterápicos que podem ser administrados tanto de maneira intratumoral, como também, intravenosa. O presente trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização de complexos metálicos utilizando ligantes bioativos como o meloxicam (Mel), o tenoxicam (Ten), e a biotina (Bio) em associação aos metais Ag(I) e Cu(II), no intuito de avaliar posteriormente os possíveis efeitos antimicrobianos e antiproliferativos sobre células tumorais *in vitro*, em substituição aos quimioterápicos convencionais utilizados pela técnica. Os complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten, Ag-Bio, Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio obtidos, foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR), indicando que houve a complexação de metais, como também, submetidos a análise termogravimétrica e elementar. Também, foram realizados os testes de atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que demonstraram atividade inibitória pelos complexos de prata, mas não pelos complexos de cobre e, da atividade antiproliferativa, contemplando as células tumorais das linhagens B16 e U-87MG, que foram expostos a diferentes concentrações dos complexos de prata, evidenciando efeito antiproliferativo positivo. Os testes de aplicação da eletroporação associados aos complexos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio em células tumorais B16 *in vitro*, demonstraram efeito antiproliferativo superior em comparação as células expostas os agentes isolados. O experimento de célula de Franz, utilizando pele de orelha suína impregnada com os complexos de Ag sintetizados e submetidas a eletroporação, não demonstraram absorção dos metalofármacos após a aplicação da técnica.

**Palavras-Chave:** complexos metálicos, câncer, eletroquimioterapia, oncologia comparada



## ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality in dogs, cats, and humans. In veterinary medicine, for a long time this disease was associated with the death and euthanasia of affected animals. Electrochemotherapy is a therapeutic modality of local control against several types of neoplasia and is already a reality in both human and veterinary medicine. It is a technique that uses the association of electroporation, which allows the entry of molecules that are generally not permeable to the plasma membrane into the interior of the cells through electrical pulses, and chemotherapy drugs that can be administered both intratumorally and intravenously. The objective of this work was the synthesis and characterization of metal complexes using bioactive ligands such as meloxicam (Mel) and tenoxicam (Ten), and biotin (Bio) in association with the metals Ag(I) and Cu(II), in order to further evaluate the possible antimicrobial and antiproliferative effects on tumor cells *in vitro*, replacing the conventional chemotherapy drugs used by the technique. The metal complexes Ag-Mel, Ag-Ten, Ag-Bio, Cu-Mel, Cu-Ten and Cu-Bio were synthesized and characterized by spectroscopy in the Fourier transform infrared region (FTIR), indicating that there was complexation of metals, as well as submitted to thermogravimetric and elemental analysis. Also, tests of biological activity of growth inhibition of the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* were performed, which showed inhibitory activity by silver complexes, but not by copper complexes and, of the antiproliferative activity, contemplating the tumor cells of the B16 and U-87MG lines, which were exposed to different concentrations of silver complexes, showing a positive antiproliferative effect. Electroporation application tests associated with Ag-Mel, Ag-Ten and Ag-Bio complexes in B16 tumor cells *in vitro* demonstrated a superior antiproliferative effect compared to cells exposed to isolated agents. The Franz cell experiment, using porcine ear skin impregnated with the synthesized Ag complexes and subjected to electroporation, did not demonstrate absorption of metallodrugs after application of the technique.

**Keywords:** metal complexes, cancer, electrochemotherapy, comparative oncology

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema metodológico da síntese dos complexos metálicos. Arquivo pessoal, 2024.....	<b>30</b>
<b>Figura 2</b>	Aplicação da eletroporação em placa de cultura celular em poços. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>34</b>
<b>Figura 3</b>	A) Par de orelha suína. B) Divulsão da pele e remoção do tecido subcutâneo adjacente. C) Pele suína preparada. D) Corte da suína pele em discos. E) Discos de pele suína armazenadas em placas de Petri para posterior congelamento. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>35</b>
<b>Figura 4</b>	Aplicação da eletroquimioterapia em pele de orelha suína expostas aos complexos metálicos para teste de permeação in vitro utilizando célula de Franz. Fonte: Próprio autor, 2024 .....	<b>36</b>
<b>Figura 5</b>	Teste de permeação in vitro em célula de Franz. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>36</b>
<b>Figura 6</b>	A) Filtração do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024 .....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b>	Análise por FTIR do ligante meloxicam e do complexo metálico Ag-Mel.....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b>	Curva termogravimétrica do complexo Ag-Mel.....	<b>39</b>
<b>Figura 9</b>	A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>40</b>
<b>Figura 10</b>	Análise por FTIR do ligante tenoxicam e do complexo metálico Ag-Ten .....	<b>41</b>
<b>Figura 11</b>	Curva termogravimétrica do complexo Ag-Ten .....	<b>41</b>
<b>Figura 12</b>	A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>42</b>
<b>Figura 13</b>	Análise por FTIR do ligante biotina e do complexo metálico Ag-Bio.....	<b>43</b>
<b>Figura 14</b>	Curva termogravimétrica do complexo Ag-Bio.....	<b>43</b>
<b>Figura 15</b>	A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>44</b>

<b>Figura 16</b>	Análise por FTIR do ligante meloxicam e do complexo metálico Cu-Mel.....	<b>45</b>
<b>Figura 17</b>	Curva termogravimétrica do complexo Cu-Mel.....	<b>45</b>
<b>Figura 18</b>	A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrifuga. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>46</b>
<b>Figura 19</b>	Análise por FTIR do ligante tenoxicam e do complexo metálico Cu-Ten .....	<b>47</b>
<b>Figura 20</b>	Curva termogravimétrica do complexo Cu-Ten .....	<b>47</b>
<b>Figura 21</b>	A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrifuga. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>48</b>
<b>Figura 22</b>	Análise por FTIR do ligante biotina e do complexo metálico Cu-Bio .....	<b>49</b>
<b>Figura 23</b>	Curva termogravimétrica do complexo Cu-Bio.....	<b>49</b>
<b>Figura 24</b>	Observação da atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>P. aeruginosa</i> dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>50</b>
<b>Figura 25</b>	Observação da atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>P. aeruginosa</i> dos complexos metálicos Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>51</b>
<b>Figura 26</b>	A) Observação da placa da linhagem celular U-87MG após 72 horas. B) Observação da placa da linhagem celular B16 após 24 horas. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>52</b>
<b>Figura 27</b>	A) Fotomicrografia após inoculação das células B16. B) Fotomicrografia da confluência celular após 24h. C) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Mel. D) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Ten. E) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>52</b>
<b>Figura 28</b>	A) Fotomicrografia após inoculação das células U-87MG. B) Fotomicrografia da confluência celular após 24h. C) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Mel. D) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Ten. E) Fotomicrografia do IC50 do Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024.....	<b>53</b>
<b>Figura 29</b>	Fotomicrografias do grupo controle. A, B e C) Confluência celular e a aderência observada em cada placa de cultivo no início do experimento. D, E e F) Imediatamente após o início experimento. G, H e I) Após 90 minutos do início do	

	experimento. J, K e L) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024.....	55
<b>Figura 30</b>	Fotomicrografias do grupo complexo metálico. A, B e C) Imediatamente após a introdução dos complexos de Ag. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024.....	57
<b>Figura 31</b>	Fotomicrografias do grupo complexo metálico associado a eletroporação. A, B e C) Imediatamente após a introdução dos complexos de Ag e aplicação da eletroporação. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024.....	58
<b>Figura 32</b>	Fotomicrografias do grupo eletroporação isolada. A, B, C) Imediatamente após a eletroporação. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024.....	59
<b>Figura 33</b>	Linha superior: Grupo controle. Segunda linha: Grupo complexo metálico. Terceira linha: Grupo complexo metálico associado à eletroporação. Linha inferior: Grupo eletroporação isolada. A) Avaliação da placa de cultura em poços após 24 horas do início do experimento do complexo Ag-Mel. B) Avaliação da placa de cultura em poços após 24 horas do início do experimento dos complexos Ag-Ten e Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024.....	60
<b>Figura 34</b>	Curva padrão do complexo Ag-Mel analisado por espectrofotômetro UV-Vis.....	62
<b>Figura 35</b>	Curva padrão do complexo Ag-Ten analisado por espectrofotômetro UV-Vis .....	63
<b>Figura 36</b>	Curva padrão do complexo Ag-Bio analisado por espectrofotômetro UV-Vis.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio.....	<b>50</b>
<b>Tabela 2</b>	Atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> dos complexos metálicos Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio.....	<b>51</b>
<b>Tabela 3</b>	Análise da atividade antiproliferativa dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio em mmol-L <sup>-1</sup> sobre as linhagens tumorais B16 e U-87MG.....	<b>53</b>
<b>Tabela 4</b>	Concentração de absorvância das amostras analisadas do complexo Ag-Mel.....	<b>62</b>
<b>Tabela 5</b>	Concentração de absorvância das amostras analisadas do complexo Ag-Ten.....	<b>63</b>
<b>Tabela 6</b>	Concentração de absorvância das amostras analisadas do complexo Ag-Bio.....	<b>64</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag-Bio: Complexo de Prata(I) com biotina  
Ag-Mel: Complexo de Prata(I) com meloxicam  
Ag-Ten: Complexo de Prata(I) com tenoxicam  
Ag-pABA: Complexo de Prata(I) com ácido 4-aminobenzóico  
AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais  
ATP: Trifosfato de adenosina  
B16: Célula tumoral humana de melanoma cutâneo  
*B. cereus: Bacillus cereus*  
Bio: Biotina  
CBQUIM: Laboratório de celulose bacteriana e química medicinal  
COX: Cicloxigenase  
Cu-Mel: Complexo de Cobre(II) com meloxicam  
Cu-Ten: Complexo de Cobre(II) com tenoxicam  
Cu-Bio: Complexo de Cobre(II) com biotina  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
*E. coli: Escherichia coli*  
FTIR: Espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier  
IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória mínima  
LAMUT: Laboratório de mutagênese e toxicidade  
Mel: Meloxicam  
*P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa*  
PBS: Tampão fosfato-salino  
RNA: Ácido ribonucleico  
ROS: Espécies reativas de oxigênio  
*S. aureus: Staphylococcus aureus*  
Ten: Tenoxicam  
TGA: Análise termogravimétrica  
TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
U-87MG: Célula tumoral humana de glioma  
UV-vis: Ultravioleta visual

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
1.1	Aspectos gerais.....	17
1.2	Eletroporação e eletroquimioterapia.....	18
1.3	Complexos metálicos empregados no tratamento do câncer.....	20
1.4	Complexos metálicos como agentes antimicrobianos.....	22
1.5	Ligantes bioativos utilizados.....	23
1.5.1	Meloxicam.....	23
1.5.2	Tenoxicam.....	24
1.5.3	Biotina.....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	Materiais.....	28
3.1.1	Reagentes para síntese dos complexos.....	28
3.1.2	Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo celular e dos ensaios de citotoxicidade.....	28
3.1.3	Cepas Bacterianas ATCC.....	28
3.1.4	Células.....	29
3.2	Métodos.....	29
3.2.1	Síntese dos complexos metálicos.....	29
3.2.2	Síntese do complexo Ag-Mel.....	30
3.2.3	Síntese do complexo Ag-Ten.....	30
3.2.4	Síntese do complexo Ag-Bio.....	31
3.2.5	Síntese do complexo Cu-Mel.....	31
3.2.6	Síntese do complexo Cu-Ten.....	31
3.2.7	Síntese do complexo Cu-Bio.....	32
3.2.8	Caracterização físico-químicas dos novos complexos metálicos sintetizados.....	32
3.2.9	Análise Elementar.....	32

3.2.10	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	32
3.2.11	Análise Termogravimétrica.....	33
3.2.12	Teste da atividade antibacteriana dos complexos metálicos, por difusão em discos.....	33
3.2.13	Testes da atividade antiproliferativa e citotóxica dos complexos metálicos.....	33
3.2.14	Estudo da atividade antiproliferativa sobre células tumorais expostas aos complexos metálicos a partir da aplicação da eletroporação.....	34
3.2.15	Estudo da permeação in vitro, utilizando célula de Franz após a exposição aos agentes sintetizados e aplicação da eletroporação.....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Rendimento e caracterização dos complexos.....	38
4.1.1	Rendimento do complexo Ag-Mel.....	38
4.1.2	Análise elementar do complexo Ag-Mel.....	38
4.1.3	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Mel.....	38
4.1.4	Análise termogravimétrica do complexo Ag-Mel.....	39
4.1.5	Rendimento do complexo Ag-Ten.....	40
4.1.6	Análise elementar do complexo Ag-ten .....	40
4.1.7	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Ten .....	40
4.1.8	Análise termogravimétrica do complexo Ag-Ten .....	41
4.1.9	Rendimento do complexo Ag-Bio.....	42
4.1.10	Análise elementar do complexo Ag-Bio.....	42
4.1.11	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Bio.....	42
4.1.12	Análise Termogravimétrica do complexo Ag-Bio.....	43
4.1.13	Rendimento do Complexo Cu-Mel.....	44
4.1.14	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Mel.....	44



4.1.15	Análise Termogravimétrica do complexo Cu-Mel.....	45
4.1.16	Rendimento do complexo Cu-Ten.....	46
4.1.17	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Ten .....	46
4.1.18	Análise Termogravimétrica do complexo Cu-Ten .....	47
4.1.19	Rendimento do complexo Cu-Bio.....	48
4.1.20	Análise elementar do complexo Cu-Bio.....	48
4.1.21	Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Bio.....	48
4.1.22	Análise termogravimétrica do complexo Cu-Bio.....	49
4.2	Teste da atividade antibacteriana dos complexos metálicos, por difusão em discos.....	50
4.2.1	Discos de Prata (Ag).....	50
4.2.2	Discos de Cobre (Cu).....	51
4.3	Testes da atividade antiproliferativa e citotóxica dos complexos metálicos.....	51
4.4	Teste da atividade antiproliferativa sobre células tumorais expostas aos complexos metálicos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) a partir da aplicação da eletroporação.....	53
4.5	Teste da permeação in vitro, utilizando célula de Franz após a exposição aos complexos metálicos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) e aplicação da eletroporação.....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Aspectos Gerais

Um estudo demográfico realizado com mais de 74.000 cães presentes no Banco de Dados da Medicina Veterinária, constatou que alterações neoplásicas foram as patologias terminais mais prevalentes e as causas mais comuns de óbitos em animais maiores de um ano de idade (BILLER et al., 2016), e durante muito tempo, associou-se essa doença com o óbito e a eutanásia dos animais acometidos (DALECK; DE NARDI, 2016). Atualmente, o câncer representa a principal causa de mortalidade em cães e gatos idosos (PAZ et al., 2024).

Com os cuidados crescentes, a evolução dos métodos terapêuticos e a melhora no manejo e na manutenção da saúde que são ofertados aos animais de companhia, houve o aumento da prevalência de neoplasias em cães e gatos. Isso ocorre pois esses animais passam a viver melhor e por mais tempo, e é evidente que algumas doenças surjam com mais frequência com o decorrer da idade, tal como o câncer (VAIL; THAMM; LIPTAK, 2020).

As neoplasias cutâneas em cães e gatos representam entre 26 e 43% entre todas as afecções neoplásicas observadas. Dessas, de 20 a 40% são consideradas malignas. Dentre todas as neoplasias cutâneas malignas, o melanoma cutâneo encontra-se na 3<sup>o</sup> colocação entre os cães, atrás apenas do mastocitoma e do carcinoma de células escamosas, e na 6<sup>a</sup> posição entre os gatos, permanecendo atrás do carcinoma de células basais, mastocitoma, carcinoma de células escamosas, fibrossarcoma e o hemangiossarcoma (HAUCK; OBLACK, 2020).

Em humanos, o melanoma é uma das neoplasias mais letais observadas na rotina clínica (GUTIÉRREZ-SEIJO et al., 2022). Com base nas Estatísticas Globais do Câncer em 2020, o melanoma ocupa a 17<sup>a</sup> posição na prevalência global e a 22<sup>a</sup> em termos de mortalidade (HUA et al., 2024).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que se desenvolve a partir dos melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, que é o pigmento natural da pele. Ainda que seja um dos cânceres de pele mais letais nos humanos, é uma afecção potencialmente curável se o diagnóstico e o tratamento ocorrerem precocemente (FILHO et al., 2024).

## 1.2 Eletroporação e eletroquimioterapia

A eletroporação é uma técnica conhecida por permitir a entrada de moléculas, geralmente não permeáveis pela membrana plasmática, para o interior da célula através de pulsos elétricos (GOTHELF et al., 2003). Ela promove uma alteração transitória na estabilidade da membrana, que permite a passagem de moléculas, íons e água de maneira livre para dentro e para fora do meio citoplasmático, e vice-versa (SPUGNINI et al., 2016). Consiste em um método físico embasado na introdução de pulsos elétricos no tumor de forma breve e com alta intensidade (SILVEIRA et al., 2010). Esses pulsos elétricos são gerados a partir de eletrodos encontrados em diferentes formas e tamanhos (RANGEL, 2011).

Os primeiros experimentos utilizando a eletroporação *in vitro* datam a década de 80 e 90 (BATISTA NAPOTNIK; MIKLAVČIČ, 2018).

Em um estudo realizado utilizando células de mamíferos para a aplicação da eletroporação, um corante celular (azul de triptano) foi utilizado para avaliarem sua passagem pela membrana celular após a eletroporação em diferentes intensidades. As células em suspensão foram eletroporadas utilizando 10 pulsos em 100  $\mu$ s de duração e foi observado que a permeabilização celular do corante ocorreu em campos de intensidades entre 0,7 kV /cm até perto de 1,5 kV /cm (ROLS; TEISSIÉ, 1990).

A utilização do método da eletroporação associado à quimioterapia é denominado como eletroquimioterapia (EQT), uma modalidade de tratamento local contra o câncer (CEMAZAR et al., 2008).

Nas últimas duas décadas a aplicabilidade da EQT para o tratamento de tumores sólidos e cutâneos vêm rapidamente tornando-se popular entre veterinários oncologistas, devido a diversos fatores favoráveis para sua aplicação, como a facilidade de administração, altas taxas de eficácia, baixa morbidade e baixo custo em relação a outras terapias locais de controle tumoral (SPUGNINI; BALDI, 2019). É uma modalidade terapêutica que vem sendo amplamente realizada nos centros de tratamento oncológico de cães e gatos (RANGEL et al., 2023; DA LUZ et al., 2023; DOS ANJOS et al., 2020).

Os quimioterápicos são, em sua grande maioria, hidrofílicos e administrados por infusão intravenosa. Entretanto, na maioria das vezes, esses fármacos são lipofóbicos e possuem muita dificuldade em penetrar nas células devido à camada fosfolipídica que formam a membrana celular. A EQT consiste em permitir a passagem

de substâncias com baixa ou nenhuma capacidade de atravessar a membrana plasmática através da eletroporação, e reter o quimioterápico em seu sítio-alvo (TESTORI et al., 2010; DOS ANJOS et al., 2016).

Uma variedade de fármacos foi testada no intuito de observar a potencialização desses agentes frente à EQT, e verificou-se que a bleomicina e a cisplatina são os dois antineoplásicos cujo efeito é substancialmente potencializado sob a utilização da técnica (RANGEL et al., 2021).

Além da ação esperada pelo agente antineoplásico, a EQT promove ainda dois mecanismos secundários que auxiliam uma melhor resposta no controle local das neoplasias: a potencialização do sistema imune contra o tumor, como também, a diminuição do fluxo sanguíneo na região eletroporada, proporcionando que o fármaco previamente administrado fique concentrado na região do tumor e reduza o efeito da segunda passagem (RANGEL et al., 2021).

É uma técnica muito utilizada para melanomas primários de cães e gatos e que apresentam respostas bastante favoráveis, principalmente em melanomas em estágio I, ou seja, tumores menores de 2 cm, sem acometimento de linfonodos regionais e metástases à distância, alcançando remissão completa em 100% dos casos observados (TELLADO et al., 2020). Em outro estudo, doze cães que receberam a EQT como terapia local para melanoma oral, observou-se uma taxa de remissão completa em 41,4% dos pacientes (RANGEL et al.; 2019).

Além de sua grande utilização na medicina veterinária, a EQT vêm sendo aplicada, também, na medicina humana. É uma técnica direcionada principalmente para tumores cutâneos e subcutâneos primários e metastáticos de cabeça e pescoço, tais como o carcinoma de células basais e melanomas (PLASCHKE et al., 2017; DE BREE; WESSEL, 2020; CLOVER et al., 2020; ESMAELI; FRIEBE, 2019; AL-HADITHY et al., 2018). Entretanto, sua utilização já estendeu-se para tumores viscerais como o carcinoma hepatocelular, alcançando respostas significativas e sem efeitos adversos relacionados ao tratamento (DJOKIC et al., 2018).

Não há, até o presente momento, estudos da aplicação da EQT utilizando complexos metálicos em substituição aos quimioterápicos convencionais pela técnica. A possibilidade de que novos agentes terapêuticos sejam utilizados na busca de um mesmo propósito na abordagem terapêutica do câncer, justificam a importância para que essa pesquisa seja realizada.

### 1.3 Complexos metálicos empregados no tratamento do câncer

Na abordagem terapêutica do câncer, a quimioterapia representa a espinha dorsal de tratamento para muitos tipos de tumores. Porém, os mecanismos de resistência à quimioterapia são frequentes e multifatoriais, tais como: o influxo e efluxo de drogas; a inativação dessas drogas; as alterações nos alvos celulares das drogas; as reparações nos danos do DNA, entre outros (ROCHA, 2015). Com isso, o desenvolvimento de compostos de coordenação com atividade antitumoral eficazes e seguros, podem futuramente, ser uma alternativa que se somará ao arsenal terapêutico no tratamento dessas doenças.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de desenvolver novos produtos biotecnológicos, incluindo agentes farmacológicos compostos por metais e ligantes (complexos metálicos) para uso na terapia antineoplásica, com resultados satisfatórios, tanto em testes *in vivo* e *in vitro* (ROMERO-CANELÓN et al., 2013; MJOS et al., 2014; ANTHONY et al., 2020; AQUARONI et al., 2020; CANDIDO et al., 2022).

Estudos de atividade antitumoral, envolvendo metalofármacos de ouro(I) e ouro (III) e testados sobre diferentes células tumorais, demonstraram potencialidade de aplicação como agentes antitumorais e resultados similares àqueles descritos para a cisplatina (KUDUK-JAWORSKA et al.; 2004; ABBEHAUSEN et al., 2011; MEDICI et al., 2014).

Vários complexos metálicos contribuíram para o avanço tecnológico da terapia antineoplásica, como a platina, que tem como seus principais representantes no tratamento do câncer a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina (ALMEIDA et al., 2014). Além destes, ainda observamos diversos estudos utilizando outros metais, tais como o paládio, o rutênio, o irídio, o ródio, entre outros (MANZANO et al., 2022).

Em um estudo recente, complexos de rutênio mostraram atividade antiproliferativa em células tumorais de melanoma cutâneo (B16F10) e evidenciou redução significativa no volume tumoral dos camundongos implantados. Além disso, esses complexos foram capazes de promover a diminuição do número de mitoses e estimularam o aumento nos níveis de caspase-3, induzindo a apoptose das células tumorais (RINALDI-NETO et al., 2022).

Diversas estratégias utilizando pequenas moléculas como ionóforos, nanomateriais e complexos metálicos, no intuito de modular a homeostase do ferro,

zinco, cobre, manganês e o cálcio, foram desenvolvidos e explorados no intuito de induzir apoptose nas células neoplásicas ou promover efeitos antiproliferativos, como também, complexos contendo íons de ouro, mostraram ser uma promissora alternativa para o câncer colorretal em humanos (YANG et al., 2024; ESSA et al., 2024).

Os complexos de prata, em especial a sulfadiazina de prata, já são utilizados em infecções bacterianas em seres humanos e animais. É um composto com propriedades capazes de tratar infecções bacterianas, queimaduras, ferimentos e na prevenção de doenças infecciosas (SOLDEIRA et al., 2021). Além disso, sabe-se que a prata é um agente eficaz e com propriedades anti-inflamatórias (YANG et al., 2024; MATHESH et al.; 2024; AHIRWAR et al., 2024).

A ação antineoplásica da prata é baseada em mecanismos diferentes se comparados aos derivados da platina em termos de interação com o DNA. Nos complexos de prata, a interação é preferencialmente voltada para as bases nitrogenadas ao invés dos grupos fosfatos (MEDICI et al., 2014; MEDICI et al., 2016).

Resultados obtidos e recentemente publicados por nosso grupo de pesquisa com o metalofármaco de prata(I), designado *Ag-pABA*, demonstrou promissora atividade antiproliferativa sobre nove linhagens de células tumorais, incluindo linhagem multirresistente NCIADR/RES (multidrug resistant ovary) (AQUARONI et al., 2020).

Em outro estudo, também conduzido em parceria com nosso grupo de pesquisa e que levou ao depósito de patente de Invenção no INPI sob nº BR 10 2019 022373 1, foi comprovado que a prata em associação com um anti-inflamatório não esteroideal (nimesulida) e incorporada a um dispositivo de liberação controlado, baseado em uma membrana de celulose bacteriana, mostrou resultados promissores como um agente antiproliferativo. Observou-se, também, que não houve indução de toxicidade sistêmica e que o agente promoveu remissão completa da lesão tumoral após 21 dias do início do experimento em carcinoma de células escamosas implantadas em camundongos e tratados como terapia tópica pelo agente desenvolvido (CANDIDO, et al., 2022).

Os complexos de cobre também estão sendo explorados como possíveis agentes antitumorais, mostrando resultados promissores contra diversos tipos de neoplasia. Em um estudo recente, foi possível observar que um complexo ternário de cobre, associado a doxiciclina e fenatrolina, promoveu atividade antitumoral in vitro

contra melanoma murinos e, in vivo, contra sarcoma de Ehrlich em camundongos (LOPES et al., 2020).

Metalofármacos de Cu, mostraram atividade antineoplásica satisfatória contra células tumorais in vitro e tumores in vivo, promovendo a degradação do DNA e a morte celular por apoptose (BRAVO-GÓMEZ et al., 2015), como também, demonstraram promissora atividade antitumoral in vitro contra células tumorais B16F10 e 4 T1 (TEIXEIRA et al., 2024).

#### **1.4 Complexos metálicos como agentes antimicrobianos**

Sabe-se que a quimioterapia, afeta diretamente o sistema imunológico em humanos e animais e promove maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções causadas por microrganismos. Essas infecções representam riscos significativos para pacientes imunossuprimidos e continuam sendo uma das principais causas de complicações no manejo terapêutico de pacientes oncológicos (SILVA et al.; 2016).

Um estudo realizado por SILVA et al. (2016) com o objetivo de identificar bactérias multirresistentes em pacientes oncológicos humanos, identificou que uma das principais causas para a multirresistência à antibióticos foi a produção de betalactamases pelos microrganismos. Dentre as bactérias mais observadas foram identificadas algumas como a *E. coli*; *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que também podem afetar os animais de companhia.

Os complexos metálicos demonstraram atividades antimicrobianas contra numerosas espécies de patógenos e, dentre os metais com atividade biológica, a prata é conhecida há séculos, pelas suas propriedades antibacterianas (LUSTRI et al., 2017). Dentre os diversos mecanismos de ação da prata como agente antimicrobiano estão a alteração do metabolismo celular, a desnaturação de proteínas, a inibição da respiração bacteriana, a oxidação de moléculas de ATP, e a inativação e dano do DNA e RNA (MEDICI et al., 2016).

Os íons Cu(II) exibem também alta atividade antibacteriana (ZHANG et al., 2023) e desempenha papel crucial nas reações enzimáticas (SINGH et al., 2023).

Um estudo de complexos metálicos com o cobre Cu(II), observou a eficácia do complexo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e obteve sucesso, uma vez que um possível modo de ação desses complexos é o dano oxidativo ao

DNA. Alguns ligantes permitem a ligação ao DNA e, em conjunto com um metal, a clivagem do DNA é alcançada através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (WATERS et al., 2023).

Um estudo recente utilizando complexos de Cu mostrou atividade antibacteriana promissora contra um painel de bactérias resistentes dos gêneros *S. aureus*, como também, *S. pseudointermedius*, que são encontradas na pele e mucosa de cães e gatos, e que emergiram como um patógeno zoonótico importante devido as suas semelhanças com o *S. aureus* (TEIXEIRA et al.; 2024).

## 1.5 Ligantes bioativos utilizados

### 1.5.1 Meloxicam

O meloxicam (Mel) é um composto de oxicam pertencente a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). É uma medicação cuja as principais propriedades estão a antitérmica, a analgésica e a anti-inflamatória (SAMRA et al., 2019). Foi desenvolvido na década de 80 por uma farmacêutica europeia e seus ensaio pré-clínicos e clínicos datam a década de 90. Buscava-se oferecer eficácia clínica comparável aos AINES tradicionais da época, porém, com um perfil de segurança melhorado, especialmente em relação aos efeitos adversos promovidos pelos AINES menos seletivos (ENGELHARDT et al., 1995).

Sabe-se que os AINES são medicamentos que inibem as ciclo-oxigenases (COX) de diferentes maneiras: não seletiva, preferencialmente seletiva ou seletiva. O meloxicam é um medicamento que inibe preferencialmente a COX-2. As COX possuem duas isoformas, COX-1 e COX-2, que são induzidas durante processos inflamatórios e estão envolvidas na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Os efeitos indesejados, principalmente os gastrointestinais e os renais, estão associados à inibição da COX-1 e os benefícios dos efeitos anti-inflamatórios desejáveis são mediados pela inibição preferencial ou seletiva da isoforma COX-2 (ENGELHARDT, 1996).

COX-2 é uma enzima expressa em níveis muito baixos em tecidos saudáveis, mas sua atividade é frequentemente aumentada em processos inflamatórios e tumorais, tais como os tumores colorretais, hepáticos, pancreáticos, mamários, pulmonares, vesicais, primários ou metastáticos em humanos. Altas expressões de



COX-2 estão associadas a resistência a apoptose, à angiogênese e invasão tecidual pelo tumor (WOLFESBERGER et al., 2006, PANA et al., 2020).

A complexação do Mel à metais de transição podem aumentar sua eficiência devido a seus efeitos combinados. Além disso, a junção do mecanismo inflamatório e o câncer foi estabelecido há muito tempo, pois envolvem simultaneamente inflamação crônica e proliferação celular (SAMRA et al., 2019).

O Mel foi utilizado em estudos de caso/controle como um quimioprolifático para melanoma cutâneo humano (JOOSSE et al., 2009), como também, em associação à quimioterapia antineoplásica para osteossarcoma canino (WOLFESBERGER et al., 2006), o que reforça o interesse em utilizá-lo como ligante para a complexação dos metalofármacos que este trabalho se propõe a analisá-los.

### **1.5.2 Tenoxicam**

Os AINES da família “oxicam” mostraram ser agentes capazes de quelar vários íons metálicos divalentes do “bloco-d” da tabela periódica como a prata e o cobre, através do átomo de oxigênio amida e átomos de nitrogênio dos anéis piridil ou tiazolil (DEFAZIO; CINI, 2003).

O tenoxicam (Ten) é um agente terapêutico pertencente ao grupo dos AINES e é utilizado para o tratamento de uma variedade de inflamações. Sabe-se que o processo inflamatório está associado a doenças crônicas como o câncer e doenças cardiovasculares. Com isso, citocinas pró-inflamatórias tais como o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) desempenha importante papel nas reações inflamatórias agudas. O tenoxicam mostrou-se eficiente na diminuição do TNF- $\alpha$  quando complexado a diferentes metais de transição (MUSLU et al., 2021).

Esse medicamento forma complexo com íons de metais atuando como ligante monoaniônico através do oxigênio. Em um estudo, obteve-se cristais de cobre que foram quelados com a ação do Ten tornando-o um complexo estável e promovendo redução dos efeitos nocivos conhecidos pelo AINES e aumentando sua ação anti-inflamatória (MOYA-HERNÁNDEZ et al., 2003).

Com isso, torna-se muito interessante a sua utilização para os complexos metálicos que serão sintetizados, caracterizados e posteriormente testados como um possível agente antiproliferativo em células tumorais, haja visto que o câncer é uma

doença que cursa com processo inflamatório ativo, desencadeando a promoção da doença e a invasão tumoral.

### **1.5.3 Biotina**

A biotina (Bio), também conhecida como vitamina B7 ou vitamina H, é uma vitamina hidrossolúvel essencial para várias funções metabólicas no organismo. Ela atua como coenzima em reações de carboxilação, essenciais para o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (ZEMPLINI et al, 2009).

Estudos demonstraram que a Bio tem sido estudada por seu potencial uso terapêutico no tratamento do câncer e mostram propriedades promissoras na oncologia (MAHESHWARI et al, 2012; MAITI et al, 2017; YUAN et al, 2017; MASCI et al, 2020).

A Bio tem sido explorada no campo da oncologia devido à sua capacidade de se ligar a receptores de biotina que estão frequentemente superexpressos em células cancerosas, incluindo células de melanoma, mama, pulmão e cervical. Ela é captada pelas células através do transportador de biotina dependente de sódio (SMVT) (PEI et al, 2020).

Além disso, participa do processo de biotinilação das histonas, que é o processo pós-traducional que envolve a adição da biotina às histonas, proteínas que participam da regulação e estruturação do DNA. Esse processo desempenha um papel essencial da regulação da expressão gênica, estabilidade do genoma e resposta aos danos do DNA (STEVEN STANLEY; GRIFFIN; ZEMPLINI, 2001).

Como a Bio é uma substância que atua diretamente na regulação do DNA e que pode acarretar em alterações epigenéticas importantes (STEVEN STANLEY; GRIFFIN; ZEMPLINI, 2001), torna-se um ligante bioativo muito interessante para este projeto, pois além de ser uma vitamina essencial para o organismo, é esperado que ela facilite a interação dos metalofármacos sintetizados com a célula tumoral.

O intuito deste projeto é testar e avaliar os efeitos antiproliferativos dos complexos de prata (I) e cobre (II) associados à ligantes bioativos através da aplicação da eletroporação em células tumorais de melanoma cutâneo humano (B16) in vitro. Espera-se que com esse experimento, possamos encontrar novos agentes

farmacológicos capazes de impedir a progressão tumoral, na expectativa de, futuramente, realizar os mesmos testes em células tumorais de melanomas de cães e gatos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo a síntese e caracterização de complexos metálicos de Ag(I) e Cu(II) com os ligantes bioativos meloxicam, tenoxicam e biotina, e avaliar, comparativamente, os efeitos antiproliferativos dos complexos metálicos com ligantes bioativos in vitro em linhagens de células tumorais expostas ao fenômeno da eletroporação.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar complexos de Cu(II), Ag(I) com os ligantes bioativos meloxicam, tenoxicam e biotina;
- Otimizar técnicas de síntese em relação aos valores de pH ideais, concentrações, temperatura, tempo de reação, e proporção metal-ligante;
- Caracterizar os novos complexos obtidos por várias técnicas instrumentais, como, análise elementar, análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR);
- Determinar a capacidade de inibição de crescimento bacteriano sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e bactérias resistentes e produtoras de  $\beta$ -lactamases e biofilmes por difusão em discos, pelos complexos metálicos obtidos;
- Avaliar as atividades antiproliferativas e citotóxicas dos complexos metálicos sobre células tumorais, in vitro;
- Avaliar a atividade antiproliferativa sobre células tumorais expostas aos complexos metálicos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) a partir da aplicação da eletroporação;
- Determinar se houve permeação in vitro após a exposição aos agentes sintetizados e aplicação da eletroporação, utilizando célula de Franz.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### **3.1.1 Reagentes para síntese dos complexos**

Os ligantes meloxicam e tenoxicam foram adquiridos por uma farmácia de manipulação Farmagna no município de Araraquara - SP, provenientes dos laboratório Fagron Personalizin Medicine® e Infinity Pharma® respectivamente, ambos pertencentes ao Grupo Fagron®. Já o ligante biotina, foi adquirido diretamente pelo laboratório SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA. O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), adquirido pelo laboratório Labsynth® e o cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), pelo laboratório Dinâmica®. O Hidróxido de Potássio (KOH) (85%) foi adquirido pela Sigma Aldrich®.

##### **3.1.2 Reagentes utilizados na composição dos meios de cultivo celular e dos ensaios de citotoxicidade**

Estreptomicina e tripsina adquiridas pela empresa Inlab®. Meios de cultivo DMEM – Low Glucose e soro fetal bovino, adquiridos pela Nova Biotecnologia®. Dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido pela Synth®. Cloreto de sódio, fosfato de potássio bibásico e cloreto de potássio, adquiridos pela Synth®, como também, fosfato de sódio dibásico, adquirido pela Vetec® para a produção do tampão fosfato-salino (PBS).

##### **3.1.3 Cepas Bacterianas ATCC**

*E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) e *B. cereus* (ATCC 14579), utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana, foram obtidas da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello. As bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) *E. coli* EC958 foram gentilmente cedidas pelo pesquisador colaborador Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara, Brasil.

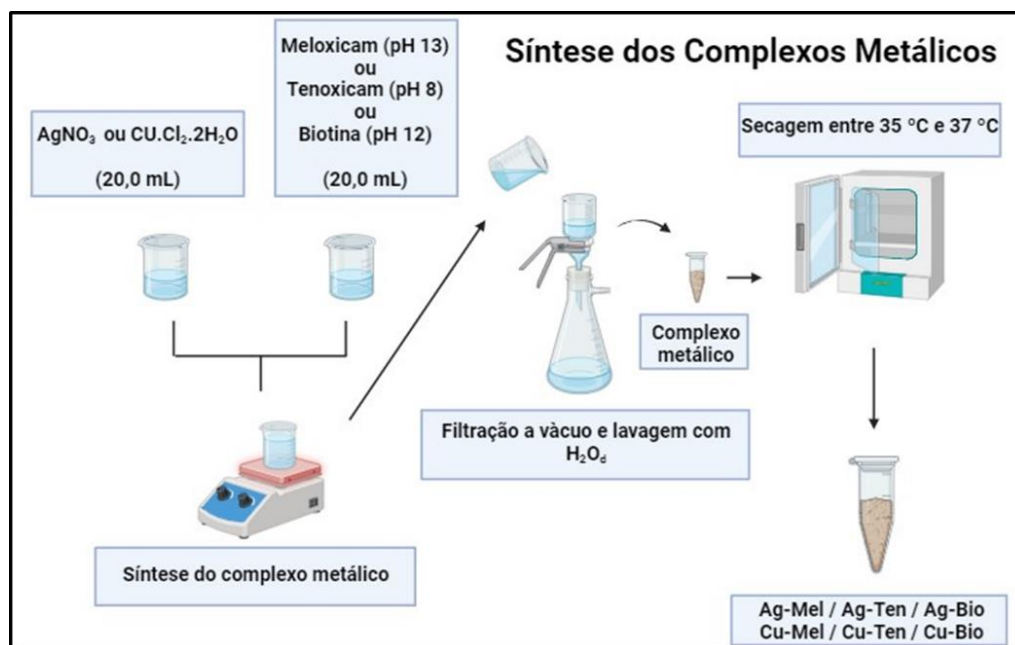
### 3.1.4 Células

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido utilizando linhagens de células tumorais humanas: B16 (melanoma cutâneo humano), fornecidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Ap. Resende Nogueira e pelo Prof. Dr. André Capaldo Amaral, obtidas pelos laboratórios de Mutagênese e Toxicidade (LAMUT) e Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa (LECER), ambos da Universidade de Araraquara e, U-87MG (glioma humano) obtidas pelo Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, docente e pesquisador da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara, Brasil.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Síntese dos complexos metálicos

Os metalofármacos à base de prata Ag(I) e Cu(II) foram sintetizados como descrito por Lustrì e colaboradores (LUSTRI *et al.*, 2023). A síntese foi realizada pela reação de uma solução aquosa ou alcoólica contendo 1,0 mmol dos ligantes bioativos, adicionados por gotejamento e sob agitação de uma solução de KOH (hidróxido de potássio) até atingir o pH ideal, visando a solubilidade, a desprotonação dos ligantes e a reprodutibilidade do processo. A seguir, foram realizadas as reações de síntese dos complexos, a temperatura ambiente, adicionando por gotejamento, os ligantes nas respectivas soluções aquosas dos sais de partida, sob agitação constante, por 30 minutos. A seguir, os sólidos obtidos foram separados por filtração, lavados com água destilada e secos em estufa ventilada entre 35 °C e 37 °C. Os complexos obtidos foram avaliados quanto o rendimento de síntese e armazenados em tubo de microcentrifuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo da luz até o momento do uso (Figura 1).



**Figura 1** Esquema metodológico da síntese dos complexos metálicos. Fonte: Próprio autor

### 3.2.2 Síntese do complexo Ag-Mel

A massa de 0,3514 g (1 mmol) do ligante Mel foi diluído em 20 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Após, foi realizado o ajuste do pH para 13 com  $\text{KOH}$  (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1698 g (1mmol) do sal de partida  $\text{Ag-NO}_3$ , diluído em 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}_d$ . A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração esverdeado foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.

### 3.2.3 Síntese do complexo Ag-Ten

A massa de 0,3374 g do ligante Ten foi diluído em 20 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Após, foi realizado o ajuste do pH para 8 com  $\text{KOH}$  (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1698 g (1 mmol) do sal de partida  $\text{AgNO}_3$ , diluído em 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}_d$ . A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético em temperatura ambiente a ao abrigo de luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração amarelada foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.

### 3.2.4 Síntese do complexo Ag-Bio

A massa de 0,2443 g do ligante Bio foi diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Após, foi realizado o ajuste do pH para 12 com KOH (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1698 g (1 mmol) do sal de partida AgNO<sub>3</sub>, diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético em temperatura ambiente a ao abrigo de luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração branca foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.

### 3.2.5 Síntese do complexo Cu-Mel

A massa de 0,3514 g (1 mmol) do ligante Mel foi diluído em 20 mL de CH<sub>3</sub>OH. Após, foi realizado o ajuste do pH para 13 com KOH (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1704 g (1mmol) do sal de partida CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração amarelo esverdeado foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.

### 3.2.6 Síntese do complexo Cu-Ten

A massa de 0,3374 g do ligante Ten foi diluído em 20 mL de CH<sub>3</sub>OH. Após, foi realizado o ajuste do pH para 8 com KOH (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1704 g (1 mmol) do sal de partida CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético em temperatura ambiente a ao abrigo de luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração amarelo esverdeado foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.



### **3.2.7 Síntese do complexo Cu-Bio**

A massa de 0,2443 g do ligante Bio foi diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Após, foi realizado o ajuste do pH para 12 com KOH (0,5M) para total solubilização no solvente e desprotonação. A seguir, foi iniciada a reação com 0,1704 g (1 mmol) do sal de partida CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, diluído em 20 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. A síntese foi realizada sob agitação constante com o auxílio de agitador magnético em temperatura ambiente a ao abrigo de luz. Após 30 minutos de reação, um precipitado de coloração branca foi obtido e separado por filtração utilizando papel filtro e armazenado por 24 horas em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C e ao abrigo de luz.

### **3.2.8 Caracterização físico-químicas dos novos complexos metálicos sintetizados**

A caracterização dos novos complexos obtidos foi realizada por técnicas instrumentais de análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e análise térmica (TGA).

### **3.2.9 Análise Elementar**

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos sintetizados foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer 2400 CHNS/O pela Sala de Instrumentos Científicos do Instituto de Química, localizado na Universidade de Campinas (UNICAMP), sob coordenação do Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi.

### **3.2.10 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR)**

Para a obtenção dos resultados de absorção na região do infravermelho dos complexos metálicos sintetizados neste trabalho, foram analisadas em um aparelho espectrofotômetro FTIR Cary 630 Agilent, pertencente ao laboratório de Celulose Bacteriana e Química Medicinal – CBQUIM da Universidade de Araraquara – UNIARA, utilizando o acessório EasiDiff (Pike Technology) com reflectância difusa em faixa de 4000 – 650 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>

### 3.2.11 Análise Termogravimétrica

Os resultados por análise termogravimétrica (TGA) foram obtidos através de um termoanalisador TGA SDT Q600 da TA Instruments. A metodologia empregada foi de fluxo de ar de  $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  em atmosfera de oxigênio e taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , em uma faixa de  $25^\circ\text{C}$  a  $900^\circ\text{C}$ . As curvas termogravimétricas foram analisadas com o software CurTiPot 3.6.1. Esses estudos foram realizados em parceria com o laboratório de Biopolímeros e Biomateriais – BioPolMat da Universidade de Araraquara – UNIARA, e coordenado pelo Prof. Dr. Hernane da Silva Barud.

### 3.2.12 Teste da atividade antibacteriana dos complexos metálicos, por difusão em discos

Cultivos em fase logarítmica das cepas bacterianas ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*), 25923 (*Staphylococcus aureus*), 14579 (*Bacillus cereus*) e *E. coli* EC958 foram diluídos em meio de cultivo estéril Brain Heart Infusion (BHI), para a escala nefelométrica 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e semeadas em diferentes placas de Petri contendo Ágar Muller-Hinton (MH). Após secagem da superfície do ágar, discos de papel de filtro estéreis (Whatman 3 - 10mm de diâmetro) foram impregnados com 1mg dos complexos metálicos e depositados sobre a superfície da placa com ágar contendo os microrganismos. As placas foram incubadas por 18-24 horas, a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa bacteriológica. A atividade antimicrobiana dos compostos foi analisada mediante presença ou ausência de halo de inibição de crescimento (em mm). Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.2.13 Testes da atividade antiproliferativa e citotóxica dos complexos metálicos

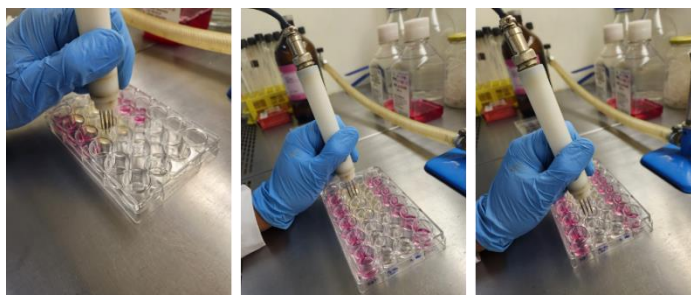
Para os estudos das atividades antiproliferativas e citotóxicas dos complexos metálicos utilizados foram utilizadas células tumorais da linhagem de melanoma cutâneo (B16) e glioma humano (U-87MG). As linhagens celulares foram cultivadas em 5 mL de meio DMEM – Low Glucose, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina. As células foram adicionadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço, em densidade de inoculação:  $3,8$  a  $6 \times 10^4$  células/mL) em triplicata,

incubadas durante 48 h a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A massa de 50mg dos complexos de prata com meloxicam (Ag-Mel), tenoxicam (Ag-Ten) e biotina (Ag-Bio) foram suspensos em uma solução contendo 2 mL de DMSO e 13 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Após a incubação e total confluência celular, foram adicionados aos poços, de uma microplaca de 96 poços, os complexos metálicos nas seguintes concentrações: 3,3, 1,6, 0,83, 0,41, 0,20, 0,10 e 0,05 mg/mL. Após 24 h foram adicionados aos poços 20 µL de resazurina a 0,02% para posterior leitura dos resultados e finalização do teste de atividade antiproliferativa.

### **3.2.14 Estudo da atividade antiproliferativa sobre células tumorais expostas aos complexos metálicos a partir da aplicação da eletroporação**

O estudo da atividade antiproliferativa a partir da aplicação da eletroporação ocorreram após o cultivo das células tumorais da linhagem B16 em 5 mL de meio DMEM – Low Glucose, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina. As células foram inoculadas em placas de cultura celular em poços e incubadas durante 48 h a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem total confluência.

Os testes foram realizados em triplicatas e ocorreram da seguinte maneira: todos os poços foram inoculados com as células tumorais. Três poços foram nossa linha controle, portanto, só haviam as células tumorais presentes em seu conteúdo. Três poços receberam apenas os agentes sintetizados no dobro da concentração mínima do IC<sub>50</sub> encontrada nos testes realizados anteriormente. Três poços receberam os agentes no dobro da concentração mínima do IC<sub>50</sub>, associada a eletroporação, no qual foi aplicado um campo elétrico de 1.300 Voltz/cm abrangendo toda extensão do poço, na frequência de 5.000 Hz, o que promoveu uma carga de 8 pulsos por segundo e, por fim, três poços receberam apenas a eletroporação na voltagem, frequência e quantidade de pulsos descritos acima (Figura 2).



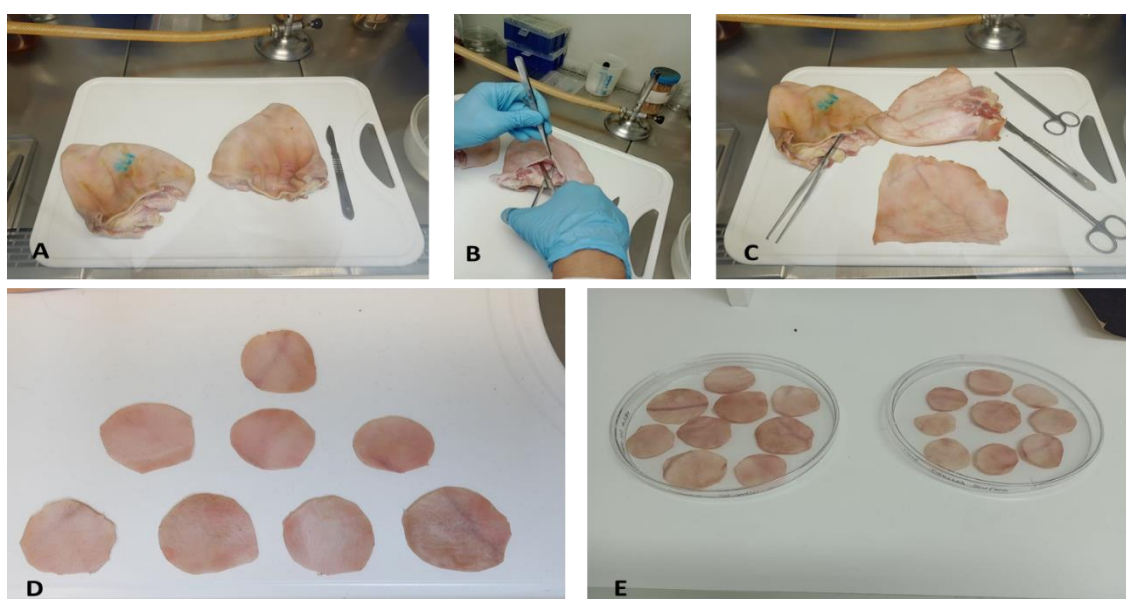
**Figura 2** Aplicação da eletroporação em placa de cultura celular em poços. Fonte: Próprio autor, 2024

O aparelho eletroporador utilizado foi o VetCP 125 (Implastic®), que possui um eletrodo formado por seis agulhas metálicas finas de 2,5 cm de comprimento, formando 3 pares equidistantes e separadas por 0,5 cm entre elas.

Após a realização desses testes, foram observados se houve aumento da atividade antiproliferativa das células expostas aos complexos metálicos em associação à eletroporação em comparação àquelas que receberam só o agente sintetizado ou só a eletroporação nos seguintes momentos: imediatamente após a aplicação da eletroporação; após 90 minutos da eletroporação; após a lavagem e limpeza dos poços com PBS e, por fim, após 24 horas da realização do experimento com os poços supridos com 500 µL de meio de cultura DMEM - Low Glucose e 100 µL de resazurina em cada poço.

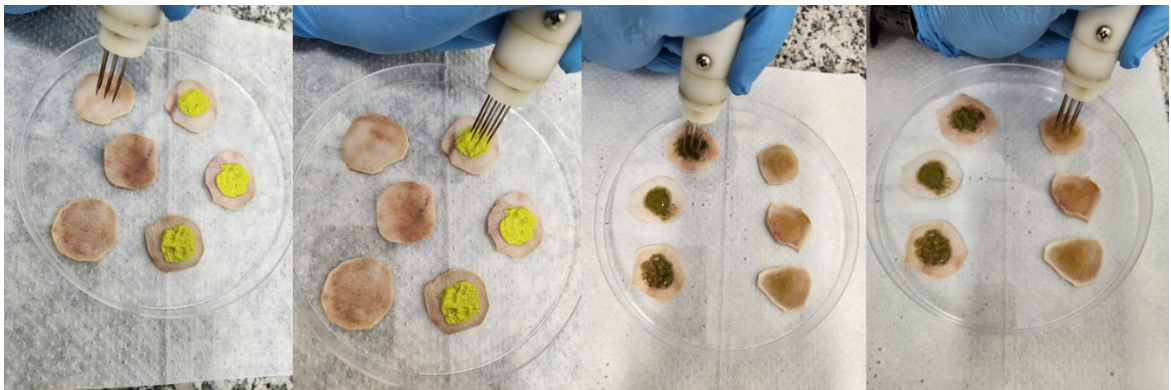
### 3.2.15 Estudo da permeação in vitro, utilizando célula de Franz após a exposição aos agentes sintetizados e aplicação da eletroporação

O estudo da permeação in vitro foi realizado utilizando o difusor transdérmico para estudo da permeabilização cutânea por células de Franz. Para isso, será utilizada a derme de orelha suína, de animal recentemente abatido em frigorífico. Esse material biológico será tratado seguindo os seguintes passos: retirada da cartilagem com o auxílio de pinça e bisturi, seguido da remoção do tecido subcutâneo adjacente, sendo, a seguir, seccionadas, processadas e congeladas para posterior utilização (Figura 3).

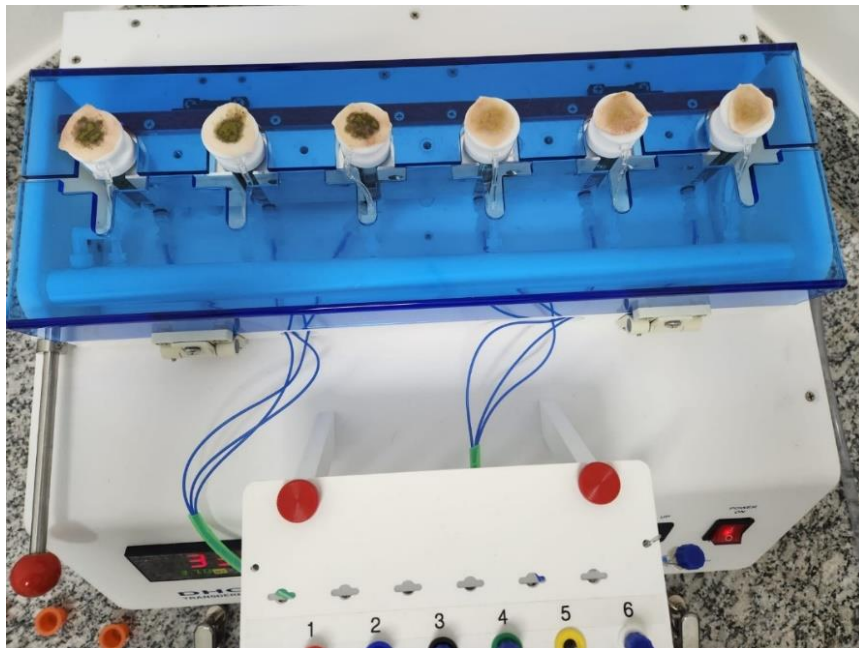


**Figura 3** A) Par de orelha suína. B) Divulsão da pele e remoção do tecido subcutâneo adjacente. C) Pele suína preparada. D) Corte da suína pele em discos. E) Discos de pele suína armazenadas em placas de Petri para posterior congelamento. Fonte: Próprio autor, 2024.

Os metalofármacos de prata obtidos foram administrados no material biológico previamente tratado realizando a aplicação tópica do agente na apresentação em gel. Os complexos de Ag (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) foram diluídos em uma concentração de 50 mg em 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  (glicerol) e 0,5 mL de gel ultrassonográfico. Após esse processo, foi iniciada a aplicação da eletroporação (Figura 4) em uma voltagem de 1.300 Voltz, na frequência de 5.000 Hz, o que promoveu uma carga de 8 pulsos por segundo. Em seguida, esses materiais foram acoplados ao difusor transdérmico (Figura 5).



**Figura 4** Aplicação da eletroquimioterapia em pele de orelha suína expostas aos complexos metálicos para teste de permeação in vitro utilizando célula de Franz. Fonte: Próprio autor, 2024.



**Figura 5** Teste de permeação in vitro em célula de Franz. Fonte: Próprio autor, 2024.

Amostras de 3mL, da solução contida no compartimento receptor da célula, foram coletadas e submetidas a determinação da DO em UV-Vis 340nm e 298nm, a cada 90 minutos, durante 6 horas. A cada análise, o conteúdo retirado do compartimento receptor foi integralmente devolvido ao compartimento receptor.

Foram realizados também, as curvas padrões dos complexos metálicos de Ag a partir de amostras iniciadas em concentrações de 50 mg/mL, sequencialmente diluídas, até sua detecção pelo espectrofotômetro UV-Vis, no intuito de determinarmos a partir do teste de permeação in vitro em célula de Franz, se houve, ou não, a permeação dos agentes após a aplicação da eletroporação.

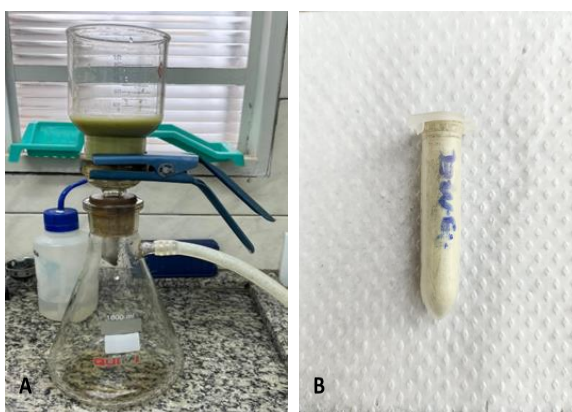
A média do grupo controle, ou seja, das soluções coletadas da pele de orelha suína que receberam em sua superfície apenas o gel ultrassonográfico e o  $C_3H_8O_3$ , e expostas a eletroporação, também foram calculadas no intuito de avaliarmos comparativamente os resultados obtidos daqueles que receberam o tratamento proposto.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Rendimento e caracterização dos complexos

#### 4.1.1 Rendimento do complexo Ag-Mel

O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,3774 g. O complexo denominado Ag-Mel foi armazenado em tubo de micro centrifuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 6).



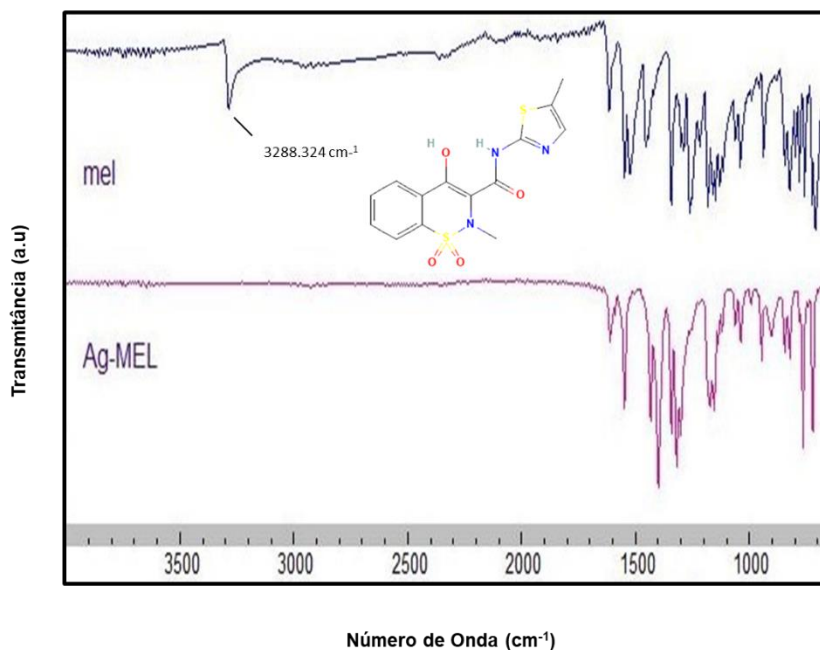
**Figura 6** A) Filtração do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrifuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.2 Análise Elementar do complexo Ag-Mel

Os resultados da análise elementar possibilitaram a determinação da proporção 1:1 metal:ligante. Análise elementar: Anal. Cal.  $[\text{Ag}(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (%): C, 35,31; H, 2,96; N, 8,82. Encontrado (%) C, 35,92; H, 2,25; N, 8,81.

#### 4.1.3 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Mel

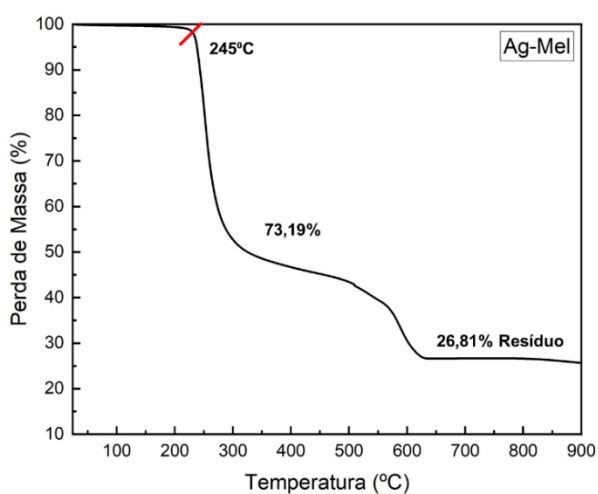
As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 7 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao meloxicam isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Ag-Mel. A estabilidade conferida na região de  $3288.324 \text{ cm}^{-1}$  do complexo Ag-Mel em comparação ao deslocamento observado no meloxicam isolado, indica possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H) ou do grupo das aminas (N-H).



**Figura 7** Análise por FTIR do ligante meloxicam e do complexo metálico Ag-Mel

#### 4.1.4 Análise termogravimétrica do complexo Ag-Mel

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 8. De acordo com os dados experimentais, a composição do complexo, formulado como  $[Ag(C_{14}H_{12}N_3O_4S_2)] \cdot H_2O$  foi confirmada. O ligante é perdido nas temperaturas de 245 °C a 630 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 73,19%. O resíduo final é consistente com a formação de prata metálica calculado para  $Ag^0$  (%): 26,81%.

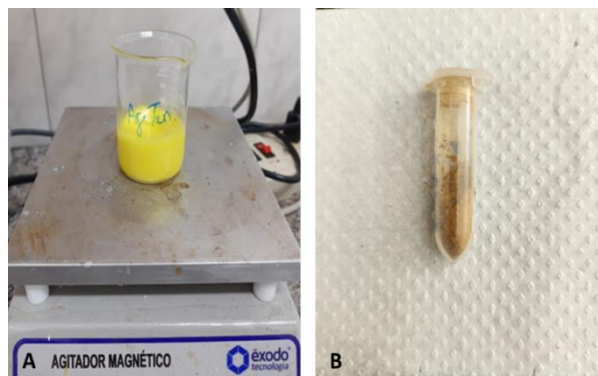


**Figura 8** Curva termogravimétrica do complexo Ag-Mel



#### 4.1.5 Rendimento do complexo Ag-Ten

O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,3922 g. O complexo denominado Ag-Ten foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 9).



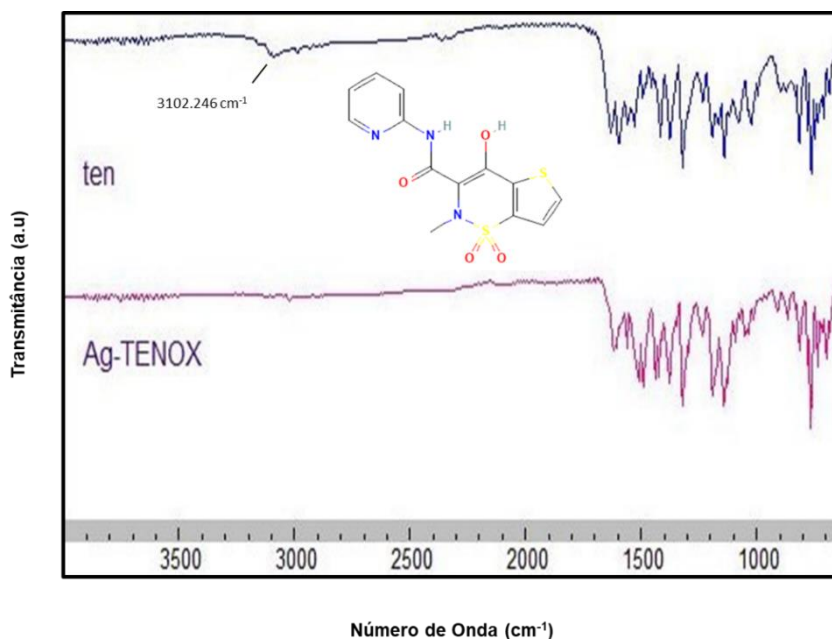
**Figura 9** A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.6 Análise elementar do complexo Ag-Ten

Os resultados da análise elementar possibilitaram a determinação da proporção 1:1 metal:ligante. Análise elementar: Anal. Cal.  $[\text{Ag}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (%): C, 33,78; H, 2,62; N, 9,09. Encontrado (%) C, 34,74; H, 1,93; N, 9,37.

#### 4.1.7 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Ten

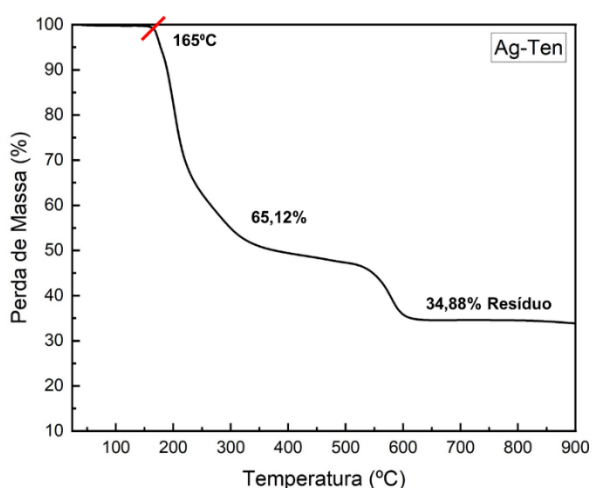
As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 10 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao ligante tenoxicam isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Ag-Ten. A estabilidade conferida na região de  $3102.246 \text{ cm}^{-1}$  do complexo Ag-Ten em comparação ao deslocamento observado no tenoxicam isolado, indica possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H) ou no grupo das aminas (N-H).



**Figura 10** Análise por FTIR do ligante tenoxicam e do complexo metálico Ag-Ten

#### 4.1.8 Análise termogravimétrica do complexo Ag-Ten

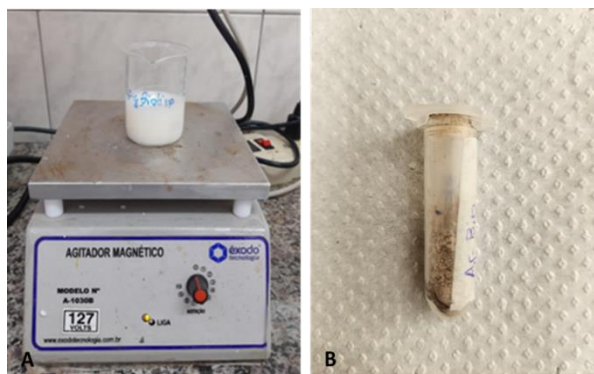
A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 11. De acordo com os dados experimentais, a composição do complexo, formulado como  $[Ag(C_{13}H_{10}N_3O_4S_2)] \cdot H_2O$  foi confirmada. O ligante é perdido nas temperaturas de 165 °C a 613 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 65,12%. O resíduo final é consistente com a formação de prata metálica calculado para  $Ag^0$  (%): 34,88%.



**Figura 11** Curva termogravimétrica do complexo Ag-Ten

#### 4.1.9 Rendimento do complexo Ag-Bio

O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,3404 g. O complexo denominado Ag-Bio foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 12).



**Figura 12** A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.10 Análise elementar do complexo Ag-Bio

Os resultados da análise elementar possibilitaram a determinação da proporção 1:1 metal:ligante. Análise elementar: Anal. Cal.  $[\text{Ag}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (%): C, 31,10; H, 4,70; N, 7,25. Encontrado (%) C, 30,38; H, 4,64; N, 7,08.

#### 4.1.11 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Ag-Bio

As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 13 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao ligante biotina isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Ag-Bio. A diferença encontrada nos deslocamentos entre o ligante isolado em  $3301.396 \text{ cm}^{-1}$  e do complexo Ag-Bio em  $3225.579 \text{ cm}^{-1}$ , assim como nas regiões de  $2450 \text{ cm}^{-1}$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , evidenciam possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H), ou no grupo das aminas primárias e secundárias (N-H).

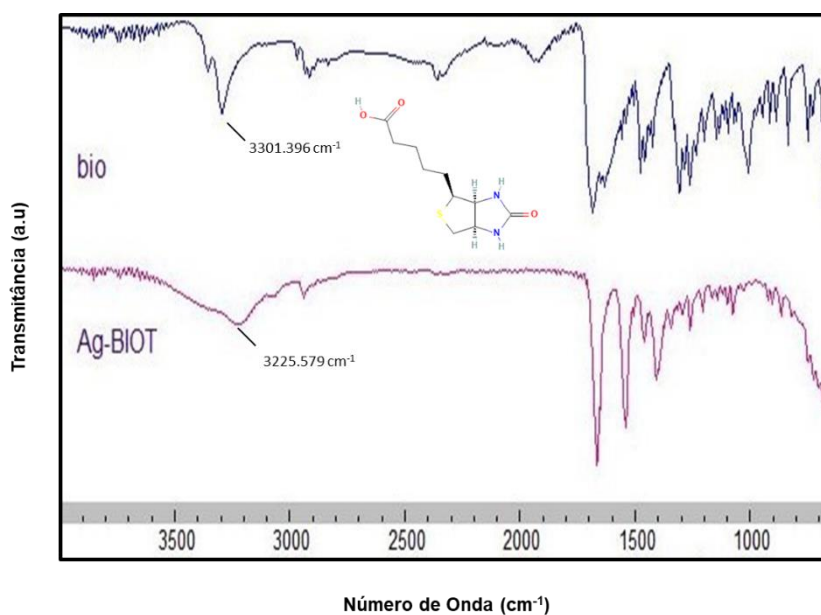


Figura 13 Análise por FTIR do ligante biotina e do complexo metálico Ag-Bio

#### 4.1.12 Análise Termogravimétrica do complexo Ag-Bio

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 14. De acordo com os dados experimentais, a composição do complexo, formulado como  $[Ag(C_{10}H_{15}N_2O_3S)].2H_2O$  foi confirmada. O ligante é perdido nas temperaturas de 28 °C a 590 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 67,76%. O resíduo final é consistente com a formação de prata metálica calculado para  $Ag^0$  (%): 32,24%.

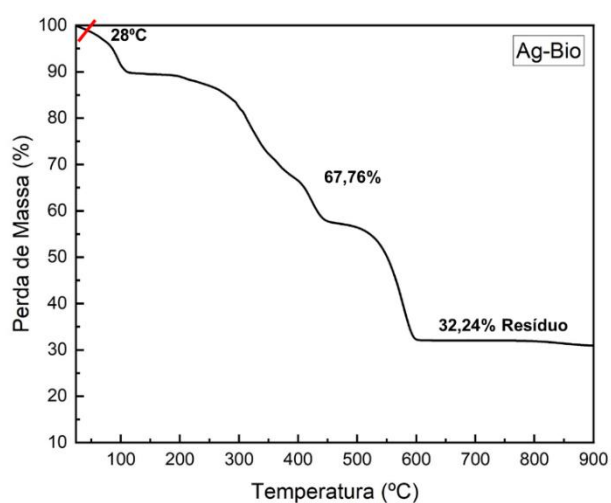
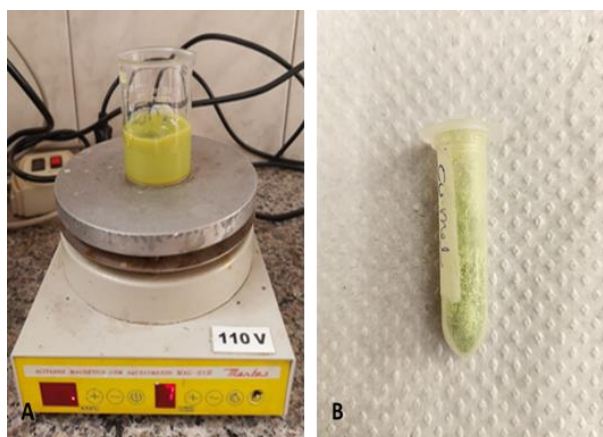


Figura 14 Curva termogravimétrica do complexo Ag-Bio

#### 4.1.13 Rendimento do Complexo Cu-Mel

O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,3805 g. O complexo denominado Cu-Mel foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 15).



**Figura 15** A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.14 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Mel

As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 16 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao ligante meloxicam isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Cu-Mel. A diferença encontrada nos deslocamentos entre o ligante isolado em  $3288.324\text{ cm}^{-1}$  e do complexo Cu-Mel em  $3364.141\text{ cm}^{-1}$ , evidencia possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H) e no grupo das amins (N-H).

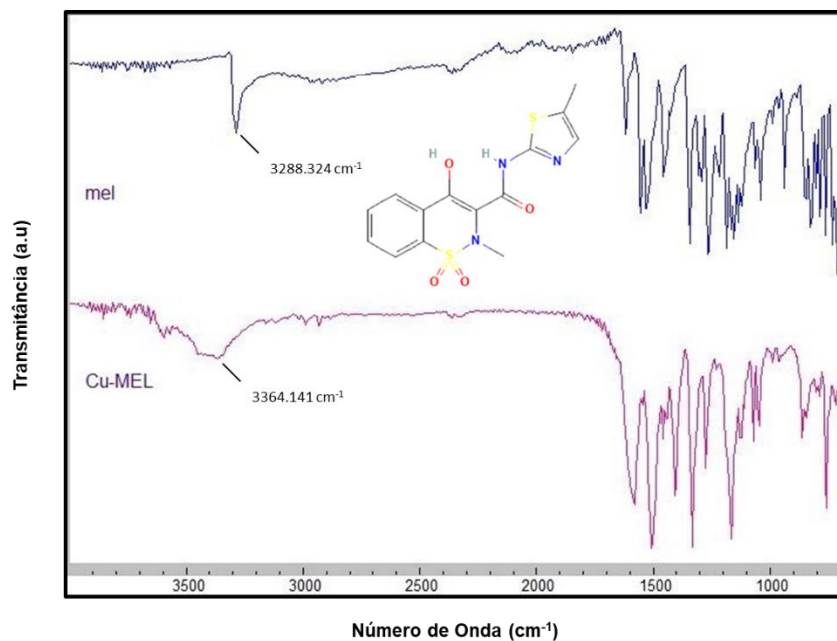


Figura 16 Análise por FTIR do ligante meloxicam e do complexo metálico Cu-Mel

#### 4.1.15 Cu-Mel – Análise Termogravimétrica

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 17. O ligante do complexo formulado como  $[\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$  é perdido nas temperaturas de 40 °C a 540 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 76,27%. O resíduo final é consistente com a formação de cobre metálico calculado para  $\text{Cu}^0$  (%): 23,73%.

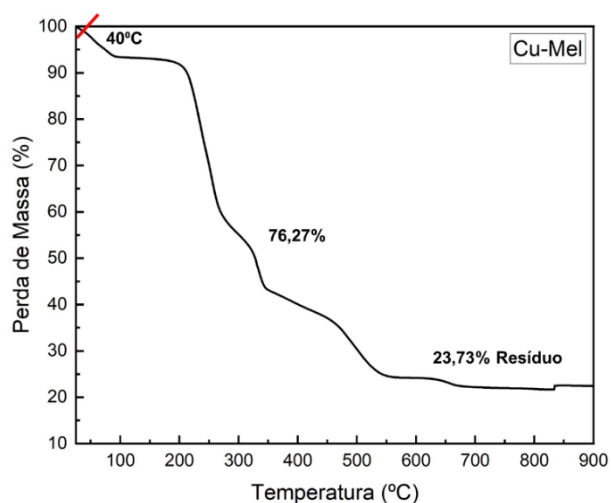
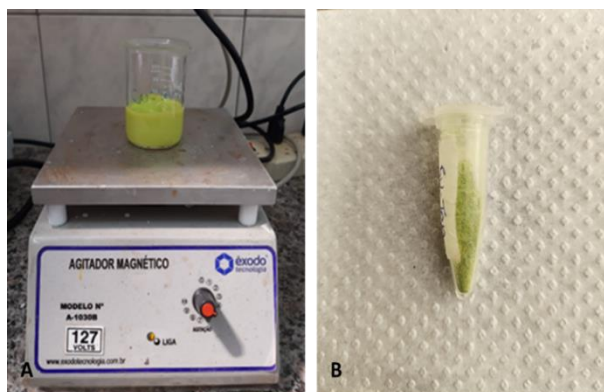


Figura 17 Curva termogravimétrica do complexo Cu-Mel

#### 4.1.16 Rendimento do complexo Cu-Ten

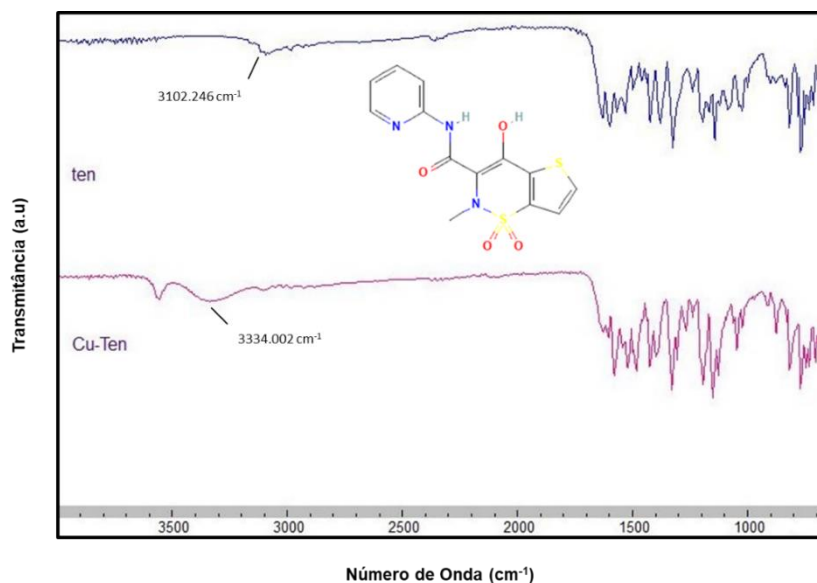
O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,3470 g. O complexo denominado Cu-Ten foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 18).



**Figura 18** A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.17 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Ten

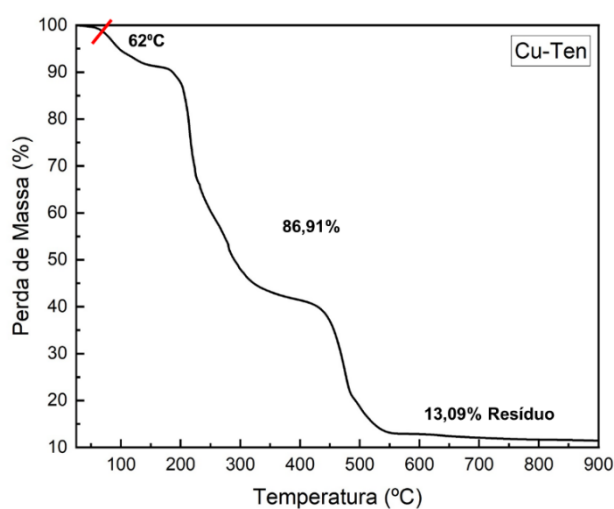
As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 19 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao ligante tenoxicam isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Cu-Ten. A diferença encontrada nos deslocamentos entre o ligante isolado em  $3102.246\text{ cm}^{-1}$  e do complexo Cu-Ten em  $3334.002\text{ cm}^{-1}$ , evidencia possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H) e no grupo das amins (N-H).



**Figura 19** Análise por FTIR do ligante tenoxicam e do complexo metálico Cu-Ten

#### 4.1.18 Análise Termogravimétrica do complexo Cu-Ten

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 20. O ligante do complexo formulado como  $[\text{Cu}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$  é perdido nas temperaturas de 62 °C a 548 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 86,91%. O resíduo final é consistente com a formação de cobre metálico calculado para  $\text{Cu}^0$  (%): 13,09%.

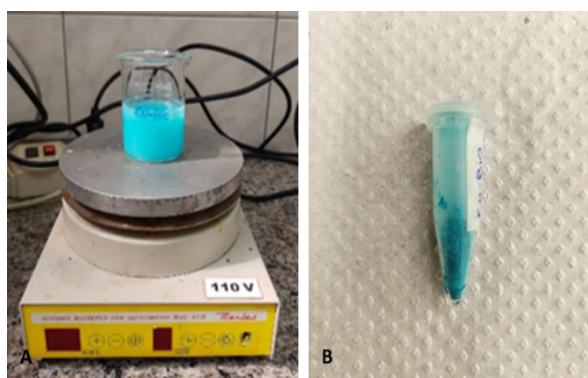


**Figura 20** Curva termogravimétrica do complexo Cu-Ten



#### 4.1.19 Rendimento do complexo Cu-Bio

O rendimento em massa obtido após a secagem do complexo foi de 0,2548 g. O complexo denominado Cu-Bio foi armazenado em tubo de micro centrífuga estéril, envolto em papel alumínio e estocado ao abrigo de luz até sua utilização (Figura 21).



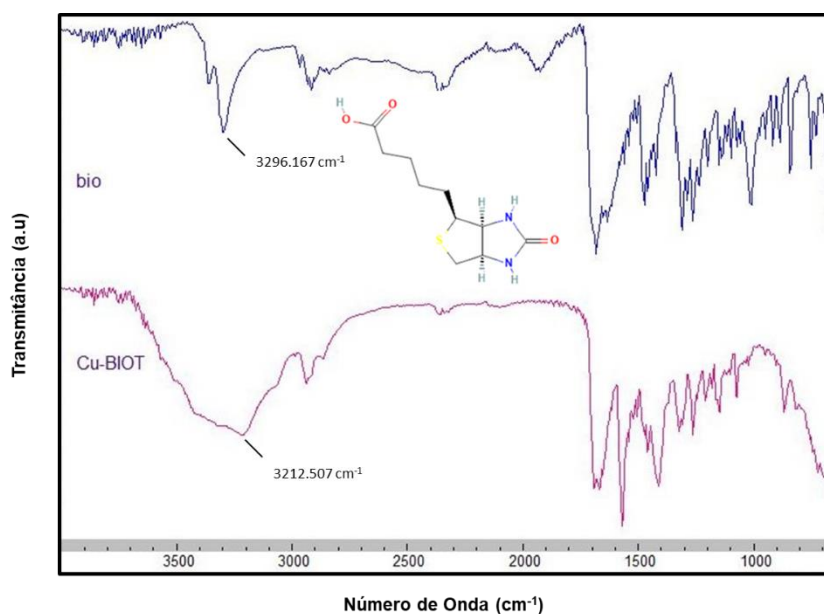
**Figura 21** A) Agitação do complexo. B) Complexo após a secagem armazenado em tubo de microcentrífuga. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.1.20 Análise elementar do complexo Cu-Bio

Os resultados da análise elementar possibilitaram a determinação da proporção 1:1 metal:ligante. Análise elementar: Anal. Cal.  $[\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ , (%): C, 36,97; H, 5,27; N, 8,62. Encontrado (%) C, 37,26; H, 5,08; N, 8,62.

#### 4.1.21 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR) do complexo Cu-Bio

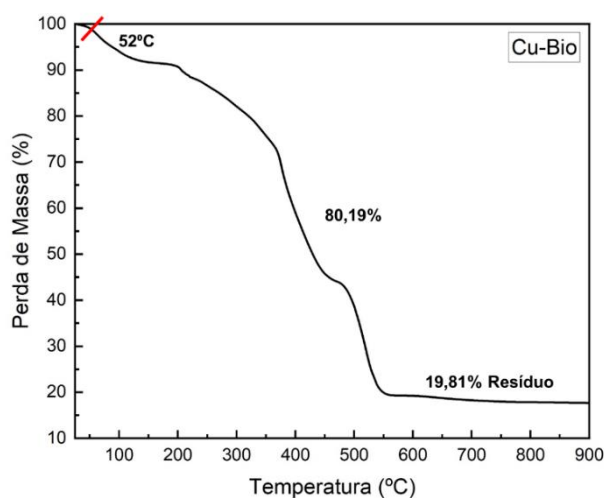
As leituras dos padrões de banda do gráfico da Figura 22 possibilitou observar que houve provável coordenação do metal à estrutura do ligante bioativo. O padrão da linha demonstrada em coloração azul refere-se ao ligante biotina isolado. Já o padrão em linha roxa, refere-se ao complexo Cu-Bio. A diferença encontrada nos deslocamentos entre o ligante isolado em  $3296.167\text{ cm}^{-1}$  e do complexo Cu-Bio em  $3212.507\text{ cm}^{-1}$ , assim como nas regiões entre  $1950\text{ cm}^{-1}$  e  $1620\text{ cm}^{-1}$ , evidenciam possível coordenação do complexo na região do grupo carboxílico (O-H), ou grupo das aminas primárias e secundárias (N-H).



**Figura 22** Análise por FTIR do ligante biotina e do complexo metálico Cu-Bio

#### 4.1.22 Análise termogravimétrica do complexo Cu-Bio

A curva termogravimétrica é mostrada na Figura 23. O ligante do complexo formulado como  $[\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  é perdido nas temperaturas de 52 °C a 546 °C. A porcentagem calculada para a perda do ligante foi de 80,19%. O resíduo final é consistente com a formação de cobre metálico calculado para  $\text{Cu}^0$  (%): 19,81%.



**Figura 23** Curva termogravimétrica do complexo Cu-Bio

## 4.2 Teste da atividade antibacteriana dos complexos metálicos, por difusão em discos

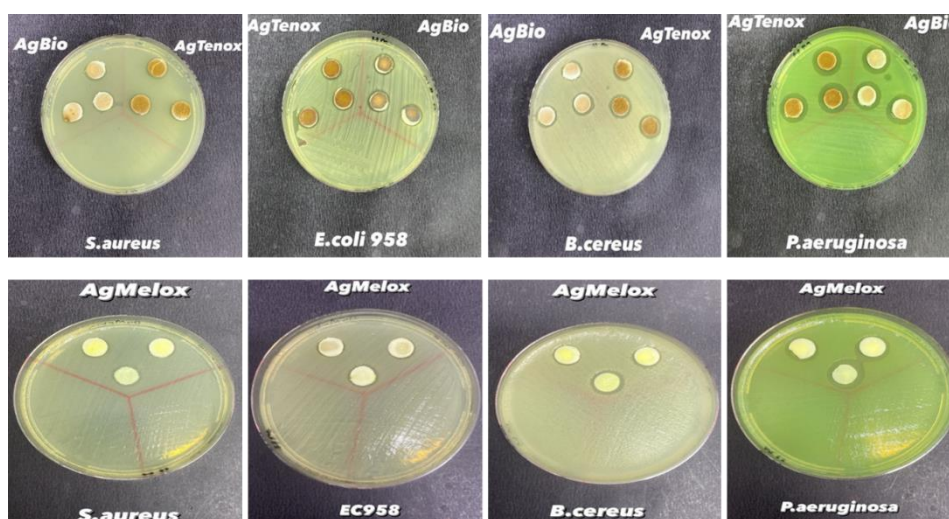
Após a incubação das placas de Ágar Muller-Hinton (MH) com microrganismos em sua superfície e a impregnação dos discos Ag-Mel, Ag-Ten, Ag-Bio, Cu-Mel, Cu-Ten, e Cu-Bio na estufa bacteriológica, foi analisado a presença ou a ausência do halo de inibição. Os testes foram realizados em triplicata.

### 4.2.1 Discos de Prata (Ag)

Foi analisado a presença de halo de inibição em todos os discos com esse metal, ou seja, Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio. Portanto, pode concluir que provavelmente esses complexos obtiveram atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *E. coli* EC958, *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Tabela 1 e Figura 24).

**Tabela 1** Atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio

Halos de Inibição em Milímetros				
Microrganismos Compostos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	ATCC 25923	EC958	ATCC 14579	ATCC 27853
<b>Ag-Mel</b>	1,2	1,2	1,4	1,6
<b>Ag-Ten</b>	1,4	1,3	1,4	1,8
<b>Ag-Bio</b>	1,3	1,3	1,4	1,8



**Figura 24** Observação da atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024

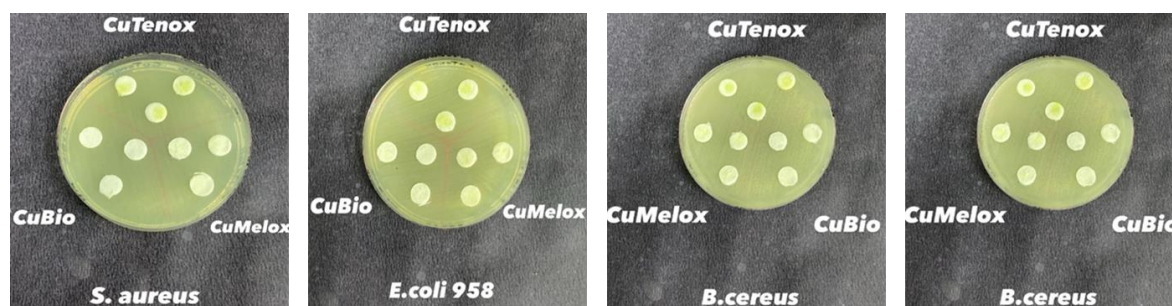
#### 4.2.2 Discos de Cobre (Cu)

Foi analisado a ausência de halo de inibição em todos os discos com complexos: Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio. Portanto, pode concluir que provavelmente esses complexos não tiveram atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *E. coli* EC958, *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Tabela 2 e Figura 25).

**Tabela 2** Atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* dos complexos metálicos Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio

<b>Halos de Inibição em Milímetros</b>				
Microrganismos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Composto	ATCC 25923	EC958	ATCC 14579	ATCC 27853
<b>Cu-Mel</b>	R	R	R	R
<b>Cu-Ten</b>	R	R	R	R
<b>Cu-Bio</b>	R	R	R	R

**(R): Microrganismo Resistente**

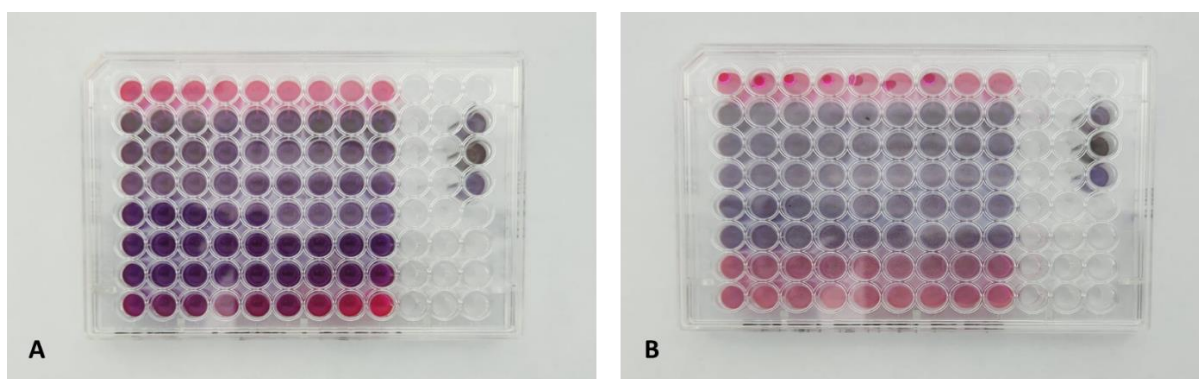


**Figura 25** Observação da atividade biológica de inibição de crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* dos complexos metálicos Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024

#### 4.3 Testes da atividade antiproliferativa e citotóxica dos complexos metálicos

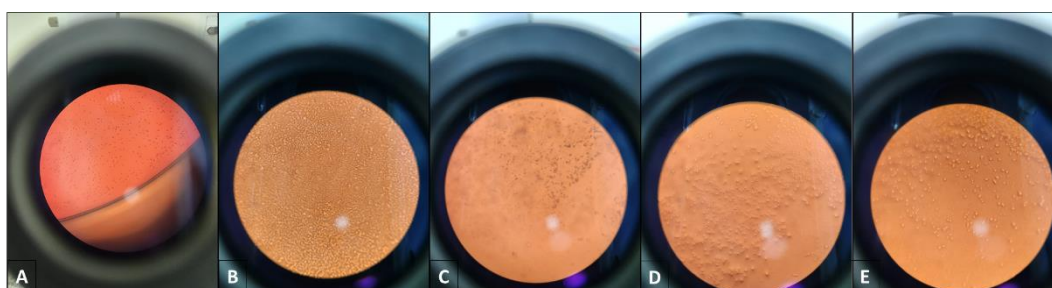
Para os estudos das atividades antiproliferativas e citotóxicas dos complexos metálicos foram utilizadas células tumorais da linhagem de melanoma cutâneo (B16) e glioma humano (U-87MG). Foram realizados ensaios de avaliação da viabilidade celular determinando a atividade antiproliferativa in vitro determinando o IC<sub>50</sub>, ou seja,

concentração mínima que inibe 50% de crescimento celular ou efeito citostático. As células foram adicionadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço, em densidade de inoculação:  $3,8$  a  $6 \times 10^4$  células/mL) em triplicata, incubadas durante 48 h a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Para esses testes foram elegidos apenas os complexos metálicos de prata, haja visto que os complexos de cobre não apresentaram atividade antimicrobiana que era esperado para nossos experimentos. Os complexos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) foram adicionados aos poços nas seguintes concentrações: 3,3, 1,6, 0,83, 0,41, 0,20, 0,10 e 0,05 mg/mL. Após 24 h foram adicionados aos poços 20  $\mu\text{L}$  de resazurina a 0,02% e realizada a leitura das placas que continham as células da linhagem B16 e U-87MG após 24 e 72 horas, respectivamente (Figura 26).



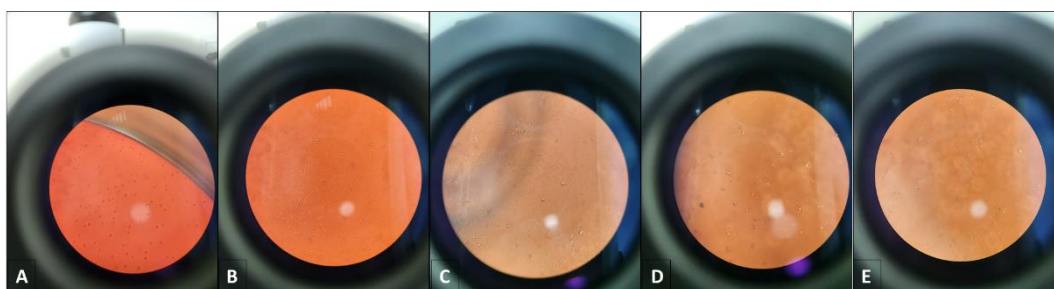
**Figura 26** A) Observação da placa da linhagem celular U-87MG após 72 horas. B) Observação da placa da linhagem celular B16 após 24 horas. Fonte: Próprio autor, 2024

Os resultados após a leitura da placa contendo as células da linhagem B16 evidenciou que a concentração de 0,2 mg/mL foi a concentração mínima para atingir o  $\text{IC}_{50}$  em todos os complexos de prata testados, resultando em uma concentração mínima de  $0,43 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  para o complexo Ag-Mel;  $0,45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  no Ag-Ten e, por fim,  $0,56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  para o complexo Ag-Bio (Figura 27 e Tabela 3).



**Figura 27** A) Fotomicrografia após inoculação das células B16. B) Fotomicrografia da confluência celular após 24h. C) Fotomicrografia do  $\text{IC}_{50}$  do Ag-Mel. D) Fotomicrografia do  $\text{IC}_{50}$  do Ag-Ten. E) Fotomicrografia do  $\text{IC}_{50}$  do Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024

A leitura da placa que continham as células da linhagem U-87MG evidenciou que a concentração de 0,1 mg/mL foi a concentração mínima necessária para atingir o IC<sub>50</sub> dos três complexos de prata testados. Foi observado que a concentração mínima para o complexo de Ag-Mel foi de 0,21 mmol-L<sup>-1</sup>; enquanto que do Ag-Ten e do Ag-Bio foi de 0,22 e 0,28 mmol-L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 28 e Tabela 3).



**Figura 28** A) Fotomicrografia após inoculação das células U-87MG. B) Fotomicrografia da confluência celular após 24h. C) Fotomicrografia do IC<sub>50</sub> do Ag-Mel. D) Fotomicrografia do IC<sub>50</sub> do Ag-Ten. E) Fotomicrografia do IC<sub>50</sub> do Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024

**Tabela 3** Análise da atividade antiproliferativa dos complexos metálicos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio em mmol-L<sup>-1</sup> sobre as linhagens tumorais B16 e U-87MG

Células tumorais Compostos	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
	B16	U-87MG
<b>Ag-Mel</b>	0,43	0,21
<b>Ag-Ten</b>	0,45	0,22
<b>Ag-Bio</b>	0,56	0,28

IC<sub>50</sub>: concentração que inibe o crescimento celular de 50% ou efeito citostático após exposição. Linhagens celulares de tumores humano: B16 (melanoma cutâneo) e U-87MG (glioma)

#### 4.4 Teste da atividade antiproliferativa sobre células tumorais expostas aos complexos metálicos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) a partir da aplicação da eletroporação

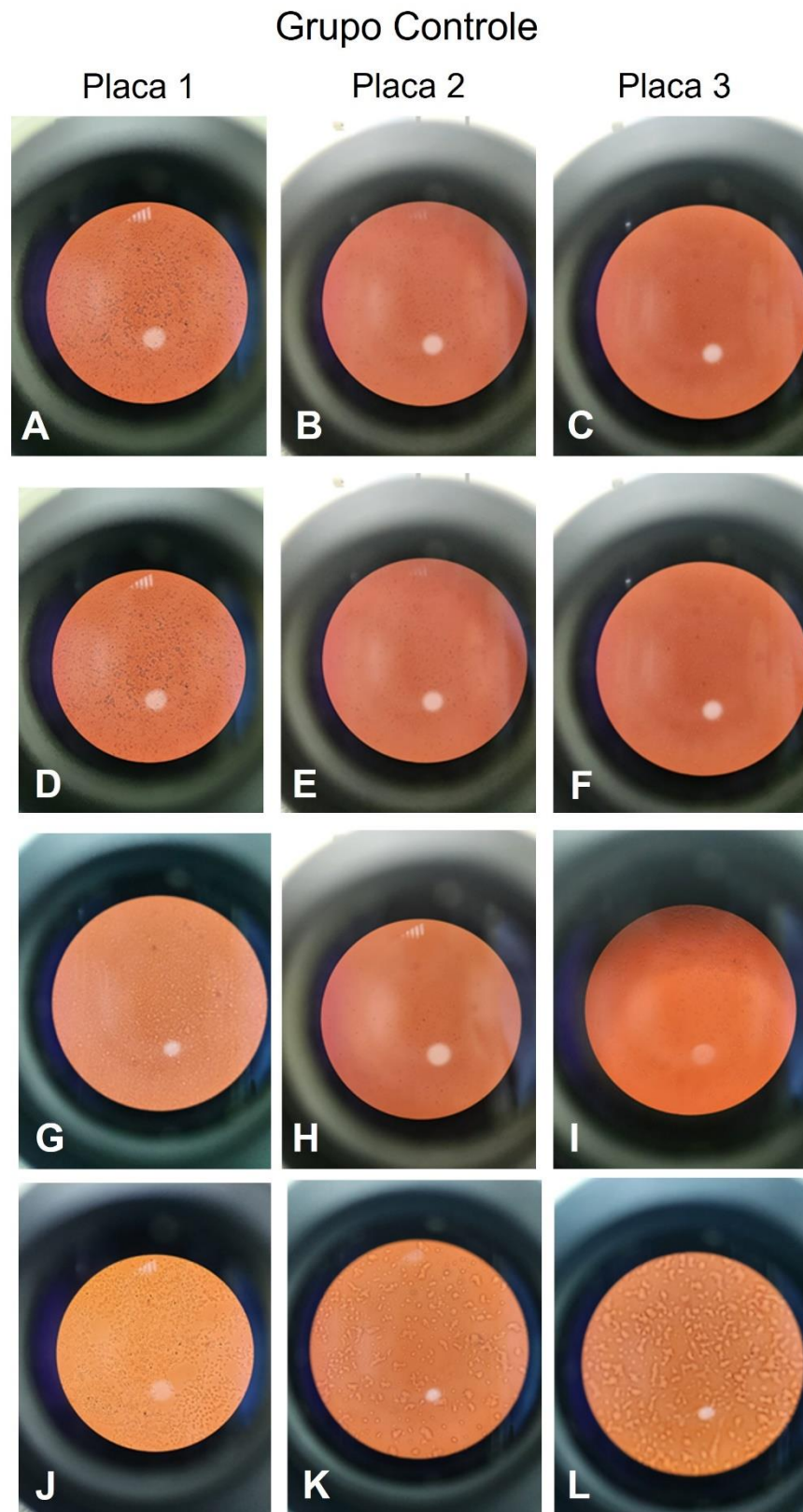
Os testes de atividade antiproliferativa foram realizados sobre células tumorais de melanoma cutâneo (B16) e expostas aos complexos de prata Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio, associados, ou não, à eletroporação.

Os testes ocorreram em triplicata após a inoculação das células tumorais em placas de cultivo em poços e total confluência celular e foram subdivididos da seguinte

maneira: Três poços foram nossa linha controle, portanto, só continham as células tumorais presentes em seu conteúdo. Três poços receberam apenas os agentes sintetizados no dobro da concentração mínima do IC<sub>50</sub> encontrada nos testes realizados anteriormente, portanto, 0,4 mg/mL. Três poços receberam os complexos de prata na concentração de 0,4 mg/mL, associada a eletroporação, no qual foi incidida uma média de voltagem de 1.300 Voltz (1.228 a 1372 Voltz), abrangendo toda a extensão do poço, na frequência de 5.000 Hz, o que promove uma carga de 8 pulsos por segundo e, por fim, três poços receberam apenas a eletroporação na voltagem, frequência e quantidade de pulsos descritos acima.

A avaliação da resposta ao tratamento proposto ocorreu sobre a análise dos poços através da observação microscópica e registro das fotomicrografias nos seguintes momentos: basal, imediatamente após a eletroporação, noventa minutos após a eletroporação, imediatamente após a lavagem e limpeza dos poços com PBS e, 24 horas após a eletroporação com os poços supridos com 500 µL de meio de cultura DMEM – Low Glucose e 100 µL resazurina.

Na imagem abaixo, podemos observar as fotomicrografias do grupo controle, ou seja, dos poços que receberam em seu conteúdo apenas a inoculação das células tumorais da linhagem B16. Pela observação microscópica, não houve diferença significativa na morfologia celular, na quantidade celular, nem na disposição dessas células nos poços observados, independentemente dos momentos em que foram avaliadas, até a total finalização do experimento (Figura 29).



**Figura 29** Fotomicrografias do grupo controle. A, B e C) Confluência celular e a aderência observada em cada placa de cultivo no início do experimento. D, E e F) Imediatamente após o início experimento. G, H e I) Após 90 minutos do início do experimento. J, K e L) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: próprio autor, 2024



Já nas fotomicrografias do grupo complexo metálico (Figura 30), podemos observar que imediatamente após a introdução dos complexos de Ag (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) nas concentrações de 0,4 mg/mL, é possível observar o conteúdo dos complexos metálicos dispersos pelos poços (pontos mais enegrecidos das imagens), acima do manto celular aderido à placa de cultivo, porém, não há nenhuma mudança na confluência celular, nem em sua morfologia após a introdução dos agentes.

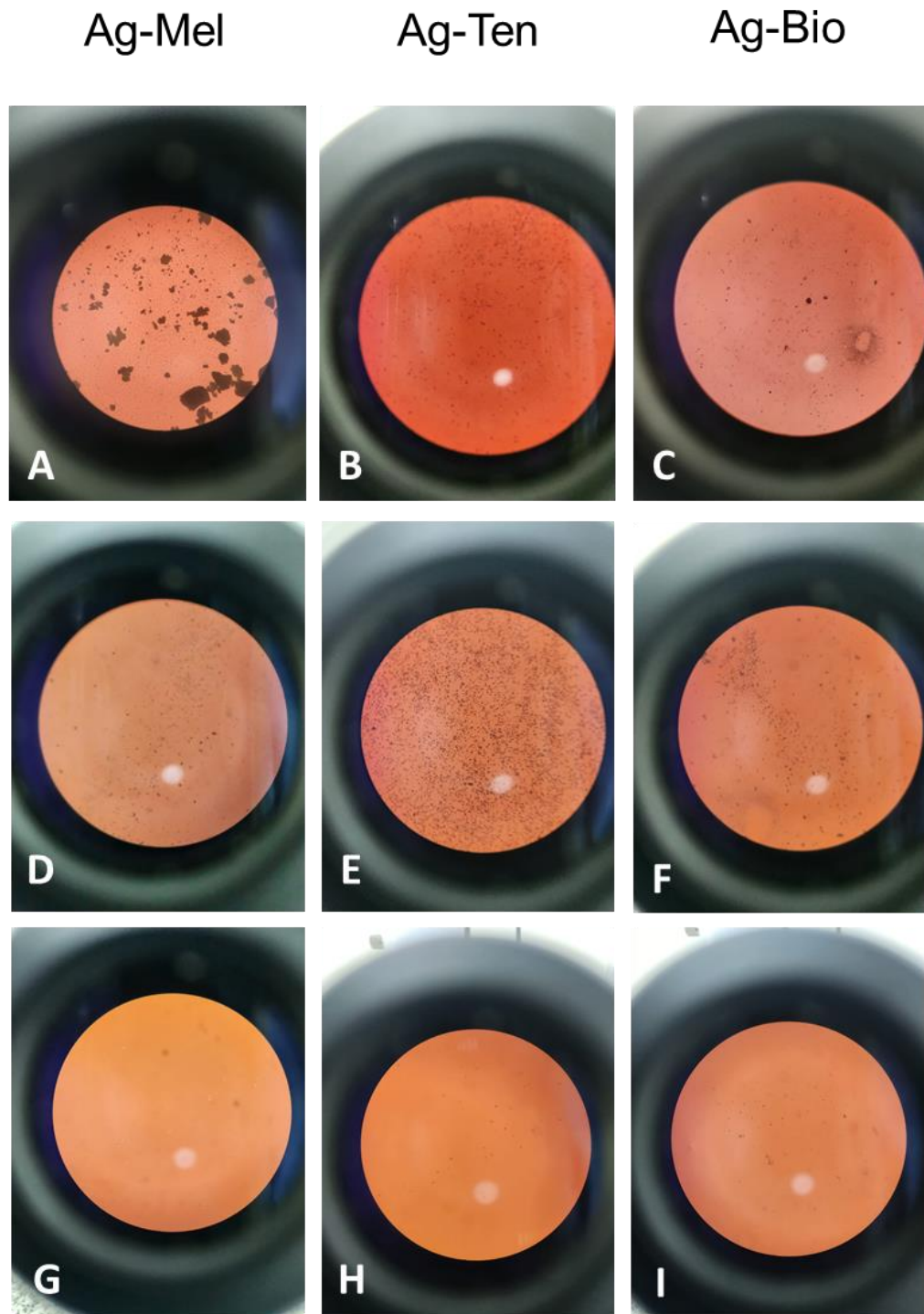
Na segunda observação, aos noventa minutos após a introdução dos complexos, não é mais possível observar o manto celular aderido ao fundo da placa, evidenciando que apenas o agente isolado foi eficaz para causar a morte das células tumorais nos três complexos de Ag testados.

Após a lavagem dos poços, foi possível observar que no poço referente ao complexo Ag-Mel, nota-se algumas células isoladas que ainda estavam aderidas na placa, mostrando que este complexo foi eficaz na morte de mais de 90% das células. Entretanto, nos três complexos de Ag testados isoladamente, não houve nenhuma atividade celular após 24h do início do experimento, como será observado mais adiante neste trabalho.

Na avaliação microscópica do grupo complexo metálico associado a eletroporação (Figura 31), observa-se grande diferença na fase imediata após o início do experimento se comparado ao grupo dos complexos metálicos. Podemos avaliar que após a aplicação da eletroporação, houve diminuição importante no manto celular que estava aderido ao fundo da placa de cultivo, ocorrendo a morte celular em mais de 90% das células presentes imediatamente após a aplicação da técnica, mostrando atividade antitumoral superior em comparação aos complexos metálicos isolados.

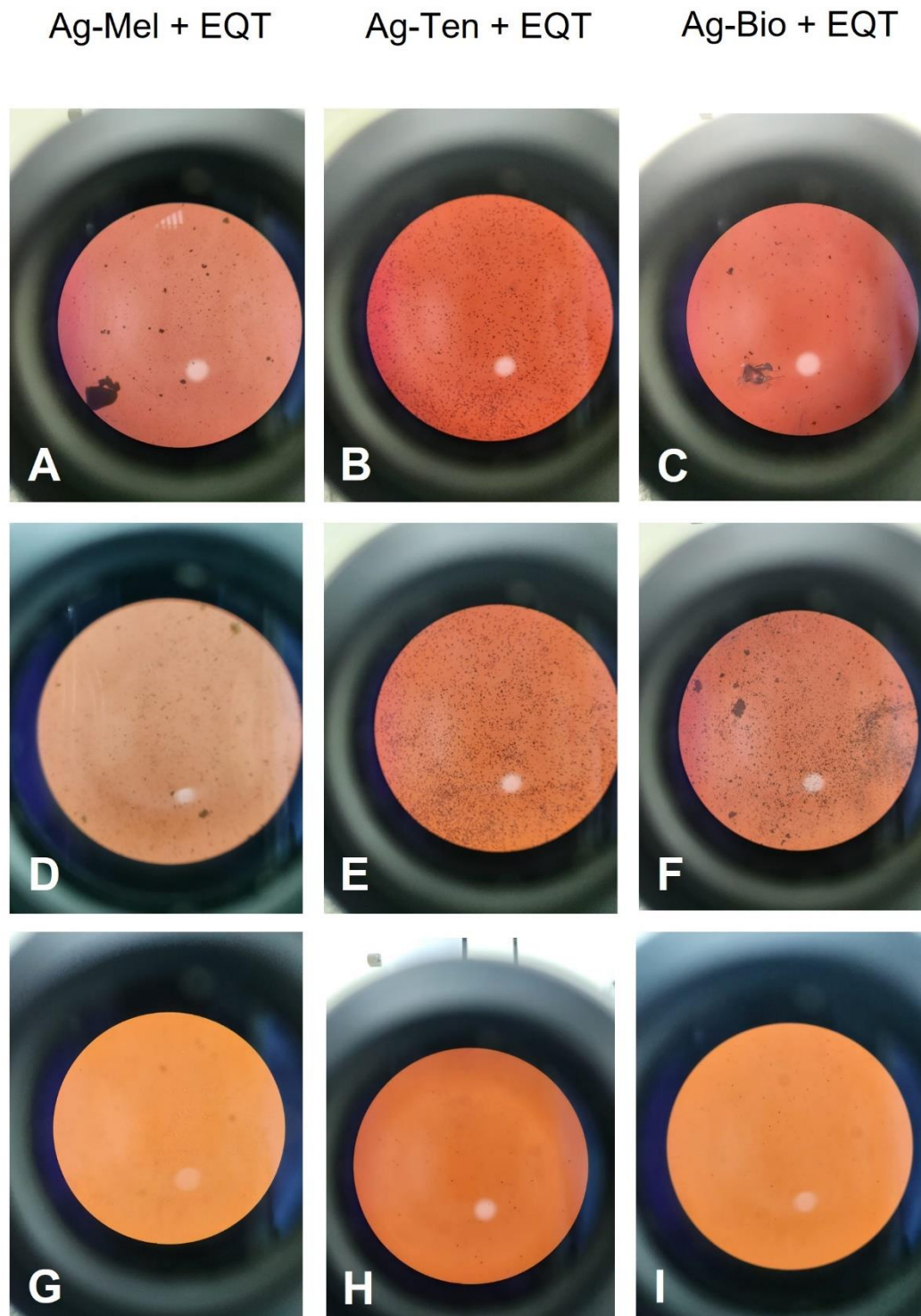
Na observação microscópica após noventa minutos, notam-se algumas células isoladas, mostrando resposta semelhante ao grupo anteriormente avaliado. Após a lavagem dos poços com PBS, no poço representante do complexo Ag-Mel (G), observa-se a presença de alguns grupos de células tumorais dispostas pelo poço, assim como foi observado no grupo Ag-Mel isolado. Porém, como referido na análise do grupo dos complexos isolados, após 24 horas do experimento, houve 100% de morte celular.

## Grupo Complexo Metálico



**Figura 30** Fotomicrografias do grupo complexo metálico. A, B e C) Imediatamente após a introdução dos complexos de Ag. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024

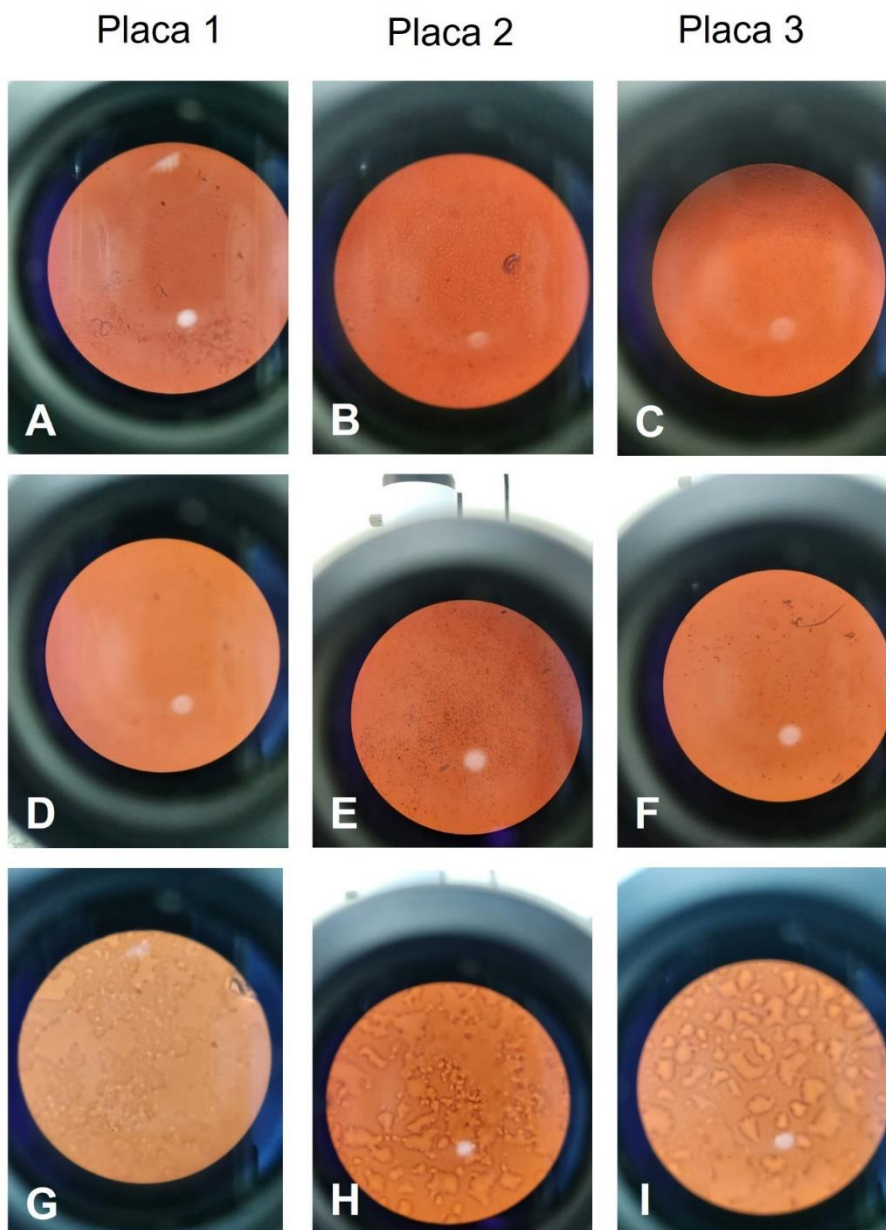
## Grupo Complexo Metálico + Eletroquimioterapia



**Figura 31** Fotomicrografias do grupo complexo metálico associado a eletroporação. A, B e C) Imediatamente após a introdução dos complexos de Ag e aplicação da eletroporação. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024.

Na avaliação do grupo submetido à eletroporação isolada (Figura 32), foi possível observar que imediatamente após a aplicação da eletroporação, as células sofreram alteração na morfologia celular, ocorrendo um processo de citomegalia (aumento no tamanho da célula). Provavelmente, a despermeabilização da membrana plasmática permitiu a passagem de solutos e solventes contidos no meio de cultivo para o meio intracitoplasmático. Aos 90 minutos, as células recuperaram sua morfologia inicial.

### Grupo Eletroporação Isolada

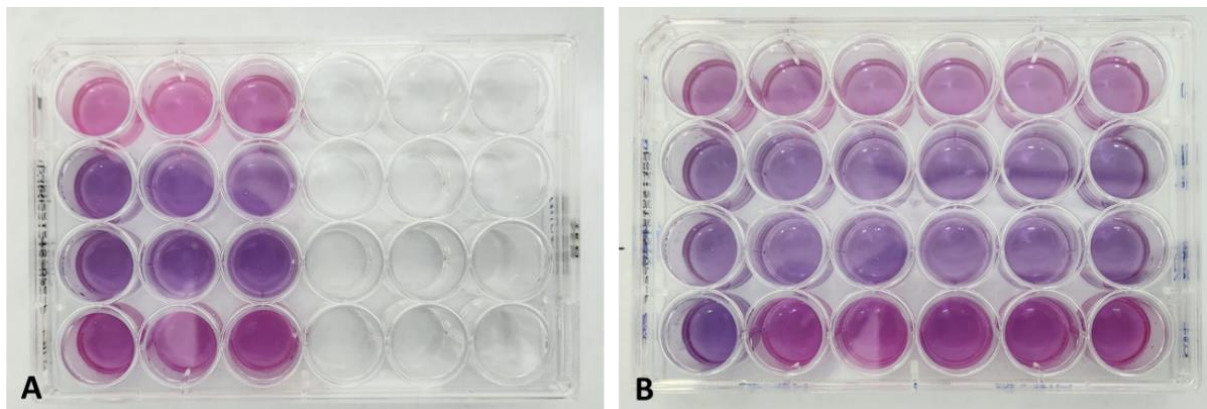


**Figura 32** Fotomicrografias do grupo eletroporação isolada. A, B, C) Imediatamente após a eletroporação. D, E e F) Após 90 minutos do início do experimento. G, H e I) Após a lavagem e limpeza dos poços com PBS. Fonte: Próprio autor, 2024

Após a lavagem dos poços com o PBS, notam-se que as células ainda estavam presentes nos poços, evidenciando que a aplicação isolada da eletroporação nas células tumorais não é suficiente para causar a morte dessas células, como também, não diminui sua capacidade de proliferação celular.

Após 24 horas o experimento foi encerrado e foi realizada a análise das placas de cultura com os poços supridos com 500  $\mu$ L de meio DMEM Low – Glucose e 100  $\mu$ L de resazurina.

A avaliação visual das placas determinou que após 24 horas, os poços do grupo controle e da eletroporação isolada apresentavam atividade celular, ou seja, as células mantinham seu metabolismo ativo. Já a avaliação dos poços nos grupos complexos metálicos e complexos metálicos associados a eletroporação, não foram observados atividade celular, uma vez que não houve alteração na coloração do meio de cultura supridos com a resazurina, evidenciando total eficácia ao tratamento realizado (Figura 33).



**Figura 33** Linha superior: Grupo controle. Segunda linha: Grupo complexo metálico. Terceira linha: Grupo complexo metálico associado à eletroporação. Linha inferior: Grupo eletroporação isolada. A) Avaliação da placa de cultura em poços após 24 horas do início do experimento do complexo Ag-Mel. B) Avaliação da placa de cultura em poços após 24 horas do início do experimento dos complexos Ag-Ten e Ag-Bio. Fonte: Próprio autor, 2024

#### **4.5 Teste da permeação in vitro, utilizando célula de Franz após a exposição aos complexos metálicos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) e aplicação da eletroporação**

Os testes de permeação in vitro de célula de Franz utilizando os complexos de Ag (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) determinaram que não houve a permeação dos agentes após a exposição da eletroporação. Para determinar esses resultados foram

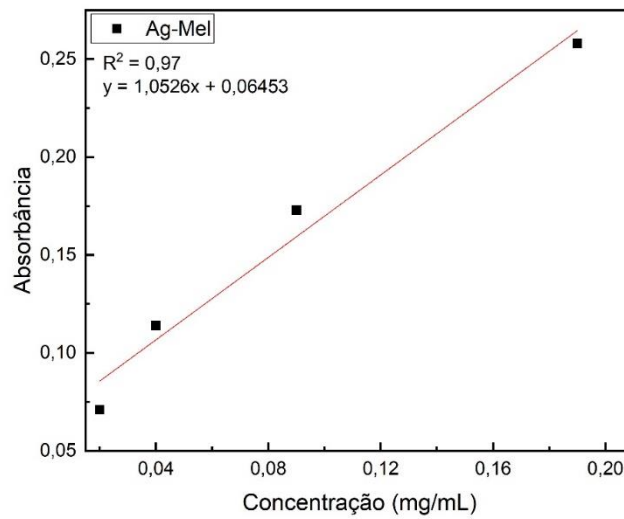
realizados dois processos: (1) as médias de absorvância do grupo controle nas amostras que receberam apenas a eletroporação contendo sobre a superfície da pele de orelha suína o gel ultrassonográfico e o  $C_3H_8O_3$ , utilizados para a diluição dos complexos; (2) as curvas padrões de cada metalofármaco isolado, em diluições seriadas, para posterior avaliação das amostras analisadas por espectrofotômetro após a aplicação da técnica da eletroporação na pele suína, exposta aos agentes sintetizados em uma concentração de 50 mg/mL, por um período total de 6 horas (Figuras 34, 35 e 36).

A média das concentrações de absorvância do grupo controle, realizadas e coletadas em triplicata foram: 0,005 nos primeiros 90 minutos; 0,005 após 180 minutos; 0,006 após 270 minutos e, por fim, 0,012 após 360 minutos.

Os resultados obtidos das amostras que receberam os agentes sintetizados associados a eletroporação foram submetidos a Lei de Lambert Beer para que chegássemos à concentração final obtida.

A curva padrão do complexo metálico Ag-Mel (Figura 34) foi realizada por espectrofotômetro UV-Vis. A concentração inicial avaliada foi a mesma utilizada na forma tópica impregnada à pele suína antes da eletroporação, de 50 mg/mL. Porém, só foi possível determinar a concentração de absorvância, em soluções a partir das diluições de 0,78 mg/mL e finalizadas na diluição de 0,02 mg/mL.

O coeficiente de determinação da regressão linear ( $R^2$ ) foi de 0,97. O coeficiente angular é de 1,0526 e o coeficiente linear de 0,06453. Com a realização da curva padrão do complexo Ag-Mel e avaliação em triplicata da absorvância das soluções avaliadas na célula de Franz, determinou-se que não houve a absorvância do agente após a aplicação da eletroporação (Tabela 4).



**Figura 34** Curva padrão do complexo Ag-Mel analisado por espectrofotômetro UV-Vis.

**Tabela 4** Concentração de absorbância das amostras analisadas do complexo Ag-Mel.

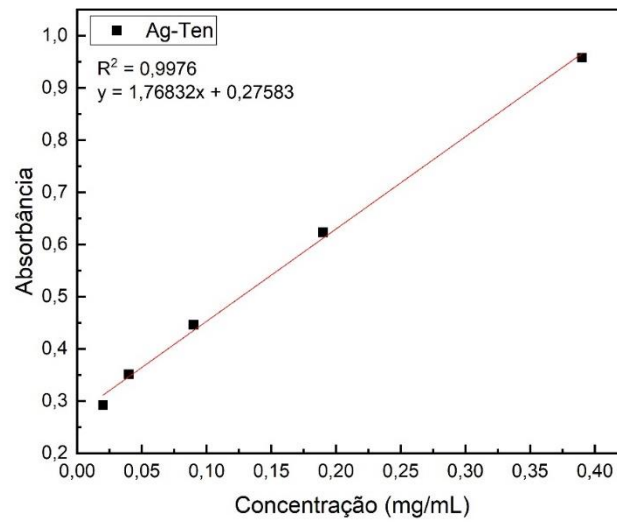
Ag-Mel		Fórmula	
Coeficiente Linear (b)	0,06453	$y = ax + b$	
Coeficiente Angular (a)	1,0526		

Ag-Mel						
Amostra	Abs			Média (y)	Concentração (x)	Concentração final
1	0,008	0,006	0,005	0,00633333	-0,055288492	0
2	0,004	0	0	0,00133333	-0,060038634	0
3	0,001	0,008	0,011	0,00666667	-0,054971816	0
4	0,005	0,029	0,031	0,02166667	-0,040721388	0

A curva padrão do complexo metálico Ag-Ten (Figura 35) foi realizada por espectrofotômetro UV-Vis. A concentração inicial avaliada foi a mesma utilizada na forma tópica impregnada à pele suína antes da eletroporação, de 50 mg/mL. Porém, só foi possível determinar a concentração de absorbância, em soluções a partir das diluições de 0,39 mg/mL e finalizadas na diluição de 0,02 mg/mL.

O coeficiente de determinação da regressão linear ( $R^2$ ) foi de 0,9976. O coeficiente angular é de 1,76832 e o coeficiente linear de 0,27583. Com a realização da curva padrão do complexo Ag-Ten e avaliação em triplicata da absorbância das soluções avaliadas na célula de Franz, determinou-se que não houve a absorbância do agente após a aplicação da eletroporação (Tabela 5).



**Figura 35** Curva padrão do complexo Ag-Ten analisado por espectrofotômetro UV-Vis

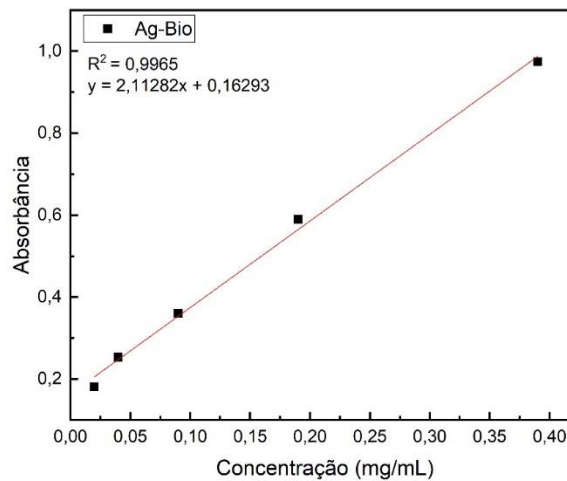
**Tabela 5** Concentração de absorbância das amostras analisadas do complexo Ag-Ten

Ag-Ten				Fórmula	$y = ax + b$	
Coeficiente Linear (b)		0,27583				
Coeficiente Angular (a)		1,76832				
Ag-Ten						
Amostra	Abs			Média (y)	Concentração (x)	Concentração final
1	0,007	0,01	0,02	0,01233333	-0,149009606	0
2	0,033	0,02	0,052	0,035	-0,136191413	0
3	0,078	0,048	0,072	0,066	-0,11866065	0
4	0,11	0,073	0,096	0,093	-0,10339192	0



A curva padrão do complexo metálico Ag-Bio (Figura 36) foi realizada por espectrofotômetro UV-Vis. A concentração inicial avaliada foi a mesma utilizada na forma tópica impregnada à pele suína antes da eletroporação, de 50 mg/mL. Porém, só foi possível determinar a concentração de absorvância, em soluções a partir das diluições de 0,39 mg/mL e finalizadas na diluição de 0,02 mg/mL.

O coeficiente de determinação da regressão linear ( $R^2$ ) foi de 0,9965. O coeficiente angular é de 2,11282 e o coeficiente linear de 0,16293. Com a realização da curva padrão do complexo Ag-Bio e avaliação em triplicata da absorvância das soluções avaliadas na célula de Franz, determinou-se que não houve a absorvância do agente após a aplicação da eletroporação (Tabela 6).



**Figura 36** Curva padrão do complexo Ag-Bio analisado por espectrofotômetro UV-Vis

**Tabela 6** Concentração de absorvância das amostras analisadas do complexo Ag-Bio

Ag-Bio				Fórmula	$y = ax + b$	
Coeficiente Linear (b)	0,16293					
Coeficiente Angular (a)	2,11282					

Ag-Bio						
Amostra	Abs			Média (y)	Concentração (x)	Concentração final
1	0,009	0,018	0,021	0,016	-0,069542129	0
2	0,011	0,049	0,053	0,03766667	-0,059287272	0
3	0,017	0,083	0,08	0,06	-0,048716881	0
4	0,046	0,113	0,112	0,09033333	-0,034360081	0

## 5. CONCLUSÕES

Foram obtidos três complexos metálicos de Ag(I) com meloxicam, tenoxicam e biotina, denominados Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio, como também, três complexos metálicos de Cu(II) com meloxicam, tenoxicam e biotina, nomeados como Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio.

O complexo Ag-Mel  $\text{AgC}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  apresentou estequiometria 1:1, Ag-Ten  $\text{AgC}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1:1, Ag-Bio  $\text{AgC}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1:1, Cu-Mel  $\text{CuC}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1:1, Cu-Ten  $\text{CuC}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1:1 e Cu-Bio  $\text{CuC}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$  1:1.

Os complexos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio apresentaram ação inibitória, in vitro, sobre as cepas de microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, evidenciando seu potencial terapêutico para o tratamento de infecções bacterianas.

Os complexos Cu-Mel, Cu-Ten e Cu-Bio não apresentaram ação inibitória, in vitro, sobre as cepas de microrganismos citadas acima. Portanto, foram excluídos dos testes de atividade antiproliferativa em células tumorais e demais testes programados até o final do projeto de pesquisa.

Os complexos Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio apresentaram atividade antiproliferativa sobre células tumorais humanas das linhagens B16 (melanoma cutâneo) e U-87MG (glioma), demonstrando resultados promissores para futura ampliação de agentes antineoplásicos.

Os complexos de prata (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) associados à eletroporação in vitro, demonstraram atividade antiproliferativa em células tumorais da linhagem B16 em um menor espaço de tempo se comparados à atividade antiproliferativa observada nas células expostas apenas aos metalofármacos isolados, evidenciando que a eletroporação é um fenômeno que associada aos agentes antitumorais sintetizados, promoveram resposta superior aos agentes isolados.

Nas células da linhagem B16 expostas ao fenômeno da eletroporação isolada, não foi observado nenhuma resposta antiproliferativa, evidenciando que a técnica aplicada isoladamente, não é capaz de promover efeitos antiproliferativos ou induzir a apoptose das células tumorais.

Os testes de permeação in vitro realizados a partir da célula de Franz demonstraram que não houve absorção dos complexos de Ag (Ag-Mel, Ag-Ten e Ag-Bio) após a realização da eletroporação.

## 6. PERSPECTIVAS

Espera-se que com essa pesquisa, possamos ir além dos resultados já obtidos neste trabalho, extrapolando os testes aqui realizados *in vitro*, para pesquisas *in vivo*. Para isso, tem-se como objetivos realizar outros testes de caracterização dos agentes sintetizados, tais como: RMN de C, H e N; espectro de massas de alta resolução; obtenção de cristais para análise de difratometria de RX e; docking molecular para avaliação de mecanismo molecular de ação. Também, iniciar os testes de toxicidade dos agentes sintetizados em tenébrios; realizar a implantação tumoral de células tumorais (B16) em camundongos, e após o crescimento tumoral, realizar o tratamento empregado neste trabalho nos animais acometidos e; iniciar os mesmos testes antiproliferativos realizados nessa pesquisa com células tumorais humanas, em células tumorais de neoplasias cutâneas caninas e felinas.

Com isso, espera-se que possamos aumentar o arsenal terapêutico contra neoplasias cutâneas em humanos e animais, para que, futuramente, elas possam ser testadas *in vivo*, tanto nos animais de companhia, como em seres humanos.

## REFERÊNCIAS

ABBEHAUSEN, C. et al. Chemical, spectroscopic characterization, DFT studies and initial pharmacological assays of a silver(I) complex with N-acetyl-L-cysteine. **Polyhedron**, v. 30, n. 4, p. 579–583, 2011.

AHIRWAR, B.; AHIRWAR, D.; JAIN, R.; AGRAWAL, B.; SAHU, P.; SAKURE, K.; BADWAIK, H. Biofabricated green synthesized hibiscus silver nanoparticles potentiated antibacterial activity and cytotoxicity in human lung cancer cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2024.

AL-HADITHY, N. et al. Patient reported outcomes in prospective cohort study of Electrochemotherapy. **International Journal of Surgery**, v. 52, p. 110–119, 2018.

ALMEIDA, S. M. V. de.; ALCANTARA, F. F.; BRITO, C. G. X. de.; SOUZA, G. C. A. de; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, V. B. R.; CARVALHO, M. S.; LIMA, M. C. A. de. Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer. **Revista de Ciências farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 35, n. 3, 2014.

ANTHONY, E. J.; BOLITHO, E. M.; BRIDGEWATER, H. E.; CARTER, O. W. L.; DONNELLY, J. M.; IMBERTI, C.; LANT, E. C.; LERMYTE, F.; NEEDHAM, R. J.; PALAU, M.; SADLER, P. J.; SHI, H.; WANG, F. X.; ZHANG, W. Y.; ZHANG, Z. Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of Discovery and development. **Chem. Sci.** n. 11, p. 12888 – 12917, 2020.

AQUARONI, N. A. S.; NAKAHATA, D. H.; LAZARINE, S. C.; RESENDE, F. A.; CÂNDIDO, A. L. P.; BARUD, H. DA S.; CLARO, A. M.; CARVALHO, J. H. DE; RIBEIRO, C. M.; PAVAN, F. R.; LUSTRI, B. C.; RIBEIRO, T. R. M.; MOREIRA, C. G.; CÂNDIDO, T. Z.; LIMA, C. S. P.; RUIZ, A. L. T. G.; CORBI, P. P.; LUSTRI, W. R. Antibacterial activities and antiproliferative assays over a tumor cells panel of a silver complex with 4-aminobenzoic acid: Studies in vitro of sustained release using bacterial cellulose membranes as support. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 212, n. September, p. 111247, 2020.

BATISTA NAPOTINIK, T.; MIKLAVCIC, D. In vitro electroporation detection methods – An overview. **Bioelectrochemistry**. v. 120, p. 166-182, 2018.

BILLER, B.; BERG, J.; GARRETT, L.; RUSLANDER, D.; WEARING, R.; ABBOTT, B.; PATEL, M.; SMITH, D.; BRYAN, C. 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. **J Am Anim Hosp Assoc**. v. 52, p. 181–204, 2016.

BRAVO-GÓMEZ, M. E.; CAMPERO-PEREDO, C.; GARCÍA-CONDE, D.; MOSQUEIRA-SANTÍLLAN, M. J.; SERMENT-GUERREIRO, J.; RUIZ-AZUARA, L. DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casoínas®) and analysis of its biological meaning. **Polyhedron**. v. 102. p. 530 – 538, 2015.

CANDIDO, T. Z.; PAIVA, R. E. F. de.; FIGUEIREDO, M, C.; COSER, L. de. O.; FRAJÁCOMO, S. C. L.; ABBEHAUSEN, C.; CARDINALLI, I. A.; LUSTRI, W. R.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G. R.; CORBI, P. P.; LIMA, C. S. P. Silver Nimesulide Complex in Bacterial Cellulose Membranes as na Innovative Therapeutic Method for

Topical Treatment os Skin Squamous Cell Carcinoma. **Pharmaceutics**, n. 462, v. 14, p. 1-18, 2022.

CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G.; TOZON, N.; MIR, L. M.; MIKLAVCIC, D.; LOWE, R.; TEISSIE, J. Electrochemotherapy in veterinary oncology, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 826-831, 2008.

CLOVER, A. J. P. et al. Electrochemotherapy for the treatment of primary basal cell carcinoma; A randomised control trial comparing electrochemotherapy and surgery with five year follow up. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 46, n. 5, p. 847–854, 2020.

DA LUZ, J. C. dos S.; VOGES, A. C.; D'AGOSTINO, L. G. Adjuvante electrochemotherapy of malignant ocular melanoma in dog. **Vet Res Forum**. v.14, n. 10, p. 575-578, 2023.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Oncologia em cães e gatos. 2. Ed. Rio de Janeiro: **Roca**, 2017, 746 p.

DE BREE, R.; WESSEL, I. Electrochemotherapy in the head and neck area: An addition to the treatment armamentarium. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 28, n. 2, p. 112–117, 2020.

DEFAZIO, S.; CINI, R. Synthesis, X-ray structural characterization and solution studies of metal complexes containing the anti-inflammatory drugs meloxicam and tenoxicam. **Polyhedron**, v. 22, n. 10, p. 1355–1366, 2003.

DJOKIC, M. et al. Electrochemotherapy as treatment option for hepatocellular carcinoma, a prospective pilot study. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 44, n. 5, p. 651–657, 2018.

DOS ANJOS, D. S.; BRUNNER, C. H. M.; CALAZANS, S. G. Eletroquimioterapia – Uma nova modalidade para o tratamento de neoplasias em cães e gatos. **Revista Investigação Veterinária**, v. 15, n. 1, 2016.

DOS ANJOS, D. S.; ROSSI, Y. A.; SIERRA, O. R.; BUENO, C. M.; DE NARDI, A. B. de.; ALVES, C. E. F. Outcome following curative-intent electrochemotherapy for extramedullary plasmocitoma in dogs – case reports. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 40, 2020.

ENGELHARDT, G. et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflammation Research**, v. 44, n. 10, p. 423–433, 1996.

ENGELHARDT, G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. **British Journal of Rheumatology**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 4–12, 1996.

ESSA, R. Z.; BRIANNA; YEO, C. I.; TEOW, S. Y. Gold complexes and their molecular targets in colorectal cancer. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 1010, 2024.

ESMAEILI, N.; FRIEBE, M. Electrochemotherapy: A Review of Current Status, Alternative IGP Approaches, and Future Perspectives. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2019, 2019.

FILHO, F. H. S.; MARTINS, R. R. R.; GEROLAMO, A. C. S.; COELHO, L. C.; SANTINI, B. B.; CAMPANELLI, E. R.; BARROS, K. M. R.; PARANHOS, S. G.; CALIXTO, L. G.; SILVA, B. V. Prevenção e diagnóstico do melanoma cutâneo: uma revisão sistemática sobre fatores de risco e estratégias eficazes. **LUMEM ET VIRTUS**. v. 15, n. 41, p. 5468 – 5482, 2024.

GOTHELF, A.; MIR, L.; GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 5, p. 371-387, 2003.

GUTIÉRREZ-SEIJO, A.; GARCÍA-MARTINEZ, E.; BARRIO-ALONSO, C.; PARRA-BLANCO, V.; AVILÉS-IZQUIERDO, J. A.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; SAMANIEGO, R. Activin a sustains the metastatic phenotype of tumor-associated macrophages and is a prognostic marker in human cutaneous melanoma. **Journal of investigative dermatology**. v. 142, n. 3, p. 653-661, 2022.

HAUCK, M. L.; OBLAK, M. L. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW AND MACEWENS. *Small Animal Clinical Oncology*, 6. Ed. St. Louis, Missouri: **Elsevier**, 2020. 865 p.

HUA, HUAI-KANG.; ZHU, HONG-MEI; ZHANG, ZHEN-GUO. Clinical significance of downregulated NISCH expression in skin cutaneous melanoma: Modulation of tumor cell invasion, migration, and EMT via PAK1 inhibition. **Tissue and Cell**. v. 88, 2024.

JOOSSE, A. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma risk: Large dutch population-based case-control study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 11, p. 2620–2627, 2009.

KUDUK-JAWORSKA, J. et al. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium(II) complexes with 2,6-dimethyl-4-nitropyridine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 8, p. 1447–1456, 2004.

LOPES, J. C.; BOTELHO, F. V.; SILVA, M. J. B.; SILVA, S. F.; POLLONI, L.; MACHADO, P. H. A.; DE SOUZA, T. R.; GOULART, L. R.; CALDEIRA, P. P. S.; MAIA, E. C. P.; MORELLI, S.; DE OLIVEIRA-JUNIOR, R. J. In vitro and in vivo antitumoral activity of a ternary copper (II) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, p. 1021-1026, 2020.

LUSTRI, W. R. et al. Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furoseimide: Prospective of application as an antimicrobial agent. **Journal of Molecular Structure**, v. 1134, p. 386–394, 15 abr. 2017.

MAHESHWARI, R. G.; TEKADE, R. K.; SHARMA, P. A. Design and in vitro characterization of biotin appended solid lipid nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 4046-4056, 2012.

MAITI, S.; PAIRA, P. Biotin conjugated organic molecules and proteins for câncer therapy: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 145, p. 206-223, 2017.

MANZANNO, C. M.; NAKAHATA, D. H.; PAIVA, R; F; de. Revisiting metallodrugs for the treatment of skin cancers. **Coordination Chemistry Reviews**. nº 468, 71 p, 2022.

MASCI, G.; PALMIERI, D.; RAGGI, M. A. Biotinylated gold and silver nanoparticles for targeting cancer cells. **Materials Science and Engineering**. v. 108, 2020.

MATHESH, A.; CARMELIN, D. S.; MOHANPRASANTH, A.; SRAVANTHY, P. G.; SNEGA, R.; SURYA, M.; SARAVANAN, M. Tridax procumbens-mediated one pot synthesis of silver-doped fucoidan nanoparticles and their antibacterial, antioxidante, and anti-inflammatory efficacy. **Biomass conversion and biorefinery**. v. 14, n. 8, 2024.

MEDICE, S.; PEANA, M.; CRISPONI, G.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; REMELLI, M.; ZORODDU, M. A. Silver coordination compounds: A new orizon in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**. p. 1-11. 2016.

MEDICE, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**. p. 1-22. 2014.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chem. Rev.** n. 114, p. 4540-4563, 2014.

MOYA-HERNÁNDEZ, M. R. et al. Speciation study of the anti-inflammatory drug tenoxicam (Htenox) with Cu(II): X-ray crystal structure of [Cu(tenox)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>].EtOH. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 2–3, p. 131–140, 2003.

MUSLU, H. et al. Synthesis, characterization, anti-inflammatory evaluation, molecular docking and density functional theory studies of metal based drug candidate molecules of tenoxicam. **Results in Chemistry**, v. 3, n. April 2020, 2021.

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 599–616, 2017.

PANA, T. et al. Centromere protein U (CENPU) enhances angiogenesis in triple-negative breast cancer by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation of COX-2. **Cancer Letter**. v, 482, p. 102-1, 2020.

PAZ, B. F.; FERREIRA, M. G. P. A.; MARTINS, K. R.; UCCELLA, L.; DE NARDI, A. B. de. Practical principles of palliative care in veterinary oncology: Alleviating the suffering of the animal, owner, and veterinarian. **Wiley**. v. 24, p. 1 – 16, 2024.

PEI, X.; HUO, F.; YUE, Y.; CHEN, T.; YIN, C. Cancer cell recognition by a Cys-reactive turn-on significant enhanced fluorescent emission targeting biotin receptors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 304, 2020.

PLASCHKE, C. C. et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. **European Journal of Cancer**, v. 87, p. 172–181, 2017.

RANGEL, M. M. M. Interferência da eletroporação sobre a expressão de conexinas. 120 f. Tese – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

RANGEL, M. M. M.; LUZ, J. C. S.; OLIVEIRA, K. D.; OJEDA, J.; FREYTAG, J. O.; SUZUKI, D. O. Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral Journal of Veterinary Sciences**. v. 51, n. 2, p. 45-51, 2019.

RANGEL, M. M. M.; LINHARES, L. C. M.; OLIVEIRA, K. D. de.; SUSUKI, D. O. H.; MAGLIETTI, F. H.; DE NARDI, A. B. de. Evaluation of the safety and feasibility of electrochemotherapy with intravenous bleomycin as local treatment of bladder cancer in dogs. **Scientific Reports**. v. 13, n. 21708, 2023.

RANGEL, M. M. M.; SUSUKI, D. O. H.; PINTARELLI, G. B. Eletroquimioterapia. In: FERREIRA, M. G. P. A.; DE NARDI, A. B. Manual prático de quimioterapia antineoplásica em cães e gatos. São Paulo: **Medvet**, 2021, 237p.

RINAILDI-NETO, F.; RIBEIRO, A. B.; FERREIRA, N. H.; SQUARISI, I. S.; OLIVEIRA, K. M.; ORENHA, R. P.; PARREIRA, R. L. T.; BATISTA, A. A.; TAVARES, D. C. Antimelanoma effect of ruthenium(II)-diphosphine complexes containing naphthoquinone ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 222, 2021.

ROCHA, C. R. R. **Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais**. 2015. 45 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ROLS, M. P.; TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. **Biophysical Journal**. v. 58, n. 5, p. 1089-1098, 1990.

ROMERO-CANELÓN, I.; SADLER, P. J. Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. **Inorg. Chem**. n. 52, p. 12276-12291, 2013.

SAMRA, M. M.; HAFEEZ, H.; AZAM, M.; IMRAN, M.; BASRA, M. A. R. Bi(III) complexes of piroxicam and meloxicam: Synthesis, characterization, antioxidant, anti-inflammatory and DNA cleavage studies. **Journal of Molecular Structure**. v. 1272, 2023.

SILVA, R. L. C. da.; KAREN, T.; BRITO, A. L. da SILVA.; FIGUEIREDO, M. A.; LINS, T. A. Infecções bacterianas em pacientes oncológicos. In: Anais da VII Mostra de Pesquisa em Ciência e Tecnologia DeVry Brasil: **DeVry Brasil**, 2016.

SINGH, A. et al. Synthesis, characterization, and in vitro antibacterial and cytotoxic study of Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) complexes of N-(4-methoxybenzyl) N-(phenylethyl) dithiocarbamate ligand. **Journal of Molecular Structure**, v. 1288, p. 135835, 15 set. 2023.



SILVEIRA, L. M. G.; BRUNNER, C. H. M.; FUTEMA, F.; CUNHA, F. M.; CALDERARO, F. F.; KOZLOWSKI, D. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizada em pele ou mucosas de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p 55-66, 2010.

SOLDERA, P. DE F.; CHAGAS, A. P. DA SILVA.; COMANDOLLI-WYREPKOWSLI, C. D.; FRANCO, A. M. R. O uso da prata da medicina: uma revisão integrativa da literatura. **European Academic Research**. v. 9, n. 3, 2021.

SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Electrochemotherapy in veterinary oncology. State-of-the-art and perspectives. **Vet Clin Small Anim**. n. 49, p. 967-979, 2019.

SPUGNINI, E. P.; FAIS, S.; AZZARITO, T.; BALDI, A. Novel instruments for the implementation of electrochemotherapy protocols: From bench side to veterinary clinic. **Journal of Cellular Physiology**. v. 232, n. 3, p. 490-495, 2016.

STEVEN STANLEY, J.; GRIFFIN, J. B.; ZEMPLIENI, J. Biotinylation of histones in human cells: Effects of cell proliferation. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 20, p. 5424–5429, 2001.

TEIXEIRA, C. F. A.; TEIXEIRA, E. I.; NASCIMENTO, J. P. C.; JÚNIOR, A. M.; PINTO, L. M. C.; CAIRES, A. R. L.; ALCANTARA, G. B.; MICHELETTI, A. C.; DEFLON, V. M.; BACK, D. F.; SILVA, H.; PIZZUTI, L.; CASAGRANDE, G. A. New binuclear copper(I) complexes with dual bioactivity: Synthesis, structural characterization and biological assays against bacteria and cancer. **Inorganica Chimica Acta**. v. 560, 2024.

TELLADO, M. N.; MAGLIETTI, F. H.; MICHINSKI, S. D.; MARSHALL, G. R.; SIGNORI, E. Electrochemotherapy in Treatment of Canine Oral Malignant Melanoma and Factors Influencing Treatment Outcome. **Radiol. Oncol**. v. 54, p. 68-78, 2020.

TESTORI, A.; TOSTI, G.; MARTINOLI, C.; SPADOLA, G.; CATALDO, F.; VERRECCHIA, F.; BALDANI, F.; MOSCONI, M.; SOTELDO, J.; TEDESCHI, I.; PASSONI, C.; PARI, C.; DI PIETRO, A.; FERRUCCI, P. F. Electrochemotherapy for cutaneous and subcutaneous tumor lesions: a novel therapeutic approach. **Dermatologic Therapy**, v. 23, n. 6, p. 651-661, 2010.

VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. Introduction. In: WITHROW AND MACEWENS. Small Animal Clinical Oncology, 6. Ed. St. Louis, Missouri: **Elsevier**, 2020. 865 p.

WATERS, J. E. et al. Recent advances in the development of metal complexes as antibacterial agents with metal-specific modes of action. **Current Opinion in Microbiology**, v. 75, p. 102347, 1 out. 2023.

WOLFESBERGER, B. et al. Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 3, p. 308–316, 2006.

YANG, Y.; FAN, H. H.; GUO, Z. J. Modulation on metal homeostasis for cancer therapy. **Chempluschem**. v. 89, n. 6, 2024.

YANG, A. L.; SUN, S. B.; QU, L. Y.; LI, X. Y.; LIU, J. L.; ZHOU, F.; XU, Y. J. Polysaccharide hydrogel containing silver nanoparticle@catechol microspheres with photothermal, antibacterial and anti-inflammatory activities for infected-wounds repair. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 265, n. 2, 2024.

YUAN, X.; LIU, Y. Biotinylated copper nanoparticles for selective targeting of cancer cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, p. 874-884, 2017.

ZHANG, X. et al. Cu(II) and Zn(II) crystal complexes based on pyrazolone: Synthesis and application as antibacterial agents. **Inorganica Chimica Acta**, v. 556, p. 121618, out. 2023.

ZEMPLANI, J.; WIJERATNE, S. S. K.; HASSAN, Y. I. Biotin. **Advances in Nutrition and Cancer**. V. 6, p. 137-148, 2009.