



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e

Inovação Tecnológica de Medicamentos

Tese de Doutorado

**Desenvolvimento de Novos Agentes
Antineoplásicos Platínicos Conjugados a Matrizes
Inócuas**

Ludhimilla Suellen Gomes Lins de Lima

Recife-PE

Julho/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e

Inovação Tecnológica de Medicamentos

**Desenvolvimento de Novos Agentes Antineoplásicos Platínicos
Conjugados a Matrizes Inócuas**

Ludhimilla Suellen Gomes Lins de Lima*

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos da UFRPE como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Mônica Freire Belian

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Eduardo Silva

*Bolsista CAPES

Recife – PE

Julho/2016

Ficha catalográfica

L732d Lima, Ludhimilla Suelen Gomes Lins de
Desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos platínicos
conjugados a matrizes inócuas / Ludhimilla Suelen Gomes Lins de
Lima. – Recife, 2016.
92 f. : il.

Orientadora: Mônica Freire Belian.
Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica
em Medicamentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Ciências Moleculares, Recife, 2016.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Câncer 2. Platina 3. Levanam 4. Agentes antitumorais
5. Toxicidade I. Belian, Mônica Freire, orientadora II. Título

CDD 615.19

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e
Inovação Tecnológica de Medicamentos

**“Desenvolvimento de Novos Agentes Antineoplásicos Platínicos
Conjugados a Matrizes Inócuas”**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo,
sob a presidência do primeiro, considera a doutoranda
LUDHIMILLA SUELLEN GOMES LINS DE LIMA como:

Recife, 29 de Julho de 2016.

**Prof^a. Mônica Freire Belian
(Orientadora)
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Prof. Clécio Souza Ramos
(Membro Interno)
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Prof. André Galembeck
(Membro Externo)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof.^a Dr.^a Jaciana dos Santos Aguiar
(Membro Externo)
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. João Rufino de Freitas
(Membro externo)
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

Ao meu esposo Luiz Otávio com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos meus pais João e Sueli. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço ao meu esposo, Luiz Otávio, por estar ao meu lado e nunca me deixar fraquejar. Essa conquista é nossa.

Agradeço aos meus pais amados, João e Sueli, se há algo que faz diferença na formação da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe. Vocês me educaram com amor e me incentivaram de todas as formas.

Ao meu irmão Windson e sua esposa Cristiane. Por estarem ao meu lado sempre me incentivando, por serem meus amigos pra todas as horas e por terem me dado o melhor presente que poderia receber: meu sobrinho, João Henrique.

Aos meus professores Mônica Belian e Wagner Silva, pela orientação, pela confiança, pela ajuda em diversos momentos e pelos ensinamentos que levarei para toda vida.

Aos Professores Valdemiro Júnior e Terezinha Gonçalves pelas análises.

A Jaciana Aguiar, Isla bastos, Tatiane Bezerra, Jonathan e Anne pela fundamental ajuda no biotério.

Meu agradecimento especial ao CETENE e, principalmente aos usuários do Laboratório de Bioprocessos (LABIO). Aos queridos Isaac e Aldenise por toda ajuda.

Aos meus queridos amigos Danielle Neves e Rômulo Lins, pela parceria nos trabalhos, pelo incentivo diário, companheirismo nas horas difíceis, sinceridade e honestidade nos momentos onde o “bicho pegou”. Pelas conversas malucas. Obrigada.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, aos meus colegas de doutorado, meus colegas do LAQIS (Amanda, Lidiane, Gabriela Bezerra, Gabriela Sá, Nayara, Paulo, Leonardo, Natany, Natália, José, Carine, Jamerson e Renê) e de UFRPE (Gian, Patrícia e Fabiana).

Ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos.

Ao apoio financeiro da Capes. Obrigada!

“Vigie seus pensamentos, pois eles se tornam palavras. Vigie suas palavras, pois elas se tornam ações. Cuidado com suas ações, porque elas se tornam hábitos. Cuidado com seus hábitos, porque eles formam seu caráter. Vigie seu caráter, pois ele será o seu destino. O que pensamos, nos tornamos.”

-Frank Outlaw

RESUMO

O câncer está entre as doenças que mais leva a óbito no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Nessa conjuntura, a atual terapia antineoplásica continua apresentando obstáculos quanto à toxicidade e seletividade, o que demonstra a relevância quanto ao estudo de novos agentes quimioterápicos. Com o objetivo de sintetizar novas composições farmacológicas destinadas ao tratamento do câncer, este trabalho se propôs a desenvolver novos complexos de platina associados à levana. Após a síntese os complexos foram caracterizados via análise elementar, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta, e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Os dados de espectroscopia de ultravioleta e infravermelho sugerem que os ligantes encontram-se coordenados aos íons de platina. A RMN indica que para o complexo LSGLL01 o ligante encontra-se coordenado a um mesmo centro metálico, uma molécula de água e um cloreto. A estrutura molecular do complexo LSGLL02 demonstrou a formação de um composto binuclear onde um ligante encontra-se coordenado em ponte. As novas composições foram submetidas a ensaios de citotoxicidade *in vitro*, toxicidade aguda e de atividade antitumoral dentro de uma faixa terapêutica. Segundo a experimentação animal, com base no Protocolo 423 da OECD, os compostos LSGLL01 e LSGLL02 enquadram-se na categoria 2 (toxicidade moderada). Os ensaios de atividade antitumoral (*in vivo*) via intraperitoneal, frente a tumor do tipo sarcoma 180 (S-180), implantados subcutaneamente na região subaxilar de camundongos machos albinos suíços (*Mus Musculus*) apresentou um percentual de inibição tumoral (TWI%) para o grupo padrão (tratado com cisplatina comercial) de 22,6%. Os compostos desenvolvidos LSGLL01 e LSGLL02 apresentaram (TWI%) de 47 e 48%, respectivamente. Os complexos apresentaram melhor atividade antitumoral, ou seja, maior percentual de inibição tumoral frente às células de tumores S-180, quando comparado com a Cisplatina. O efeito do tratamento sobre os parâmetros hematológicos dos animais dos grupos tratados se apresentaram dentro da normalidade, não demonstrando mielossupressão, além da não observação de metástases.

Palavras-Chave: Câncer, Platina, Levana, Agentes antitumorais, Toxicidade.

ABSTRACT

Cancer is amongst the most deadly diseases around the world, only behind cardiovascular disease and AIDS. In Brazil, this situation is alarming due to the increased population-aging trend, age group with the highest incidence of cancer. At this juncture, the current antineoplastic therapy continues to show obstacles for toxicity and selectivity; demonstrating the relevance as the study of new chemotherapeutic agents. In order to synthesize new pharmaceutical compositions for the treatment of cancer, this work has proposed to develop new platinum-based drugs in therapy associated with levan. After synthesis of these compounds, they were characterized by infrared spectroscopy in the region of nuclear magnetic resonance (NMR) and ^1H and ^{13}C . The spectroscopic data in the ultraviolet and infrared spectra suggest that the ligands are coordinated to the platinum ions. The characterization analyzes by NMR indicates that for LSGLL01 complex input ligand is coordinated to the same metal center (chelated) and one water molecule is coordinated (the 1st coordination sphere) in place of one of the chlorides platinum compound. The molecular structure of complex LSGLL02 demonstrated the formation of a binuclear compound where the ligand is coordinated bridge. The new compositions were exposed to *in vitro* cytotoxicity tests, acute toxicity and antitumor activity within a therapeutic range. According to animal experiments, based on protocol 423 of the OECD, the LSGLL01 and LSGLL02 compounds fall under category 2. The antitumor activity tests (*in vivo*) intra-peritoneally against tumor of type sarcoma 180 (S-180) implanted subcutaneously in sub-axillary region of male albino Swiss mice (*Mus Musculus*) showed a percentage of tumor weight inhibition (TWI%) for the standard group (treated with commercial cisplatin), 22.6%. The compounds developed LSGLL01 and LSGLL02 showed (TWI%) of 47 and 48%, respectively. The complex showed better antitumor activity, i.e., higher percentage of tumor cell inhibition against S-180 tumors cell lines when compared to CDDP. The effect of treatment on hematological parameters of the animals treated groups were shown within the normal range, not showing myelosuppression, besides the non-observation of metastases.

Keywords: Cancer, Platinum, Levan, antitumor agents, toxicity.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO I- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
1. CÂNCER	17
2. COMPOSTOS A BASE DE PLATINA	26
3. LEVANA	37
CAPÍTULO II- METODOLOGIA	39
4. SOLVENTES E REAGENTES	39
5. COMPLEXOS DE PLATINA	39
5.1 Tetracloroplatinato de Potássio $K_2[Pt(Cl)_4]$	39
5.2 Síntese de LSGLL01	40
5.3 Síntese de LSGLL02	40
5.3.1 Síntese de <i>cis</i> -diiododiaminplatina (II)	40
5.3.2 Síntese de LSGLL02 a partir do <i>cis</i> - diiododiaminplatina (II)	41
6. PRODUÇÃO DE LEVANA	41
6.1 Microrganismo	41
6.2 Preparo dos meios de cultura	41
6.2.1 Agar Nutritivo (AN)	42
6.2.2 Meio de cultura SDL	42
6.2.3 Meio de pré-fermentação	42
6.2.4 Meio de fermentação	43
6.3 Centrifugação e filtração do meio de fermentação	43
6.4 Fracionamento da levana produzida por precipitação	44
7. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	44
7.1 Análise elementar	44
7.2 Análise termogravimétrica	45
7.3 Espectroscopia de absorção eletrônica UV/Visível	45
7.4 Espectroscopia na região do infravermelho	45
7.5 Medidas de Ressonância Magnética Nuclear 1H e ^{13}C	45
7.6 Difractometria de raio-X	46
8. ENSAIOS BIOLÓGICOS	46
8.1 Estudo de citotoxicidade (<i>in vitro</i>)	46
8.2 Toxicidade aguda (Ensaio <i>in vivo</i>)	47
8.2.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	48
8.2.2 Análise histopatológica	48
8.3 Avaliação da atividade antitumoral	48

CAPÍTULO III- RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
9. SÍNTESE DE COMPLEXOS DE PLATINA	50
10. SÍNTESE DE LSGLL01	50
11. SÍNTESE DE LSGLL02	54
12. LEVANA	56
13. ENSAIOS BIOLÓGICOS	56
13.1. Estudo de Citotoxicidade (<i>in vitro</i>)	59
13.2. Toxicidade aguda (Ensaio <i>in vivo</i>)	60
13.2.1. Parâmetros bioquímicos e hematológicos	62
13.2.2. Análise histopatológica	65
13.3. Avaliação da atividade antitumoral	65
CAPÍTULO IV- CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO V- PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE 1 – Resultados bioquímicos para teste antitumoral	89
APÊNDICE 2 – Pedido de proteção individual BR102016 0116422	91
APÊNDICE 3 – Pedido de proteção individual BR1020160123310	92

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estrutura da cisplatina.	28
Figura 2. Principais ligações formadas na interação da cisplatina com o DNA.	30
Figura 3. Estrutura dos Análogos da Cisplatina.	31
Figura 4. Representação esquemática da biossíntese de levana a partir de sacarose.	35
Figura 5. Estrutura molecular da levana. Representação esquemática da levana linear (A) e ramificada (B).	36
Figura 6. Esquema representativo da produção de levana	44
Figura 7. Reação de síntese do complexo tetracloroplatinato (II) de potássio, partindo do complexo hexacloroplatinato (IV) de potássio.	50
Figura 8. Difratoograma de raios-X do tetracloroplatinato de potássio sintetizado.	50
Figura 9. Reação de síntese do complexo LSGLL01.	51
Figura 10. Espectros de infravermelho para o 1,2-ditioetano e do composto LSGLL01.	51
Figura 11. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H para LSGLL01, realizado em metanol- d_4 .	52
Figura 12. Espectro de absorção dos complexos $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (em preto) e LSGLL01 (em vermelho) sobrepostos (região de 300-700nm).	53
Figura 13. Espectros de absorção do complexo LSGLL01 (em vermelho) e do ligante 1,2-ditioetano (em preto) sobrepostos (região de 200-400nm).	53
Figura 14. Reação de síntese do complexo LSGLL02.	54
Figura 15. Espectros de infravermelho do ligante 2 e do complexo LSGLL02, sobrepostos.	54
Figura 16. Espectros de absorção dos complexos $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (em preto) e LSGLL02 (em vermelho) sobrepostos (região de 300-700 nm).	55
Figura 17. Espectro de absorção do complexo LSGLL02 (em vermelho) e do ligante 2 (em preto) sobrepostos (região de 200-400 nm).	56
Figura 18. Espectro de infravermelho da levana F70.	57
Figura 19. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H para Levana F70.	58

Figura 20. Dados de ^1H RMN por ERGINER et al (2016).	58
Figura 21. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C em D_2O para Levana F70.	59
Figura 22. Esquema do protocolo OECD utilizado para determinação de letalidade dos compostos.	61
Figura 23. Concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, TGO e TGP de camundongos	63
Figura 24. Concentrações sanguíneas de parâmetros hematológicos camundongos durante toxicidade aguda para os compostos Cisplatina, LSGLL01, LSGLL02, levana e grupo controle.	65
Figura 25. Massa média dos tumores de cada grupo avaliado e os desvios padrões.	67
Figura 26. Sarcomas 180 extraídos do grupo controle.	68
Figura 27. Sarcomas 180 extraídos da Cisplatina (A), LSGLL01 (B) e LSGLL02(C).	68
Figura 28. Parâmetros hematológicos dos animais do grupo tratado e do grupo controle.	69
Figura 29. Massa média dos órgãos e tumores dos animais na avaliação da atividade antitumoral.	69
Figura 30. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo controle (sem tratamento).	70
Figura 31. Massacorpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com cisplatina CDDP.	71
Figura 32. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com LSGLL01.	71
Figura 33. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com LSGLL02.	72
Figura 33. Bioquímico teste antitumoral.	72
Figura 34. Resultados bioquímicos do teste antitumoral.	72
Figura 35. Estrutura molecular proposta para ação do fármaco LSGLL01 na base nitrogenada (Guanina). LSGLL01 reagindo com os Nitrogênios 7 (N7) da base nitrogenada. Sua ação intra-fita e inter-fita do DNA.	75
Figura 36. Estrutura molecular proposta para ação do fármaco LSGLL02 na base nitrogenada (Guanina). LSGLL02 reagindo com os Nitrogênios 7 (N7) da base nitrogenada na fita do DNA.	77

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Pág.
Tabela 01. Usos clínicos dos agentes antineoplásicos.	23
Tabela 02. Percentual de inibição tumoral <i>in vitro</i> .	60
Quadro 01. Relações entre o ciclo celular e principais agentes antineoplásicos.	22
Quadro 02. Solventes e reagentes utilizados neste trabalho com sua procedência comercial.	39
Quadro 03. Reagentes utilizados para o meio Agar nutritivo e suas respectivas concentrações.	42
Quadro 04. Reagentes utilizados para o meio SDL e suas respectivas concentrações.	42
Quadro 05. Reagentes utilizados para o meio de Pré-fermentação e suas respectivas concentrações.	43
Quadro 06. Reagentes utilizados para o meio de fermentação e suas respectivas concentrações.	43
Quadro 07. Resultados de toxicidade aguda, segundo OECD.	61
Quadro 08. Massa média dos tumores (MMT) para os diferentes grupos de animais.	66
Quadro 09. Percentual de inibição tumoral frente ao tratamento com cisplatina, LSGLL01 e LSGLL02.	67

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é um grupo de doenças que envolve a divisão celular descontrolada, imortalidade replicativa e resistência celular à morte. As células cancerosas crescem em uma “massa” de células anormais chamada de tumor, exceto para cânceres hematológicos, onde as células cancerosas crescem e se espalham ao longo dos sistemas sanguíneos e linfáticos e da medula óssea.^{1,2} As neoplasias malignas são a segunda causa mundial de morte, superado apenas pelas doenças cardiovasculares. É caracterizada por proliferação celular descontrolada que gera uma massa celular anormal ou um tumor. Este tumor primário cresce devido à nova vascularização e, com o tempo, adquire potencial metastático podendo se propagar para outras partes do corpo, o que faz com que a metástase ocorra, levando muitas vezes os pacientes à morte. O câncer é causado por danos ou mutações no material genético das células, devido a questões ambientais ou fatores genéticos. Enquanto a cirurgia e radioterapia são os tratamentos primários usados para cânceres locais não-metastáticos, a quimioterapia antineoplásica (hormonais, biológicas, etc) é desde a década de 90 a escolha utilizada em cânceres metastáticos.³

A quimioterapia pode ser baseada na inibição da divisão das células em rápido crescimento, que é uma característica das células cancerosas, mas, infelizmente, também afeta as células normais com taxas de proliferação rápida, tais como os folículos pilosos, a medula óssea e as células do trato gastrointestinal, gerando efeitos secundários característicos.²

Desde as primeiras drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de cânceres hematológicos e tumores sólidos, nos anos quarenta e cinquenta do século XX (mostardas, drogas antifolato, metotrexato, etc.), as drogas

¹RUBIN, E.; RUBIN, R.; AARONSON, S. Neoplasia. Em *Bases clinicopatológicas da medicina*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. P. 172.

²PARDEE, A.B. Cell fates. Em: *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*. PARDEE, A.B.; STEIN, G.S. Nova York: Springer, 2004, p. 60-96.

³MCKINNELL, R.G.; PARCHMENT, R.E.; PERANTONI, A.O.; PIERCE, G.B.; DAMJANOV, I. *The Biological Basis of Cancer*. Cambridge (United Kingdom), Cambridge University Press, 1998. p. 1-100.

para quimioterapia evoluíram para tratamentos cada vez mais eficazes.^{4,5,6} Apesar de avanços importantes no tratamento do câncer, tais como quimioterapias combinatórias e adjuvantes^{7,8}, ou a aprovação de importantes medicamentos anticancerígenos tais como cisplatina⁹ e paclitaxel¹⁰, a destruição indiscriminada de células e a toxicidade dos agentes quimioterapêuticos, foram, durante muitos anos a única abordagem possível para o tratamento da doença em fase metastática. Esta inespecificidade e a terapia pouco ideal mudou com a descoberta das redes de sinalização celulares envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, que permitiu o desenho de drogas que afetam especificamente essas redes, e abriu a porta para o uso da terapia-alvo, no final dos anos 1990.⁴

A toxicidade dos fármacos quimioterapêuticos usuais, bem como o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas, apoiam a necessidade de encontrar novos tratamentos eficazes orientados com base nas alterações na biologia molecular das células tumorais.^{11,12}

Neste trabalho, foram sintetizadas composições quimioterápicas à base de platina e de levanacom a finalidade de reduzir os efeitos colaterais dos fármacos existentes com esse metal aumentando a eficácia do fármaco através do efeito sinérgico para atuarem orientados à finalidade antineoplásica.

⁴CHABNER, B.A.; ROBERTS JR.T.G. Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v. 5, p. 65–72, 2005.

⁵PAPAC, R.J. Origins of cancer therapy. *J. Biol. Med. Yale*, v. 74, p. 391–398, 2001.

⁶LI, M.C., HERTZ, R.; BERGENSTAL, D.M. Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *J. Med. N. Engl.*, v. 259, p. 66–74, 1958.

⁷DEVITA JR, V.T., SERPICK, A.A.; CARBONE, P.P. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann. Intern. Med.* v. 73, p. 881–895, 1970.

⁸JAFFE N., E. FREI 3RD, D. TRAGGIS, Y. BISHOP, Adjuvant methotrexate and citrovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma, *N. Engl. J. Med.*, v. 291, p. 994–997, 1974.

⁹BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E.; CHRISTOFIS, P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy*, v. 5, p. 537–583, 2007.

¹⁰GOODMAN, J.; WALSH, V. The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-cancer Drug, Cambridge University, Cambridge, 2001.

¹¹POLLOCK, P.M.; MELTZER, P.S. Cancer: lucky draw in the gene raffle. *Nature*, v. 417, p. 906–907, 2002.

¹²HANAHAN, D.; ROBERT A. WEINBERG, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, p. 646–674, 2011.

OBJETIVO GERAL

Sintetizar novas composições quimioterápicas à base de compostos de coordenação de platina e levana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir/obter, por via microbiana, a levana.
- Caracterizar o polissacarídeo.
- Sintetizar e caracterizar complexos de platina(II) (Tetracloroplatinato de potássio) e platina (IV) (Hexacloroplatinato de potássio).
- Determinar metodologias eficazes para a conjugação dos agentes antineoplásicos e sua purificação, deixando-os em condições para uso clínico;
- Realizar experimentação animal, investigando a toxicidade dos sistemas conjugados através da determinação da letalidade definida por protocolo da OECD (2001);
- Verificar os resultados finais da pesquisa (atividade antitumoral da formulação proposta), avaliando o mercado para o produto final, composição e processos.

CAPÍTULO I- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. CÂNCER

Uma neoplasia (do grego, *neo*, novo + *plasma*, coisa formada) é o crescimento autônomo de tecidos que escaparam das restrições normais da proliferação celular e exibem graus variáveis de fidelidade a seus precursores.¹

A neoplasia maligna é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer de origem latina (*cancer*) significando "caranguejo", que foi empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção.¹³

O câncer compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.¹⁴

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele, porque esta é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciamos diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases).¹⁵

¹³ALMEIDA, V. L. DE; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. *Química nova*, São Paulo, vol.28, n.º.1 Jan./Feb. 2005.

¹⁴http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322, acessada em Junho, 2016.

¹⁵PEREZ-HERRERO, EDGAR., ALBERTO FERNANDEZ-MEDARDE. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 93, p. 52–79, 2015.

Processos de desenvolvimento do câncer são originados principalmente por danos ou mutação de proto-oncogenes que codificam proteínas implicadas na indução da proliferação e diferenciação celular, e um gene supressor tumoral que codifica proteínas que produzem sinais inibitórios do crescimento celular e/ou que estimulam a apoptose. Alterações em ambos os oncogenes e genes supressores de tumores são necessárias para o desenvolvimento do tumor e são favorecidos pela susceptibilidade dos genes dos tumores sofrerem mutações, que codificam uma família de proteínas implicadas na controle de danos ao DNA. As mutações que iniciam um tumor são selecionadas para favorecer a divisão celular anormal e descontrolada, a ausência de inibição do crescimento celular excessivo, o bloqueio do sistema imunológico e da morte celular, e a transmissão e acúmulo de erros genéticos materiais.^{16,17,18}

O processo de carcinogênese^{14,19,21}, ou seja, de formação do câncer, em geral dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor:

- **Estágio de iniciação:** É o primeiro estágio da carcinogênese, onde as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico (agente onco-iniciador) que provoca modificações em alguns dos genes. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente.

- **Estágio de promoção:** As células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como onco-promotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio.

- **Estágio de progressão:** É o terceiro e último estágio, e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

¹⁶CROCE, C.M. Oncogenes and cancer, *N. Engl. J. Med.* v. 358, p. 502–511, 2008.

¹⁷KRUG, U.; GANSER, A.; KOEFFLER, H.P.; Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis, *Oncogene*, v. 21, p.3475–3495, 2002.

¹⁸KUFE, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHELBAUM, R.R.; BAST, R.C.; GANSLER, T.S.; HOLLAND, J.F.; FREI (EDS.) HOLLAND, F.R. *Cancer Medicine*, sixth ed., BC Decker Inc., 2003, p. 86–102.

¹⁹FOYE, W. O.; SENGUPTA, S. K. Em *Principles of Medicinal Chemistry*; FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, 1996, p. 822-845.

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos²⁰. O fumo por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese. O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que pode se chamar de classificação primária^{14,19,20}.

Sobre a classificação primária do câncer, quase todos os tipos podem ser colocados em um dos seguintes grupos, onde o sufixo *-oma* significa tumor:

1) Carcinomas: São os tipos mais comuns de câncer, originando-se de células que revestem o corpo, incluindo a pele (ectodermis) e uma série de revestimentos internos (endodermis), como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas²¹. Há também os carcinosarcomas, tumores geralmente de alta malignidade, derivados de dois tipos de tecidos embrionários, e os teratomas, derivados de três tipos de tecidos embrionários¹⁴.

2) Sarcomas: Originam-se de tecidos de suporte em vez dos de revestimento, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço, encontrados na maior parte do corpo.

3) Linfomas: Originam-se de células conhecidas como linfócitos, encontradas em todo o organismo, particularmente em glândulas linfáticas e sangue. Os linfomas são divididos em Hodgkin e não-Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada.

4) Leucemia: Este câncer origina-se de células da medula óssea que produzem as células sanguíneas brancas. Na leucemia ocorre uma concentração muito elevada de glóbulos brancos (de cerca de $7,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ para 10^5 - $10^6/\text{mm}^3$)²² causando problemas nos quais as células anormais não funcionam apropriadamente, além de restringirem o espaço da medula óssea para que novas células sejam produzidas.

5) Mielomas: Malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos.

²⁰SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em *Oncology*; JONHSTON, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132.

²¹MURAD, A.M.; KATZ, A. *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, 1996, p. 41.

²²MACHADO, A. E. D.; *Quim. Nova*, v. 23, p. 237, 2000.

6) Tumores das células germinativas: Desenvolvem-se a partir de células dos testículos e/ou dos ovários, responsáveis pela produção de espermatozoides e óvulos.

7) Melanomas: Originam-se das células da pele que produzem pigmento, os melanócitos.

8) Gliomas: Originam-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal. Raramente ocorre metástase.

9) Neuroblastomas: Tumor geralmente pediátrico (8 milhões de crianças até 15 anos de idade por ano; 80% dos casos com até 4 anos de idade) derivado de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais, desde gânglios simpáticos até medula adrenal e outros pontos.²⁰

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia.^{19,21} Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP)²³ e a imunoterapia²⁴, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais de um tipo de tratamento.

Com esses métodos de tratamento citados, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), que são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase por ocasião do tratamento. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos com a quimioterapia, que será abordada mais detalhadamente neste trabalho.^{20,23,24}

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais^{21,23,24}, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções²³.

²³MACHADO JUNIOR, J. C. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. Supl., p. 645-55, Dez. 2006.

²⁴SALMONM, S.E. Em: *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.

Porém, o corpo (em alguns casos) recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável.^{19,21,24} Um fator importante para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (entre 10^9 e 10^{12} células tumorais, ou seja, tumor com tamanho inferior a 1 cm).²⁰

Assim, é desejável na quimioterapia usar doses mais altas, capazes de atingir o maior nível de morte celular possível; considerando-se um tumor de 1 g (cerca de 10^9 células) cada ciclo de terapia mata cerca de 99% das células; é imprescindível repetir-se o tratamento em múltiplos ciclos para matar todas as células tumorais²⁵. Porém, em tumores maiores, por exemplo de 100 g (10^{11} células), mesmo com a eficiência do agente antineoplásico de 99,9%, ainda tem-se um número alto de células cancerosas para a continuidade eficiente do tratamento, o que corrobora a necessidade premente do diagnóstico neoplásico precoce. Nos casos mais favoráveis, com a quimioterapia atual, pode-se obter maior expectativa de vida, tendo-se em diversos casos até cerca de 66% de pacientes livres do câncer por mais de 10 anos. Muitos estudos foram feitos para a maior eficiência da quimioterapia e a combinação de diversos agentes antineoplásicos, tendo-se conseguido bons resultados com índices de cura de 75 a 90% em diversos tipos de câncer.¹³

Estas novas terapias direcionadas, de interesse crescente como evidenciado pela aprovação nos últimos anos dos medicamentos por órgãos como o FDA, onde possuam alvo contra o câncer, visam as vias de transdução biológica e/ou proteínas cancerígenas específicas para induzir a morte de células cancerosas por via de apoptose e a estimulação do sistema imunológico, ou especificamente entregar agentes quimioterapêuticos para células cancerígenas, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis.¹⁵

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS) (Quadro 1). Outro grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), tem a capacidade de atuar nas células tumorais

²⁵CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.

independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G^0 (Quadro 1)^{21,24,25}.

Quadro 1. Relações entre o ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos.

Agentes ciclo-celular específicos (CCS, "Cell Cycle-Specific")		Agentes ciclo-celular não específicos		
Agentes Antimetabólicos	Análogo do ácido fólico Antagonistas das pirimidinas Análogos das purinas e inibidores correlatos	Produtos Naturais	Antibióticos naturais	Antraciclinas Mitomicina Dactinomicina Plicamicina Bleomicina
	Agentes hormonais			Alcalóides pirrolizidínicos
Adrenocorticosteróides Progestinas Estrógenos Androgênios Anti-estrogênio Antiandrogênio Análogo do hormônio liberador de gonadotropina Inibidor da aromatase Inibidor do hormônio peptídico		Complexos de Coordenação de Platina	Cisplatina (CDDP) Carboplatina	
Produtos Naturais	Alcalóides vegetais	Agentes Alquilantes Diversos	Mostardas nitrogenadas Nitrossuréias Triazenos Alquil sulfonatos	
	Alcalóides da vinca Podofilotoxinas (Epipodofilotoxina) Paclitaxel (Taxol)			
	Enzimas			

Fonte¹³/ Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Esta relação descrita demonstra que a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia antineoplásica é muito grande. As aplicações farmacológicas dos agentes quimioterápicos antineoplásicos mais utilizados, mostrando as nomenclaturas científicas destes agentes e correlacionando-os com as principais aplicações em tipos de neoplasias específicas, podem ser verificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Usos clínicos dos agentes quimioterápicos antineoplásicos.

Tipos de Neoplasias		Usos clínicos dos agente antineoplásicos
Carcinomas	De mama	Melfalam, ciclofosfamida, mitomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, podofilotoxinas (etoposida e teniposida), vimblastina, vincristina, antiandrogênicos, antiestrogênicos, estrogênicos, metotrexato; taxol (casos avançados)
	De ovário	Ifosfamida, <i>cisplatina</i> , melfalam, clorambucil, fluorouracil, doxorrubicina, vincristina, tamoxifeno
	Endometrial	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , doxorrubicina, ciclofosfamida, isofosfamida, progestina, estrogênicos, anti- estrogênicos
	De cólon	Ciclofosfamida, fluorouracil
	De próstata	Fluorouracil, anti-androgênio, prednisona, doxorrubicina, hidroxiuréia, progestinas, estrogênicos, androgênicos, leuprolida, aminoglutetimida
	De testículo	<i>Cisplatina</i> , plicamicina, dactinomicina, podofilotoxinas, ciclofosfamida, metotrexato, vimblastina, bleomicina, doxorrubicina
	De bexiga	<i>Cisplatina</i> , doxorrubicina, vimblastina
	De pâncreas	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , mitomicina, fluorouracil
	De estômago	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , mitomicina, fluorouracil, Carmustina
	De esôfago	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , mitomicina, doxorrubicina
	Gastrointestinal	Mitomicina
	De cabeça e pescoço	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , doxorrubicina, fluorouracil, vincristina, vimblastina, bleomicina, metotrexato
	De cérvix	<i>Cisplatina</i> , doxorrubicina, mitomicina, vincristina, bleomicina
	De tireóide	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , melfalam, bleomicina, fluorouracil
De pulmão	<i>Cisplatina</i> , <i>carboplatina</i> , doxorrubicina, mitomicina, vincristina, vimblastina, podofilotoxinas	
De garganta e boca	<i>Cisplatina</i> e doxorrubicina	
Sarcomas	<i>Cisplatina</i> , ciclofosfamida, doxorrubicina, dactinomicina, podofilotoxinas, metotrexato, ciclofosfamida, vincristina, vimblastina	
Linfoma	Doxorrubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, vincristina, vimblastina, podofilotoxinas, pentostatina (células T), prednisona, citarabina, bleomicina, mecloretamina, dacarazina, carmustina	
Melanoma	Mitomicina e dacarbazina	
Neuroblastoma	Ciclofosfamida, dactinomicina, doxorrubicina, vimblastina	
Glioma	Tioguanina, citarabina, podofilotoxinas	
Leucemias	Linfocítica	Vincristina (casos agudos), clorambucil, metotrexato, prednisona, carmustina (aguda e crônica), doxorrubicina
	Mieloblástica	Tioguanina, citarabina, podofilotoxinas
	Linfoblástica	Vincristina, podofilotoxinas
	Mielocítica	Metotrexato, vincristina, mercaptopurina, hidróxiuréia
	Mielomonocítica	Vincristina, mercaptopurina
	Linfática	Clorambucil
	Infantil	Aspariginase
Mieloma	Melfalam e vincristina	

Fonte¹³/ Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Os dados apresentados no Tabela1 demonstram que há uma ampla utilização clínica dos agentes antineoplásicos quimioterápicos que interagem com o DNA para as

diversas neoplasias, o que comprova a enorme importância desta classe de fármacos e corrobora o grande interesse acadêmico e tecnológico no desenvolvimento de novos análogos mais eficientes e menos tóxicos. Além do mais, em vários casos, a seletividade e eficiência destes agentes antineoplásicos tem sido aumentada por uso de mecanismos de liberação controlada ou de citoproteção²⁶. Contudo, apesar da ampla utilização clínica dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, especialmente os agentes alquilantes, que conseguem muitas vezes controlar o crescimento tumoral e até prolongar a vida dos pacientes em vários anos, os oncologistas afirmam que a melhor ajuda para combater o câncer não é o tratamento antineoplásico, mas o diagnóstico precoce e, principalmente, a sua prevenção.

Apesar dos avanços significativos no diagnóstico e tratamento, o câncer continua a ser a segunda causa mais comum de mortalidade, devido à eficácia limitada dos tratamentos e da Resistência às Diversas Drogas (*Multidrug Resistance* - MDR). Estas limitações são, frequentemente, devido ao desenvolvimento de mecanismos genéticos nas células do tumor que substituem a apoptose apesar dos danos ao DNA das células dos tumores causados pela quimioterapia. Além disso, os pacientes que sobrevivem sofrem vários efeitos secundários graves dos medicamentos antineoplásicos disponíveis. Pesquisa e desenvolvimento tem sido tradicionalmente centrados na obtenção de uma droga curativa única para cada tipo de câncer, mas a terapia em combinação emergiu como a estratégia mais promissora para melhorar a sobrevivência dos pacientes. Assim, muito esforço tem sido dirigido para encontrar vias alternativas que complementam a indução terapêutica da apoptose e para superar a MDR.²

A quimioterapia convencional tem sido o alicerce na luta contra o câncer, e está longe de ser totalmente satisfatória devido para os problemas relacionados com a sua formulação e farmacocinética, a resistência adquirida a alguns agentes citotóxicos, e, em geral, a sua toxicidade e ação indiscriminada, que tornam necessário uma terapia mais seletiva. Esta seletividade pode ser conseguida com o desenvolvimento de quimioterápicos direcionados especificamente para o vias de transdução biológicas envolvidas no crescimento do tumor e na sua diferenciação.¹⁵

²⁶GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. *Clinic Pharmacokinetic*. Vol. 42, p. 419, 2003.

Muitos exemplos têm surgido nos últimos anos, que mostram a eficácia desta abordagem. Assim, a maior parte do anticancerígenos aprovadas para uso clínico na última década têm um alvo conhecido de sinalização. Estas novas armas biológicas incluem: (a) anticorpos monoclonais que são concebidos para se ligarem a proteínas específicas em células cancerosas de modo que o sistema imunológico possa reconhecer e ataca-lós, ou especificamente para manter e bloquear os sinais de fator de crescimento - receptores sobre-expressos em tumores; (b) inibidores de moléculas pequenas, como os inibidores de tirosina quinase, que são usados para bloquear vias de sinalização envolvidas no crescimento anormal; (C) moléculas anti-apoptótica; ou (d) bloqueadores da neo-angiogênese tumoral. Outras abordagens permitem a entrega de fármacos citotóxicos para alvos moleculares sobre-expressos em células tumorais por conjugação destas drogas a anticorpos monoclonais ou ligantes peptídicos através de um ligador químico, ou pela incorporação de um fármaco citotóxico em nanocarreadores que tem como alvo passivamente os tumores pela reforçada permeabilidade e efeito de retenção, ou ativamente os tumores por conjugação de porções de direcionamento na superfície do nanocarreador, ajudando também a superar a MDR. Atualmente, em mais de 50% dos cânceres tratados a cura não pode ser alcançada e nanocarreadores de drogas podem ajudar a diminuir essa percentagem.¹⁵

Embora as terapias direcionadas possam ser conseguidas diretamente alterando sinalização celular específica, por meio de anticorpos monoclonais ou inibidores de pequenas moléculas, foi demonstrado também, que é possível administrar agentes quimioterápicos para alvos moleculares sobre-expressos na superfície de células tumorais. Em particular, que oferecem uma descrição detalhada de diferentes transportadores de drogas citotóxicas, tais como lipossomos, nanotubos de carbono, dendrímero, micelas poliméricas, conjugados de polímeros e nanopartículas poliméricas, na terapia do câncer passiva e ativa, aumentando a permeabilidade e a retenção ou pela funcionalização da superfície dos transportadores. Estes transportadores de drogas não apenas transportam os agentes quimioterápicos a tumores, como evitam tecidos normais e reduzem a toxicidade no resto do corpo, mas também protegemas drogas citotóxicas da degradação, aumentando a meia-vida, a

capacidade de carga e solubilidade desses agentes citotóxicos e reduzem a depuração renal.

No entanto, existem numerosos ensaios clínicos em curso de polímero-proteína e conjugados de polímero-droga, formulações de lipossomas, incluindo imunolipossomas, micelas poliméricas e nanopartículas poliméricas.^{15,16,17}

2. COMPOSTOS A BASE DE PLATINA

A utilização generalizada de compostos de platina no tratamento do câncer iniciou-se com a descoberta da atividade antineoplásica da cisplatina por Barnett Rosenberg na década de 1960.²⁷ Apesar da difusão de drogas de platina em regimes de tratamento do câncer, existem uma série de permanentes desvantagens.²⁸ Por exemplo, nenhum agente único é igualmente eficaz contra todos os tipos de câncer e alguns tipos parecem ser intrinsecamente resistentes ao tratamento com qualquer um dos agentes de platina aprovados atualmente. Além disso, populações de células cancerosas podem adquirir resistência ao longo do tempo por um processo de evolução somática⁴ e, um certo número de efeitos colaterais, como a menor dose-limitante na toxicidade, acompanham o tratamento com agentes de platínicos.²⁹ Numa tentativa de ultrapassar estes problemas, um grande número de complexos platinaforam preparados e testados quanto à atividade antitumoral. Uma estratégia que tem sido utilizada pelos químicos tem sido conceber compostos que diferem significativamente daqueles prescritos pelas tradicionais relações de estrutura-atividade (SARS) estabelecidas na década de 1970.³⁰

Medicamentos à base de platina tornaram-se pilares da terapia do câncer. Aproximadamente metade de todos os pacientes que recebem quimioterapia são tratados com drogas de platina. Apesar da ampla utilização desses medicamentos, a única cura obtida de fato é com o tratamento por cisplatina para câncer testicular.^{16,17}

²⁷ ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, JE.; MANSOUR, VH. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature*. Vol. 222, p. 385–386, 1969.

²⁸ BRABEC V.; KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat.*, vol. 8, p. 131–146, 2005.

²⁹ KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. Vol. 7, p. 573–584, 2007.

³⁰ LOVEJOY, K.S.; LIPPARD, S.J. Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Trans*. P. 10651–10659. 2009.

Complexos de platina 'não-clássicos' incluem pró-drogas Pt(IV), complexos com estereoquímica *trans*, compostos poliplatínicos, intercaladores acorrentados por platina, e os complexos monofuncionais. Os compostos na última categoria se distinguem dos fármacos de platina clássicos em que esses formam ligações monofuncionais em oposição as ligações cruzadas bifuncionais.³¹

A preparação de um composto de coordenação com a fórmula simples *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] foi primeiramente descrita por Michele Peyrone em meados do século 19 e, como foi costume frequente na época, o composto veio a ter o seu nome como cloreto de Peyrone.³² A descoberta das propriedades antineoplásicas deste complexo por Barnett Rosenberg é um grande exemplo do papel que acaso pode desempenhar na ciência.²⁷ Durante experimentos investigando o efeito de campo elétrico sobre a divisão celular bacteriana, eletrodos de platina que tinham sido escolhidos pela sua inércia começaram a lixiviar os íons de platina no meio de crescimento contendo amônia. As bactérias incubadas neste meio de crescimento continuaram a crescer, mas não se dividiam. Rigorosas experiências de controle revelaram que o agente mais potente para o efeito nas bactérias tratava-se do cloreto de Peyrone. Em uma asserção dedutiva, Rosenberg propôs que se este complexo de platinapoderia inibir a divisão celular bacteriana, então poderia ser capaz de parar o crescimento descontrolado de células que caracterizam o câncer. Em 1969, Rosenberg publicou os resultados de um estudo mostrando que *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] foi eficaz no tratamento do sarcoma 180 e leucemia L1210 em camundongos.²⁷

Em 1978, apenas nove anos após a primeira publicação descrevendo sua atividade anticancerígena, este composto, que veio a ser conhecido como cisplatina (Figura 1), foi aprovado pelo (FDA) para o tratamento clínico de tumores do trato geniturinário.³³ A aprovação rápida resultou de uma combinação entre a necessidade premente de novos quimioterápicos no momento e a persistência diligente de Rosenberg.³⁴ Seguindo os relatórios iniciais da atividade anticancerígena de cisplatina,

³¹PARK, G.Y.; WILSON, J.J.; SONG, Y.; LIPPARD, S.J. Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 109, p. 11987–11992.2012.

³²PEYRONE, M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Liebigs Ann.*, vol. 51, p.1–29, 1844.

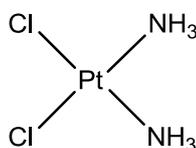
³³SMITH, G.H. New drugs released in 1978. *Nurse Pract.* Vol.4, p. 35–41, 1979.

³⁴HOESCHELE, J.D. In remembrance of Barnett Rosenberg. *Dalton Trans.*, p. 10648–10650, 2009.

os químicos inorgânicos começaram a preparação de uma variedade de complexos de platina com diferentes ligantes e diversos ensaios dos seus efeitos antineoplásicos foram realizados.

O mecanismo molecular *in vivo* da cisplatina (Figura 1), que se comporta como um pró-fármaco clássico, envolve provavelmente a sua aquação e subsequente ligação de DNA^{35,36,37}; por sua vez, a fixação da platina induz grandes modificações estruturais da dupla hélice do DNA, conduzindo finalmente a apoptose das células cancerígenas.³⁸ Embora o DNA é o primeiro alvo comumente aceito para a cisplatina,^{39,40} as interações entre a cisplatina e uma variedade de biomoléculas intracelulares são também muito importantes, devido à elevada reatividade e a afinidade de compostos de Pt com doadores de nitrogênio e enxofre.⁴¹ Com efeito, o processo de reconhecimento de proteína-cisplatina é visto como crucial na determinação do transporte da cisplatina, na sua absorção celular, biodistribuição e perfil de toxicidade.^{42,43,44}

Figura 1. Estrutura da Cisplatina.



³⁵JAMIESON, E.R.; JACOBSON, M.P.; BARNES, C.M.; CHOW, C.S.; LIPPARD, S.J. Heparin regulates vascular endothelial growth factor 165 dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, p. 12346–12354, 1999.

³⁶JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *Chem. Rev.*, vol. 99, p. 2467–2498, 1999.

³⁷HICKMAN, J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 11, p. 121–139, 1992.

³⁸LIPPERT, B. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. *Wiley-VCH*, New York, NY, 1999.

³⁹BRABEC, V. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. *Academic Press*, Brno, Czech Republic, 2002.

⁴⁰COMESS, K.M.; LIPPARD, S.J. Molecular Aspects of Platinum–DNA Interactions. *Molecular Aspects of Anticancer Drug–DNA Interactions*, Macmillan, London, 1993.

⁴¹APPLETON, T.G. Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules. *Coord. Chem. Rev.*, vol. 166, p. 313–359, 1997.

⁴²KNIPP, M. A.; KAROTKI, V.; CHESNOV, S.; NATILE, G.; SADLER, P.J.; BRABEC, V.; VASAK, M. Mass spectrometry evidence for cisplatin as a protein cross-linking agent. *J. Med. Chem.* Vol. 50, p. 4075–4086, 2007.

⁴³CASINI, A.; REEDIJK, J. Interactions of anticancer Pt compounds with proteins: an overlooked topic in medicinal inorganic chemistry? *Chem. Sci.* vol. 3, p. 3135–3144, 2012.

⁴⁴MESSORI, L.; MERLINO, A. Cisplatin binding to proteins: A structural perspective. *Coordination Chemistry Reviews.* v. 315, p. 67–89, 2016.

A maioria dos complexos de platina, que entraram em ensaios clínicos com a perspectiva de serem substâncias anti-câncer para quimioterapia, envolve um bidentado ou dois monodentados carboxilatos O-doadores nas suas estruturas.⁴⁵ Isto pode ser explicado por várias vantagens dos complexos de platina carboxilatos (por exemplo, maior estabilidade hidrolítica, em condições fisiológicas e maior acúmulo de no alvo das células cancerosas) sobre os seus análogos dicloretos.⁴⁶

A quimioterapia convencional consiste em uma única droga (monoterapia) e oferece limitada acessibilidade do fármaco para os tecidos tumorais que requerem uma dose mais elevada, levando a um efeito adverso.⁴⁷ Além disso, o tratamento repetido com uma única droga e a administração de doses mais elevadas pode resultar na resistência aos agentes quimioterápicos. Por uma década, foi prevista a quimioterapia de combinação como uma potencial estratégia para limitar os inconvenientes associados com agente quimioterápico única. Ao contrário da monoterapia, a combinação quimioterápica oferece benefícios como a luta contra diferentes alvos biológicos em células cancerosas, maximizando assim a eficácia terapêutica e redução do efeito adverso.^{48,49}

Os mecanismos bioquímicos de citotoxicidade da cisplatina envolvem a ligação, geralmente, da droga as bases guaninas do DNA e a formação de ligações transversais ao DNA que podem ser intra ou inter-fita (Figura 2). Estes complexos podem interferir com a replicação normal do DNA e/ou mecanismos de transcrição.⁵⁰ Além das ligações ao DNA, a cisplatina pode ligar-se a proteínas e outros alvos celulares, e modular a

⁴⁵WHEATE, N.J.; WALKER, S.; CRAIG, G.E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* Vol. 39, p. 8113–8127, 2010.

⁴⁶STARHA, P.; TRAVNICEK, Z.; PAZDEROVA, L.; DVORAK, Z. Platinum(II) carboxylato complexes containing 7-azaindoles as N-donor carrier ligands showed cytotoxicity against cancer cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry.* v. 161, p. 3, 2016.

⁴⁷SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human healthcare, *Nanomedicine* 3 (2007) 20–31.

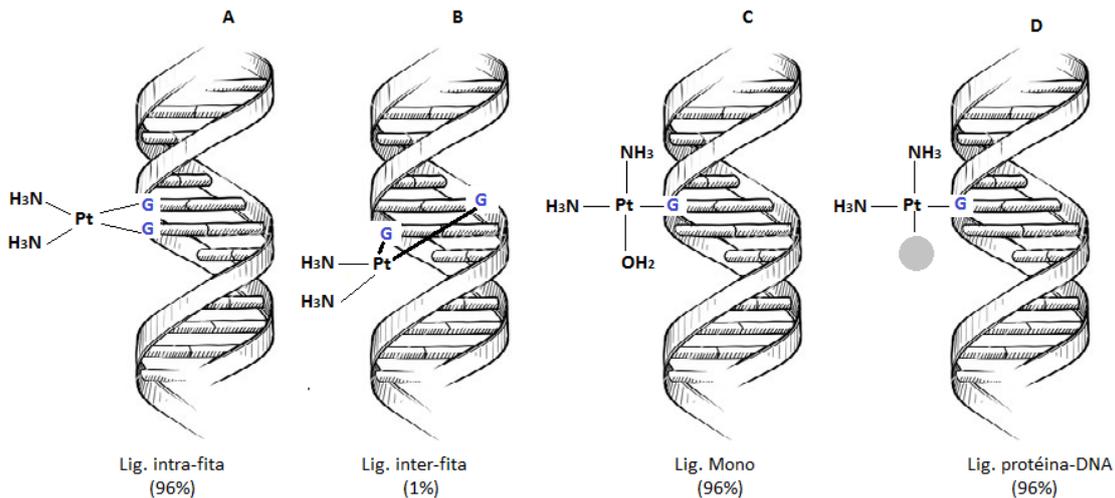
⁴⁸ALAM, N.; AREMQAYUM, KUMAR, A., KHARE, V.; SHARMA, P.R.; ANDOTRA, S.S.; SINGH, S.K.; KOUL, S.; GUPTA, P.N. Improved efficacy of cisplatin in combination with a nano-formulation of pentacyclic triterpenediol. *Materials Science and Engineering C*, vol. 68 p. 109–116, 2016.

⁴⁹PARHI, P. C.; MOHANTY, A.; SAHOO, S.K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug Discov. Today*, vol. 17, p. 1044–1052, 2012.

⁵⁰PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1535–1542.

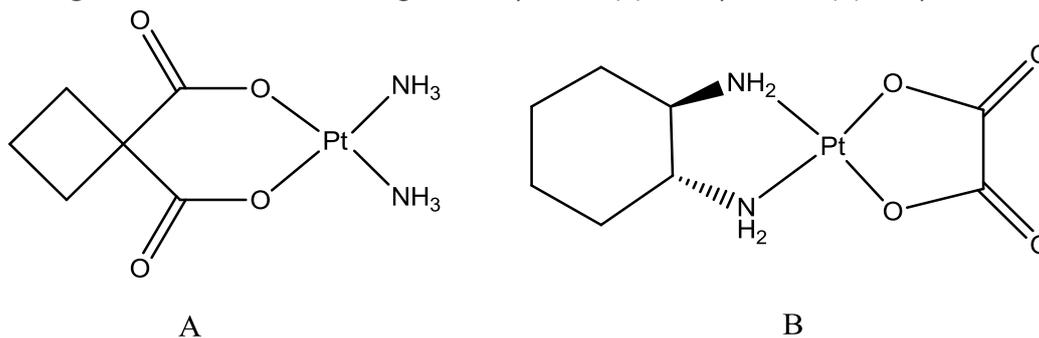
atividade de enzimas, receptores e outras proteínas que acabam em fenômenos citotóxicos.⁵¹

Figura 2. Principais ligações formadas na interação da cisplatina com o DNA. (A) ligações intra-fita. (B) ligações inter-fita. (C) Ligação mono ao DNA. (D) Ligação Proteína-DNA.



A cisplatina tem numerosos efeitos colaterais, além dos já descritos, incluindo danos renais, surdez, e neuropatia periférica, assim, a eficácia global do fármaco não poderia ser atingida devido aos efeitos secundários que provoca. Isto levou ao desenvolvimento de análogos de cisplatina que seriam clinicamente eficazes, mas sem a toxicidade. A carboplatina e oxaliplatina (Figura 3), são os análogos mais conhecidos e que atingiram a aprovação da FDA para uso. Curiosamente, há uma variação nos cânceres tratados pelos análogos da cisplatina. A carboplatina não é tão efetiva no tratamento de malignidades de células germinativas em comparação com a cisplatina. Oxaliplatina é muito eficaz para o tratamento de câncer de cólon, onde a cisplatina não é eficaz. Compreender a diferença dos ligantes entre estes três compostos poderia fornecer novos *insights* e desvendar novos mecanismos de como as células cancerosas agem contra os efeitos das drogas que danificam o DNA.

⁵¹PELEG-SHULMAN, T.; GIBSON, D.; Cisplatin-protein adducts are efficiently removed by glutathione but not by 5'-guanosine monophosphate, *J. Am. Chem. Soc.*v. 123, p.3171–3172. 2001.

Figura 3. Estrutura dos Análogos da Cisplatina: (a) carboplatina e (b) oxaliplatina.

Os efeitos secundários graves (nefrotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade, depressão da medula óssea e as células adquirem quimio-resistência) têm limitado o uso da cisplatina.^{52,53,54} A fim de superar as toxicidades limitativas da dose em uso clínico de cisplatina, a quimioterapia combinada a outros agentes anti-câncer constitui uma opção em potencial.⁵⁵ Um número considerável de drogas em combinação com compostos de platina têm sido investigados o que melhorou o resultado clínico e exibiu um impacto positivo na sobrevivência do paciente.^{56,57,58} As combinações de cisplatina com agentes fitoquímicos estão também recebendo o reconhecimento a fim de limitar a manifestação citotóxica da cisplatina.⁵⁹ A melhoria da eficácia de cisplatina em combinação com uma formulação de nano-triterpenadiol pentacíclica foi otimizada e o perfil de liberação do fármaco foi modificado indicando uma interação sinérgica. Além disso, foi obtido 75% de inibição do crescimento de células tumorais, e a dose de cisplatina foi reduzida em 3,8

⁵²MADURO, J.H.; PRAS, E.; WILLEMSE, P.H.; DEVRIES, E.G. Acute and long-term toxicity following radiotherapy alone or in combination with chemotherapy for locally advanced cervical cancer, *Cancer Treat. Rev.* v. 29, p. 471–488, 2003.

⁵³SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, v. 22, p. 7265–7279, 2003.

⁵⁴YAO, X.; PANICHPISAL, K.; KURTZMAN, N.; NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review, *Am. J. Med. Sci.* v. 334p. 115–124, 2007.

⁵⁵WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev.* v. 4, p. 307–320, 2005.

⁵⁶BUNN, P.A. Chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: who, what, when, why? *J. Clin. Oncol.* v. 20, p. 235–335, 2002

⁵⁷MARTIN, M. Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer, *Clin. Breast Cancer* v. 2, p. 190–208, 2001.

⁵⁸COSAERT, J.; QUOIX, E. Platinum drugs in the treatment of non-small-cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, v. 87, p. 825–833, 2002.

⁵⁹YUNOS, N.M.; BEAL, P.; YU, J.Q.; HUQ, F. Synergism from sequenced combinations of curcumin and epigallocatechin-3-gallate with cisplatin in the killing of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* v. 31, p. 1131–1140, 2011.

vezes usando esta combinação. Os resultados indicaram o potencial de cisplatina em combinação a fim de reduzir a dose e a toxicidade que limita o uso da cisplatina.⁴⁸

Outra combinação com drogas de platina foi elaborada, uma matriz de polissacarídeo (levana) foi utilizada na síntese do composto WES7, o que ocasionou uma espécie de biocompatibilização, disponibilizando, por sua vez, uma redução de toxicidade, uma vez que não viabilizou tão facilmente a leitura bioquímica do agenteplatínico citotóxico, o qual viabiliza o disparo de vários gatilhos de contraresposta, acelerando a seleção natural entre células normais e tumorais. Verificou-se que o conjugado WES7 apresentou um percentual de inibição tumoral de 98%, enquanto que o padrão disponibilizado no mercado apresentou 57%. Foi demonstrado a maior eficiência quanto à atividade antitumoral com relação à droga padrão testada e disponível no mercado, além de apresentar baixa toxicidade, pois prevê um efeito sinérgico entre a matriz de carboidrato, a qual já apresenta atividade antitumoral também comprovada; e o quimioterápico à base de platina, utilizado na composição final, que desencadeou um produto final mais ativo e menos tóxico. O produto inviabilizou o contato direto da cisplatina, frente aos mais diversos sinalizadores de expressão presentes no meio biológico. Foi proposto, que segundo a visão da biologia evolutiva, e mediante o mascaramento da expressão citotóxica da cisplatina, tão aparente para ambos os sistemas competidores (célula normal e tumoral), houve um retardo ou inibiçãoda seleção natural para esses dois sistemas, definindo-se como produto final de baixa toxicidade, causando a regressão do tumor sem desencadear possíveis expressões de resistência.⁶⁰

A cisplatina foi encapsulada nos núcleos hidrofóbicos de micelas macromoleculares de glicol/quitosana do tamanho de nano agregados formados em meio aquoso, este encapsulamento possibilitou atingir uma carga de fármaco que apresentou eficiência de cerca de 80%. Nos ensaios *in vitro*, estas nanopartículas de 300-500 nm lançaram o agente citotóxico de uma forma sustentada, mostrando menos citotoxicidade de drogas do que o fármaco livre. Nos ensaios *in vivo*, mostrou a circulação prolongada do fármaco no sangue, melhor capacidade de segmentação, a

⁶⁰SILVA, WAGNER E. Nova Geração de Agentes Antineoplásicos Conjugados. *Tese de doutorado*. 2010. Pág 92-93.

acumulação com sucesso em tumores, a atividade antitumoral melhorada e menor toxicidade em relação a livre de drogas.⁶¹

3. LEVANA

Exopolissacarídeos (EPSs) são polímeros de açúcar residuais excretados por microrganismos. Estes tipos de polissacarídeos têm sido muito conhecidos por possuírem um vasto campo de atividades biológicas, tais como antioxidantes, anti-mutante, anti-coagulante, estimulação imunitária, inibição tumoral e, dependendo das sua atividade estimulatória das suas composições de monômero, peso molecular e grau de ramificação, bem como, sobre os grupos funcionais presentes na sua estrutura.^{62,63} Além dessas características estruturais, algumas propriedades físicas, tais como carga, conformação e solubilidade de EPSs são fatores importantes que afetam sua bioatividade.⁶⁴

As características químicas e estruturais de EPSs são altamente determinadas pelo tipo de microrganismo produtor e também por suas condições de produção, EPSs necessitam de estudo específico para cada microrganismo produtor para então ser estabelecido a sua bioatividade. E, um dos mais amplamente distribuído EPSs na natureza é a levana.⁶⁵

A levana é um EPS solúvel em água, não-tóxica, e um biopolímero fortemente adesivo e com muitas propriedades distintivas como baixa viscosidade, alta solubilidade em óleo, a compatibilidade com sais e surfactantes, estabilidade ao calor,

⁶¹KIM, J.-H.; KIM, Y.-S.; PARK, K.; LEE, S.; NAM, H.Y.; MIN, K.H.; JO, H.G. ; PARK, J.H. ; CHOI, K.; JEONG, S.Y.. PARK, R.-W; KIM, I.-S.; KIM, K.; KWON, I.C. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J. Control. Release*, v. 127, p. 41–49, 2008.

⁶²ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research, *Carbohydr. Polym.* V. 90, p.1395–1410[2], 2012.

⁶³ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P.C.K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends Food Sci. Technol.* v. 18, p. 4–19, 2007.

⁶⁴LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem. Toxicol.* v.50, p. 767–772, 2012.

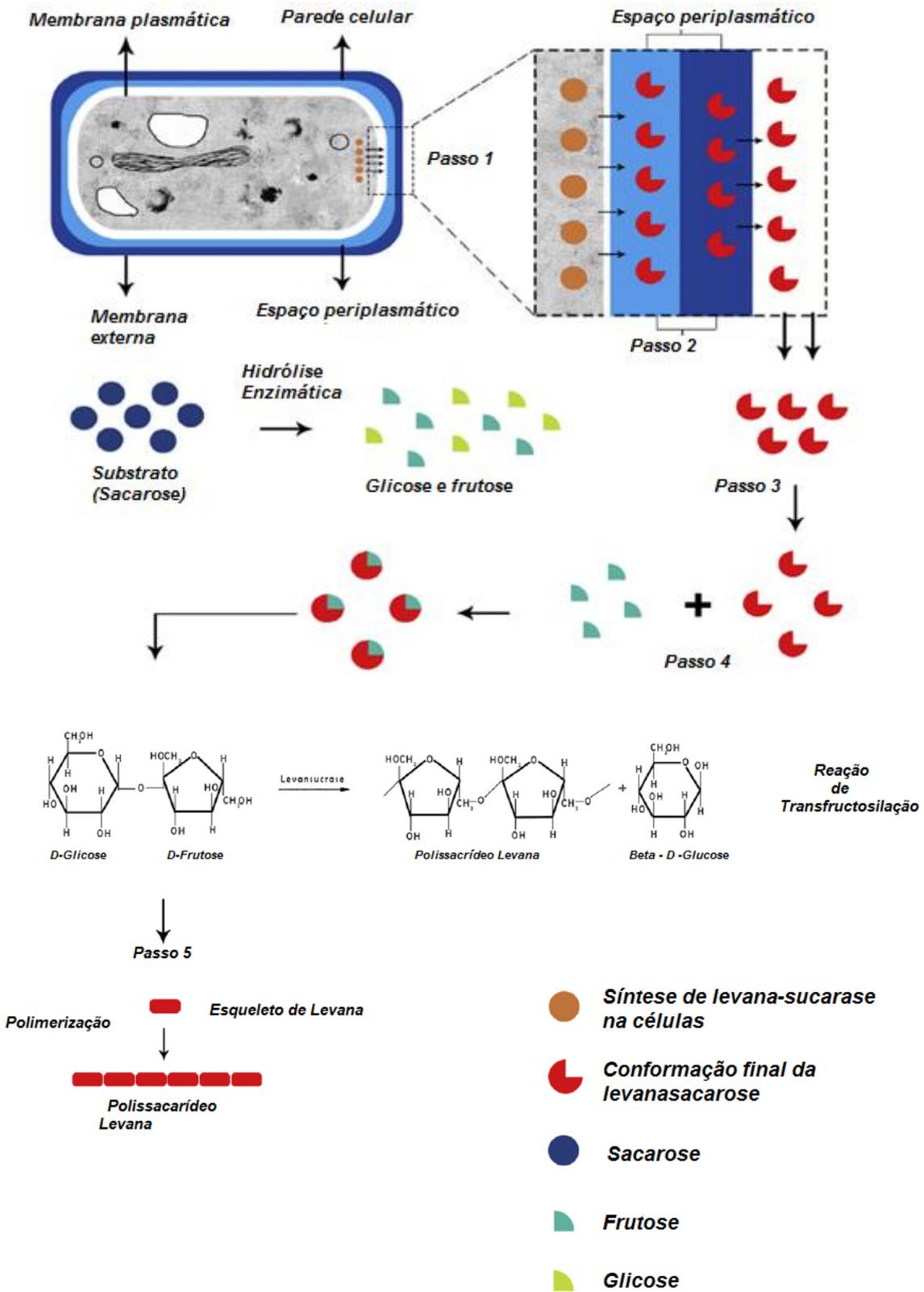
⁶⁵SARILMISER, H. K.; ONER, E.T. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*, v. 92, p. 28–34, 2014.

ácido e meios alcalinos.⁶⁶ A levana vem ganhando crescente popularidade como um biopolímero funcional com diversas aplicações nas indústrias médica e química. A levana pode ser produzida por diferentes tipos de bactérias, tais como *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Zymomonas*. Todas as bactérias produzem a levana extracelularmente através da ação da levanossacarase a partir de substratos à base de sacarose. Devido ao potencial antioxidante desse polissacarídeo há um crescente interesse em elucidar as atividades biológicas da levana, a partir de vários microrganismos.⁶⁰

A Representação esquemática da biossíntese de Levana a partir da sacarose pode ser observada na figura a seguir. Passo 1: Biossíntese de levanossacarase ocorre na célula. Passo 2: levanassacarase fica acumulada no espaço periplasmático quando adota a sua confirmação final. Passo 3: levulanoinvertase é excretado para fora da célula para o meio circundante, quer pela clivagem do peptídeo de sinal seguido por dobragem de proteínas ou pelo mecanismo iniciado através de um peptídeo de sinal *in vivo*. Passo 4: levanossacarase atua sobre as moléculas doadoras (substratos) e a síntese de levana começa por reações de *trans*-fucosilação. Passo 5: levanassacarase continua adicionando subunidades de frutose à crescente cadeia de polissacarídeo Levana e termina a síntese de Levana.

⁶⁶KANG, S. A.; JANG, K. H.; SEO, J. W.; KIM, K. H.; KIM, Y. H., RAIRAKHWADA, D. Levana: applications and perspectives. Em: B. H. A. Rehm (Ed.), *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Norfolk: Caister Academic Press., 2009, p. 145–162.

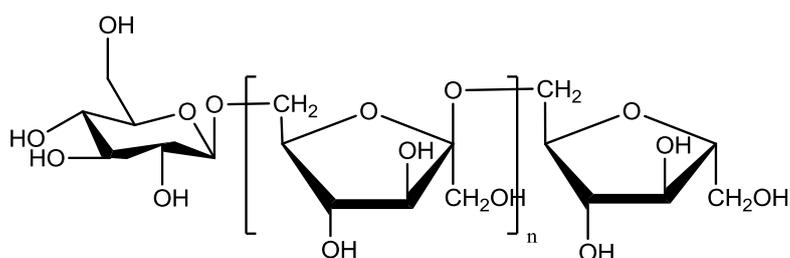
Figura 4. Representação esquemática da biossíntese de Levana a partir da sacarose. Adaptado 98



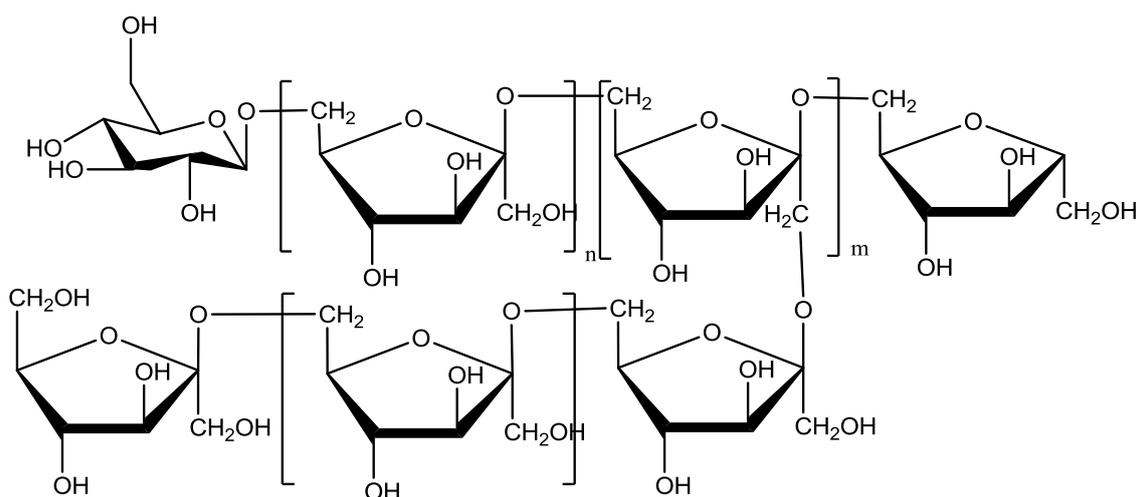
⁹⁸ Rapala Srikanth, Chinta H S S Sundhar Reddy, Gudimalla Siddartha, M. Janaki Ramaiah, Kiran Babu Uppuluri. Review on production, characterization and applications of microbial levan. Carbohydrate Polymers 120 (2015) 102–114

A levana é definida como um polissacarídeo extracelular composto por resíduos D-furanosil unidos por ligações β -2,6 na cadeia principal e β -2,1 nos pontos de ramificação (Figura 5). Sua obtenção acontece pela reação de transfrutoseilação durante a fermentação em meios de cultura ricos em sacarose, extrato de levedura e sais minerais. A levana pode ser chamada de polifrutana por ser constituída de moléculas de D-frutose.⁶⁷ Os microrganismos produzem a levana por diferentes razões, Han e Clarke (1990) observaram que a atividade da levanasacarase está envolvida em processos variados, como sobrevivência de bactérias no solo (*Bacillus subtilis*), fitopatogeneses (*Erwinia* e *Pseudomonas* spp.) ou simbiose de plantas interagindo com bactérias (*Bacillus polymyxa*).

Figura 5. Estrutura molecular da levana. Representação esquemática da levana linear (A) e ramificada (B).



Ligações Beta-2,6 na cadeia principal



Ligações Beta-2,1 nos pontos de ramificação

⁶⁷ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H.. Semina, *Ciências Agrárias*, v. 26, n.1, p. 71-82, 2005.

A levana pode ser utilizada como substituto do plasma, prolongador da atividade do medicamento, rádio protetor, imuno-estimulantes,⁶⁹ hipocolesterolêmico,^{70,71} antidiabéticos,⁷² anti-inflamatórios,⁷³ e também como agente antitumoral foi relatado por diversos grupos.^{74,75,76,77,78,79} Pode ser utilizado na cicatrização de feridas em dermatologia e enchimento subcutâneo em aplicações médicas e dentárias.⁶⁶ Calazans et al. (1997 e 2000) mostraram que a atividade antitumoral de levana produzida por *Zymomonas mobilis* dependeu do seu peso molecular.^{80,81} É um natural adesivo e surfactante,^{82,66} e também amplamente utilizado na indústria de cosméticos na preparação de cremes para a pele, hidratantes, etc.⁸³

⁶⁹ XU, Q.; YAJIMA, T.; LI, W.; SAITO, K.; OHSHIMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Levan (β -2,6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin. Exp. Allergy*, v. 36, p. 94-101, 2006.

⁷⁰ BELGHITH, K.S.; DAHECH, I.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 50, p. 1070–1074, 2012.

⁷¹ YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemia effects in rats, *J. Nutr. Biochem.* V. 10, p. 13–18. 1999.

⁷² DAHECH, I.; BELGHITH, K.S.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 49, p. 942–947, 2011.

⁷³ KIM, K.H.; CHUNG, C.B.; KIM, Y.H.; KIM, K.S.; HAN, C.S.; KIM, C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *J. Cosmet. Sci.* v. 56, p. 395–406, 2005.

⁷⁴ BAYOUMI, F.S.; EL AMIR, A.M.; EL DEEB, S.O.; EL ZAHER, H.A.; HAIAM, S.A. In vitro study of a bacterial polysaccharide as anti cancer. *J. Appl. Sci. Res.* v. 9 (3), p. 2007–2018, 2013.

⁷⁵ ESAWY, M. A.; AMER, H.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; EL ENSHASY, H. A.; HELMY, W. A.; ABO-ZEID, M. A. Scaling up, characterization of Levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydrate Polymers*, v. 95 (1), p. 578–587. 2013.

⁷⁶ ABDEL-FATTAH, A.M.; GAMAL-ELDEEN, A.M.; HELMY, W.A.; ESAWY, M.A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza, *Carbohydr. Polym.* v. 89, p. 314–322. 2012.

⁷⁷ DAHECH, I.; BELGHITH, K.S.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 51. P. 329–335. 2012.

⁷⁸ YOO, S.H.; YOON, E.J.; CHA, J.; LEE, H.G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 34, p. 37–41, 2004.

⁷⁹ YOO, S.H.; YOON, E.J.; CHA, J.; LEE, H.G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 34, p. 191–194, 2004.

⁸⁰ CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; DE FRANCA, F.P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Lett.* V. 19, p. 19–21. 1997.

⁸¹ CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; DE FRANCA, F.P. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 27, p. 245–247, 2000.

⁸² CROOKS, R.; GABBIANELLI, A.; GUNN, E.; SHANMUGANANDAMURTHY, K. Derivatized polysaccharide polymer. *Google Patents*. 2009.

⁸³ KÜCÜKAİK, F., KAZAK, H., GÜNEY, D., FINORE, I., POLI, A., YENIGÜN, O. Molasses as fermentation substrate for Levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89(6), p. 1729–1740. 2011

Yoon e colaboradores (2004) relataram que a estrutura de ramificação de levana desempenhou um papel importante na sua atividade anti-tumoral e descobriram que à medida que o grau de ramificação da levana diminui, a atividade anti-tumoral em uma linhagem de células de carcinoma do estômago diminuiu linearmente.⁷⁹ Esawy et al. (2013) mostraram propriedades protetoras do câncer a partir de estrutura ramificada de levana de alto peso molecular produzida por *Bacillus subtilis* em hepatoma murino (células Hepa1c1c7). Também demonstraram que frações específicas de levana produzida por *B. subtilis* possuem promissores agentes ativos anti-iniciadores e ação bloqueadora de tumores capazes de prevenir os estágios iniciais da carcinogênese.⁷⁵

Através do que foi descrito, é possivelmente promissora a associação proposta entre compostos de platina e levana como agente farmacológico. Tendo em vista que os estudos atuais demonstram uma promissora atividade antitumoral para os dois compostos e acreditamos que trarão incrementos na atividade antitumoral de ambas. O almejado complexo não foi descrito na literatura. Desta forma, comprovados as benesses do complexo obtido serão propostas patentes e/ou artigos para publicação. Tendo em vista os interesses da saúde pública no que cerne as preocupações com os casos crescentes de câncer no mundo e em particular no nosso país, é coerente a necessidade contínua pela busca desses novos fármacos capazes de combater essa grave doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

CAPÍTULO II- METODOLOGIA

4. SOLVENTES E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais estão listados na Quadro 02.

Quadro 02–Solventes e reagentes utilizados neste trabalho com sua procedência comercial.

<i>Reagentes/Solventes</i>	<i>Procedência</i>
Acetona P.A.	Dinâmica
Agar Bacteriológico	Vetec
AgNO ₃	Vetec
D-Glicose	Dinâmica
Dihidrocloreto de Hidrazina P. A.	Vetec
Diidrogeno Fosfato de Potássio 98%	Vetec
Etanol P.A.	F.Maia
Extrato de Carne	Himedia
Extrato de Levedura	Himedia
Peptona de Carne	Merck
Sacarose 99%	Vetec
Sulfato de Amônia	Vetec
Sulfato de Magnésio Heptahidratado 98%	Vetec
Metanol P.A.	Vetec
1,2-ditioetano	Sigma Aldrich
1,2-ditiolpropano	Sigma Aldrich
MTT-(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)	Sigma Aldrich
DMSO- Dimetil sufóxido	Sigma Aldrich
Tween 80	Sigma Aldrich

5. COMPLEXOS DE PLATINA

5.1. TETRACLOROPLATINATO DE POTÁSSIO K₂[PtCl₄]

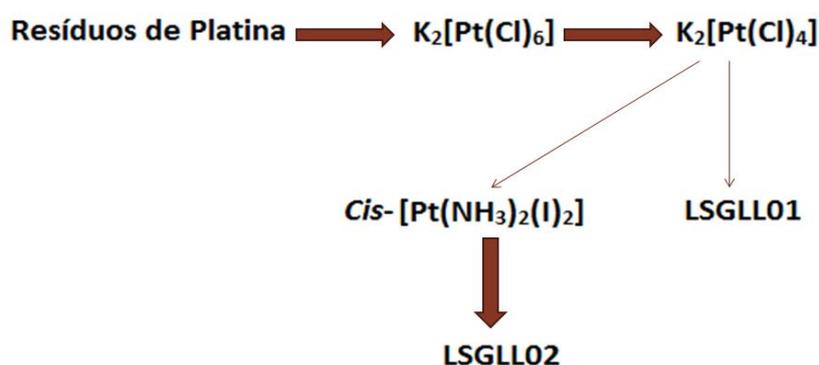
O composto hexacloroplatinato de potássio, precursor da reação de síntese do K₂[Pt(Cl)₄], foi produzido através da recuperação de resíduos de platina⁸⁴ – existentes no Laboratório de Análise Química Inorgânica e Sensores da Universidade Federal Rural de Pernambuco, evitando assim, o descarte inadequado e/ou o acúmulo deste resíduo no laboratório. O sal tetracloroplatinato de potássio foi sintetizado a partir do

⁸⁴KAUFFMAN, G. B.; TETER, L. A. *Inorg. Syn.*, v. 7, p. 232-6.1963

hexacloroplatinato de potássio seguindo a metodologia de síntese descrita em PEYRONE, 1844; RAMBERG, 1913.^{85, 86}

Em um béquer de 250 mL, foram adicionados 2,11 g (4,34 mmol) de $K_2[Pt(Cl)_6]$ e 0,23 g (2,17 mmol) de cloridrato de hidrazina, em meio aquoso. O sistema foi mantido em aquecimento (50-60 °C) durante 2 horas; ao término deste período, elevou-se a temperatura para 90 °C, deixando-se por 30 minutos. Após esse período, o sistema foi evaporado até quase *secura*, lavado com acetona e seco a vácuo. O composto foi caracterizado por difratometria de raios-X.

O esquema da síntese dos compostos de platina pode ser observado abaixo.



5.2. SÍNTESE DO LSGLL01

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 1mmol de $K_2[Pt(Cl)_4]$ e 1 mmol de 1,2-ditioetano em 20 mL de água destilada. A reação foi mantida no escuro e em agitação magnética por 5 h. Após o tempo reacional, o material foi congelado, liofilizado, purificado e caracterizado através de espectroscopia eletrônica (UV-VIS), espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de 1H . O complexo obtido foi codificado de LSGLL01.

5.3. SÍNTESE DE LSGLL02

5.3.1 Síntese do *cis*-diiododiaminplatina (II)

Em um béquer de 250 mL adicionou-se 1mmol de $K_2[Pt(Cl)_4]$, 10 mL de água destilada e 4,5 mmols de KI, deixando a mistura sob aquecimento (100 °C) por 5 min. Com a formação de uma solução preta, característica do complexo $K_2[PtI_4]$, foi

⁸⁵ PEYRONE, M. *Ann.chim. et phys.*, v. 12, p. 193.1844.

⁸⁶ RAMBERG, L. *Z. anorg.Chem.*, v.88, p.33.1913.

adicionado 2 mmol de NH_4OH (28%; $0,9 \text{ g/cm}^3$), obtendo-se o precipitado *cis*- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{I})_2$. O complexo foi então filtrado, lavado com água quente e subsequente mistura gelada de etanol/éter etílico (1:1).

5.3.2 Síntese de LSGLL02 a partir do *cis*-diiododiaminplatina (II)

O composto LSGLL02 foi produzido em balão de reação de 50 mL, onde foram adicionados 0,100g ($2,071 \times 10^{-4} \text{ mol}$) de *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{I})_2]$ e 0,0704g ($4,14 \times 10^{-4}$) de AgNO_3 em água (10mL) sob agitação por 5 horas, a 45°C . Ao término desta reação, o produto foi filtrado e colocado em outro balão de reação contendo solução (20mL) de H_2O :Metanol, então foi adicionado $10,39\mu\text{L}$ ($1,0355 \times 10^{-4} \text{ mol}$; $d:1,078\text{g/cm}^3$) do ligante 2. Após o tempo reacional, o material foi congelado, liofilizado, purificado e caracterizado através de espectroscopia eletrônica (UV-VIS), espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H . O complexo obtido foi codificado de LSGLL02. O ligante não será explicitado neste trabalho devido ao produto final está em processo de depósito de patente.

6. PRODUÇÃO DE LEVANA

6.1 MICRORGANISMO

Foi utilizada uma linhagem de *Zymomonas mobilis* codificada como ZAG-12, e registrada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com o número UFPEDA 241. A Coleção UFPEDA encontra-se cadastrada no “*World Federation Culture Collections -World Data Center on Microorganisms*”, com o número 114. A ZAG-12 foi uma cultura obtida artificialmente pela fusão de esferoplastos oriundos de outras linhagens de *Zymomonas mobilis* da Coleção UFPEDA codificadas como ZAP e Ag11.⁸⁷

6.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram preparados em béquer com água destilada e, em seguida, distribuídos em tubos de ensaio ou erlenmeyers tamponados para esterilização em autoclaves a 121°C por 15 minutos.

⁸⁷CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O. F. D.; SOUZA, M. D. F. V. Q.; MARCAL, M. D. C. R.; LEIX, S.; LOPES, C. E. The levan and ethanol production by *Zymomonas mobilis* strain ZAP in sucrose media. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v. 32, p. 631, 1989.

6.2.1 AGAR NUTRITIVO (AN)

O meio de cultura *Agar Nutritivo* foi utilizado para verificar se há contaminação durante os processos de crescimento e fermentação. Na Quadro 03 estão dispostos os reagentes e concentrações utilizadas no meio AN.

Quadro 03- Reagentes utilizados para o meio Agar Nutritivo com suas respectivas concentrações.

Reagente	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de Carne	3,0
Peptona de carne ou caseína	5,0
Agar bacteriológico	15,0-20,0

O pH foi ajustado entre 6,7-7,2, e após autoclavação, distribui-se o meio AN em quatro placas de Petri, sendo uma dessas usada para o controle do teste, isto é, sem inóculo. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h.

6.2.2 MEIO DE CULTURA SDL

O meio de cultura SDL teve função de proporcionar o desenvolvimento e posterior conservação do microrganismo, para sua utilização. Na Quadro 04 estão dispostos os reagentes e concentrações utilizadas para o preparo do meio SDL.

Quadro 04– Reagentes utilizados para o meio SDL com suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)
D-glicose anidra	20,0
Extrato de levedura	5,0

O pH foi ajustado numa faixa desejada entre 6,5-7,0, e foram mantidas as condições para o crescimento do microrganismo, que são T = 30°C e t=24-48h.

6.2.3 MEIO DE PRÉ-FERMENTAÇÃO

A finalidade do meio de pré-fermentação foi multiplicar as bactérias existentes (crescidas) no meio em um período de incubação de 48h a 30°C, onde a concentração de sacarose (fonte de carbono) é aumentada. Na Quadro 05 estão descritos os reagentes utilizados para compor o meio de pré-fermentação e as respectivas concentrações.

Quadro 05 – Reagentes utilizados para o meio de pré-fermentação com suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)
Sacarose	100,0
Extrato de levedura	2,0
KH₂PO₄	2,0
MgSO₄.7H₂O	0,5
(NH₄)₂SO₄	1,0

As soluções foram autoclavados separadamente em três recipientes, um contendo apenas a sacarose, outro o extrato de levedura e, por último, um frasco contendo os sais; e posteriormente, preparado o meio.

6.2.4 MEIO DE FERMENTAÇÃO

No meio de Fermentação foi onde ocorreu a produção do polissacarídeo desejado. Na Quadro 06 estão dispostos os reagentes e concentrações utilizadas no meio de fermentação.

Quadro 06– Reagentes utilizados para o meio de Fermentação com suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)
Sacarose	200,0
Extrato de levedura	2,0
KH₂PO₄	2,0
MgSO₄.7H₂O	0,5
(NH₄)₂SO₄	1,0

Os compostos foram autoclavados separadamente em três recipientes, um contendo apenas a sacarose, outro o extrato de levedura e, por último, um frasco contendo os sais. O meio foi incubado a 30°C por 72h.

6.3. CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

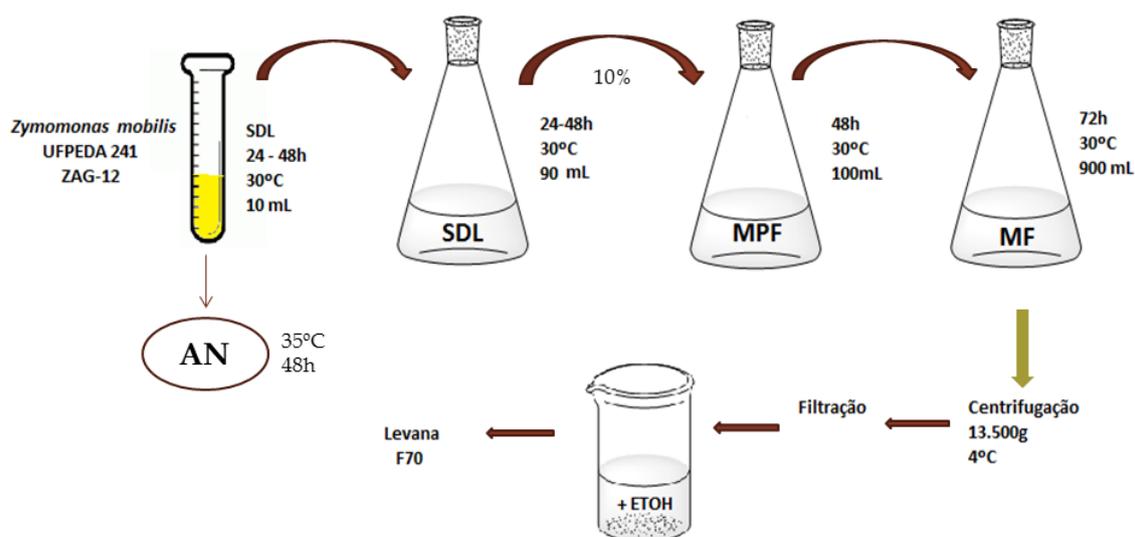
Após 72h de fermentação, realizaram-se os procedimentos de centrifugação e filtração do meio de fermentação para que haja a remoção das células contidas no sistema. A centrifugação foi realizada a 4°C, utilizando uma rotação de 13500 g por 15 min, e a filtração foi feita em um sistema de filtração à vácuo com membrana de 0,22 µm.

6.4. FRACIONAMENTO DA LEVANA PRODUZIDA POR PRECIPITAÇÃO

O fracionamento da levana produzida teve por finalidade separar frações de levana que possuem massas moleculares distintas, porém possui a mesma unidade mínima repetitiva. A fração escolhida foi a Fração 70 (F70), devido sua maior biomassa obtida e ação farmacológica comprovada.

Pesou-se 60 g de levana e preparou-se uma solução concentrada em água destilada (100 g/L), a partir da qual foram realizados fracionamentos gradativos, utilizando-se etanol PA. O percentual de etanol adicionado foi 70% (v/v). Utilizou-se uma centrífuga (10000 rpm a 4°C) para acelerar o processo de decantação da levana com a fração desejada. O esquema de produção da levana F70 está apresentado na figura a seguir.

Figura 6. Esquema representativo da produção de levana.



7. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

7.1 ANÁLISE ELEMENTAR

As análises elementares de C, H e S foram obtidas em um equipamento modelo EA 1110 da Carlo Erba (CE Instruments) utilizando gás hélio como arraste. Esta medida foi feita pela Central Analítica, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

7.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As curvas termogravimétricas da levana foram obtidas em um equipamento modelo TGA 50/50H da Shimadzu, sob atmosfera controlada de nitrogênio, utilizando cerca de 3mg de cada amostra. O equipamento consiste basicamente de uma microbalança analítica bastante sensível e um forno programável, podendo atingir até 1500 °C, com taxa de até 50 °C min⁻¹. Para as amostras utilizou-se os parâmetros taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ e temperatura final de análise de 800°C.

7.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA no UV/VISÍVEL

Os espectros de absorção dos ligantes e complexos foram obtidos em solução contendo propilenoglicol, com concentrações em torno de 10⁻⁵ molL⁻¹. O espectrofotômetro utilizado foi o Perkin Elmer modelo Lambda 6, operando com lâmpada de tungstênio (faixa de 800-340 nm) e com lâmpada de deutério (faixa 350-190nm).

7.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Os espectros vibracionais dos ligantes e complexos foram obtidos a partir da técnica de pastilha de KBr. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro com transformada de Fourier, Bruker, modelo IF66, abrangendo a região de 4000 a 400 cm⁻¹, cuja resolução espectral foi de 4 cm⁻¹.

7.5 MEDIDAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H E ¹³C

As análises de RMN foram feitas no equipamento VARIAN Unity Plus 300, com frequência de 300 MHz para ¹H e 75 Mz para ¹³C. Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão (ppm) em relação aos picos residuais de D₂O e metanol-d. Esta medida foi feita na Central Analítica, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

7.6 DIFRATOMETRIA DE RAIO-X

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em equipamento Difract ACT,série 1000-Siemens, utilizando a linha de cobre $K\alpha$, com passo de 0,02 e varredura de 10 a 60°.

8. ENSAIOS BIOLÓGICOS

8.1. ESTUDO DE CITOTOXICIDADE (*IN VITRO*)

O estudo de citotoxicidade *in vitro* foi realizado na UFPE, no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos, através do método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).^{88, 89}

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HEP-2 (carcinoma de laringe humana) e HT-29 (adenocarcinoma de colón humano) mantidas em meio de cultura DMEM e MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células MCF-7, HEP-2 e HT-29 (10⁵ células/mL) e HL-60 (0,3 x 10⁶ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%) foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0 demo.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade

⁸⁸ ALLEY M.C.; SCUDIERE D.A.; MONKS A.; HURSEY, M.L; CZERWINSKI, M.J.; FINE D.; ABBOTT B.J.; MAYO J.G.;, SHOEMAKER, R.H.; BOYD, MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* v. 48: p. 589-601. 1988.

⁸⁹ MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* v. 65: p. 55-63. 1983.

moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %).

8.2. TOXICIDADE AGUDA (ENSAIOS *IN VIVO*)

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados segundo o protocolo da **OECD/OCDE 423** – *Organization for Economic Cooperation and Development* (2001)⁹⁰ para os compostos LSGLL01, LSGLL02, cisplatina e o controle, sendo à este último grupo administrado uma solução salina com 10% de Tween 80 (veículo). Os animais (camundongos *swiss*) foram observados na primeira hora após a administração pelo método de *screening* hipocrático.⁹¹

Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia). Durante 14 dias seguintes foram avaliados o consumo de água, ração, peso corporal e mortalidade. No último dia de observação, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para exame hematológico e coleta de órgãos (fígado, rim e baço) para observação macroscópica de lesões (histopatológico). Este experimento foi repetido, sendo o *n* final igual a 6 animais por grupo, totalizando 24 animais (OECD, 2001).

8.2.1 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Para o teste hematológico, amostras sanguíneas foram coletadas em tubos contendo EDTA K2 e analisadas em contador hematológico de células ABX micros 60 (HORIBE medical). Para o teste bioquímico, amostras foram coletadas em tubos com ativador de coágulo e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. O soro obtido foi analisado em BIOPLUS 2000 utilizando kits bioquímicos Labtest para os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina e uréia.

⁹⁰http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-classmethod_9789264071001-en;jsessionid=17tfibpfp1wlz.x-oecd-live-02 Acesso em julho, 2016.

⁹¹MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, v.25, p.23-53, 1962.

8.2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a eutanásia, o fígado, baço e rins dos animais foram fixados em formalina tamponada 10%. Após a desidratação dos tecidos com banhos sucessivos em álcool e diafanização com xilol, as peças foram incluídas em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram colhidos em lâminas e coradas em hematoxilina e eosina e foram observados ao microscópio de luz.

8.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

A experimentação animal na pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamento de enfermidades que acometem os seres humanos. Animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, sendo o camundongo e os ratos os mais intensamente utilizados e os mais conhecidos cientificamente.^{92, 93} O que justificam as experimentações animais. Os protocolos com os animais foram autorizados pela comissão de ética no uso de animais (licença nº 030375/2014-20).

Os animais foram divididos em grupos de seis e implantados, na região axilar, com 25×10^6 células do sarcoma 180. Passadas 48h os animais foram submetidos ao tratamento com as drogas cisplatina (1mg kg^{-1}), LSGLL01 (1 mg kg^{-1}) e LSGLL02 (1 mg kg^{-1}) as quais foram administradas pela via intraperitoneal durante um período de 7 dias no oitavo dia os animais foram sacrificados sendo coletado o baço, fígado, rins, tumor e sangue. Para os animais tratados com LSGLL01 e LSGLL02 também foi administrado de forma associada 200mg/Kg/dia de Levana.

A percentagem de inibição do crescimento do tumor (*TWI*%) foi calculada através da Equação: $\text{TWI}\% = [(C-T)/C] \times 100$, onde: *C* é a média das massas dos tumores nos animais do grupo controle, e *T* é a média das massas dos tumores do grupo tratado. O valor de *TWI*%, para o grupo padrão, é calculado também a partir da

⁹²MENENDEZ RC, Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas, *La Habana: Ciencias Medicas*, p. 205, 1985.

⁹³CHORILLI M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de Laboratório: o camundongo, *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28 (1), p. 11-23, 2007.

equação, bastando apenas substituir a média das massas dos tumores desse grupo em T .⁹⁴

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos e a análise histológica também foram realizados quando foi avaliada a atividade antitumoral dos complexos.

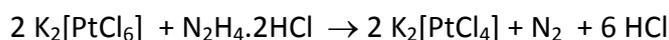
⁹⁴LIMA, R. M. O. C., S. C. NASCIMENTO, L. W. BIEBER, I. V. SOUZA, *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. 16 (3) p. 23-25. 1992.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

9. SÍNTESES DOS COMPLEXOS DE PLATINA

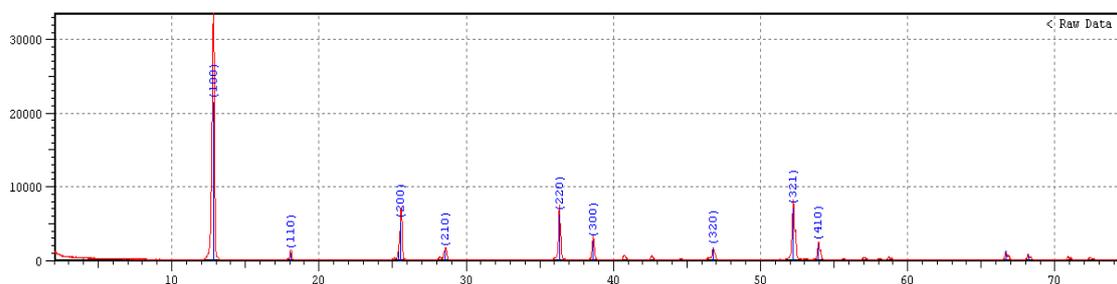
O composto tetracloroplatinato de potássio, precursor da síntese dos complexos de platina, foi produzido com excelentes rendimentos reacionais (90%) e a reação de obtenção é apresentada na Figura 7.

Figura 7. Reação da síntese do complexo tetracloroplatinato (II) de potássio, partindo do complexo hexacloroplatinato (IV) de potássio.



Os cristais obtidos tiveram forma de agulha com coloração vermelha. O difratograma de raios-X do composto é apresentado na Figura 8.

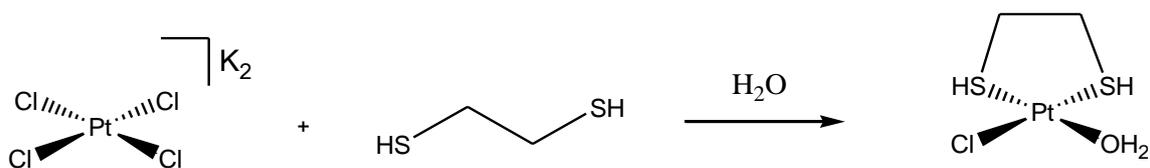
Figura 8. Difratograma de raios-X do tetracloroplatinato de potássio sintetizado.



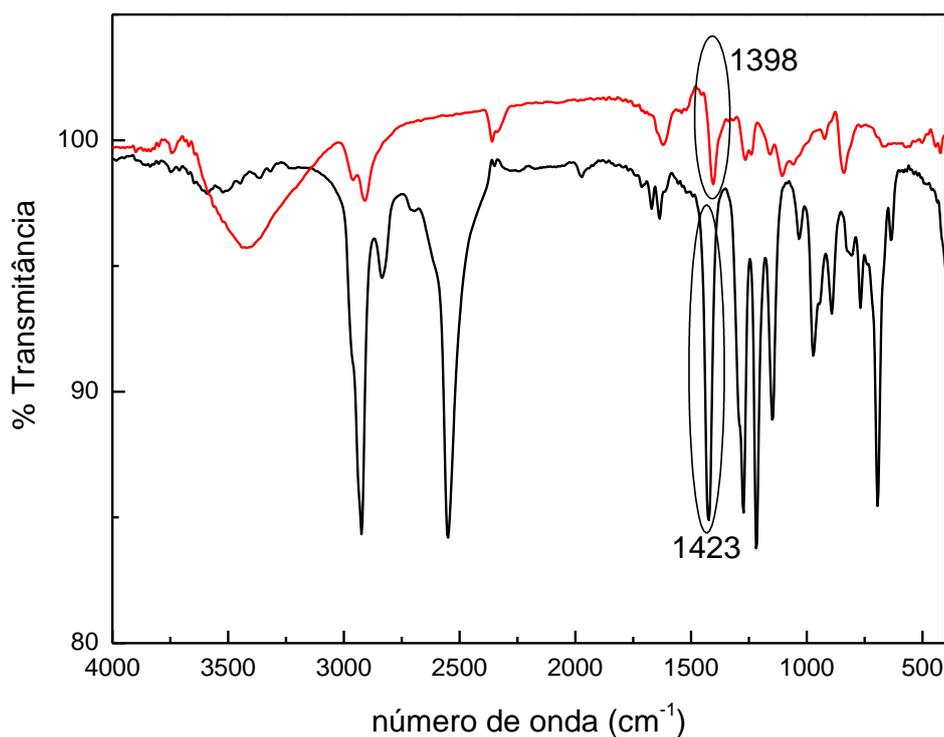
Em vermelho está disposto o difratograma do complexo sintetizado sobreposto com os dados obtidos do padrão de $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (em azul) (cartão de nº. 26-0331, do banco de dados JCPDS). Através desses dados é possível afirmar a formação do composto desejado.

10. SÍNTESE DO LSGLL01

O composto LSGLL01 foi obtido na forma de um pó de coloração preta. A reação de formação do complexo é apresentada na Figura 9.

Figura 9. Reação da síntese do complexo LSGLL01.

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada a fim de verificar possíveis deslocamentos associados a coordenação do íon metálico. Devido a isso, o estiramento C-S foi monitorado. Na Figura 10 encontram-se os espectros de infravermelho para o 1,2-ditioletano e do composto LSGLL01, sobrepostos.

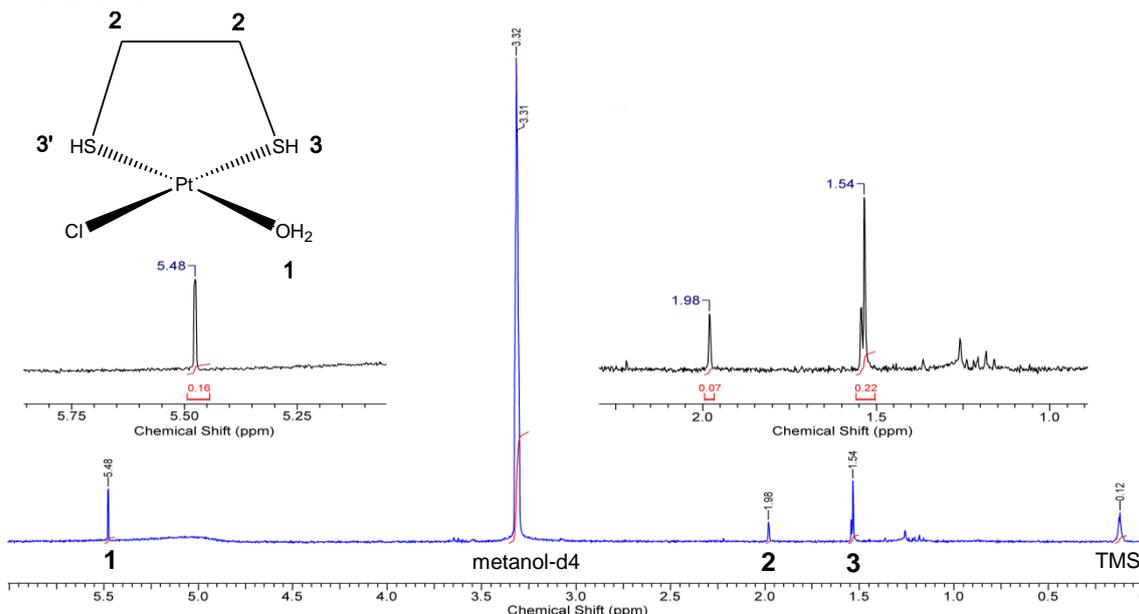
Figura 10. Espectros de infravermelho para o 1,2-ditioletano e do composto LSGLL01.

A partir da análise dos espectros de infravermelho do ligante e do complexo LSGLL01, observa-se o deslocamento da frequência relativa ao estiramento C-S (1423 cm^{-1}) para menor frequência no caso do complexo (1400 cm^{-1}) sugerindo que houve a coordenação ao centro metálico. A frequência vibracional na região do infravermelho apresenta valores menores para massas maiores (PAVIA et al., 2010), de modo que,

com a formação de uma nova ligação (ligação coordenativa), com o centro metálico contribui para uma diminuída frequência vibracional.

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo LSGLL01 é apresentado na Figura 11.

Figura 11. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H para LSGLL01, realizado em metanol-d4.

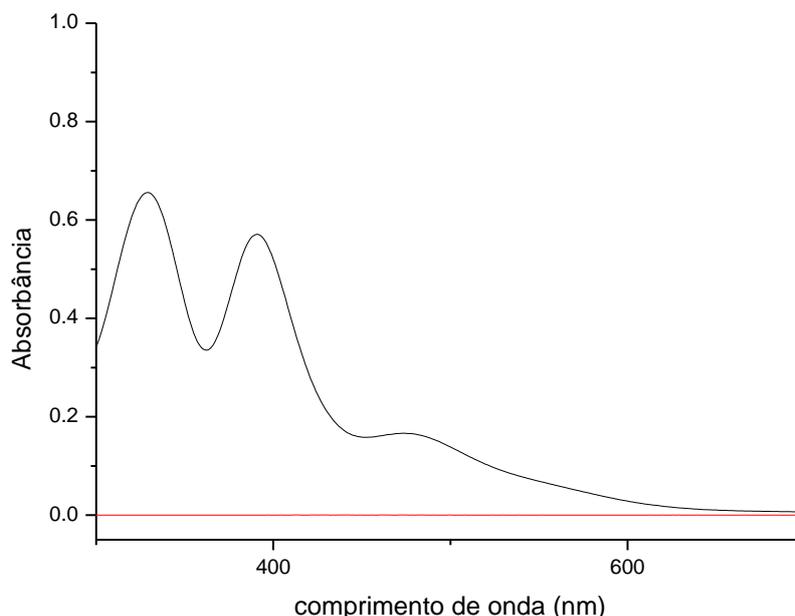


Segundo análise do espectro de RMN ^1H do complexo LSGLL01 é possível observar um sinal em 5.5 ppm referente aos prótons da água coordenada, em 1.98 ppm referente aos grupos etilênicos, e, em 1.54 ppm referente aos prótons do grupo SH.

A espectroscopia de absorção eletrônica foi utilizada no intuito de verificar possível interação entre a platina e o 1,2-ditioletano. Na Figura 12 são apresentados os espectros de absorção dos complexos $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ e LSGLL01 sobrepostos, obtidos em solução aquosa ($10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$).

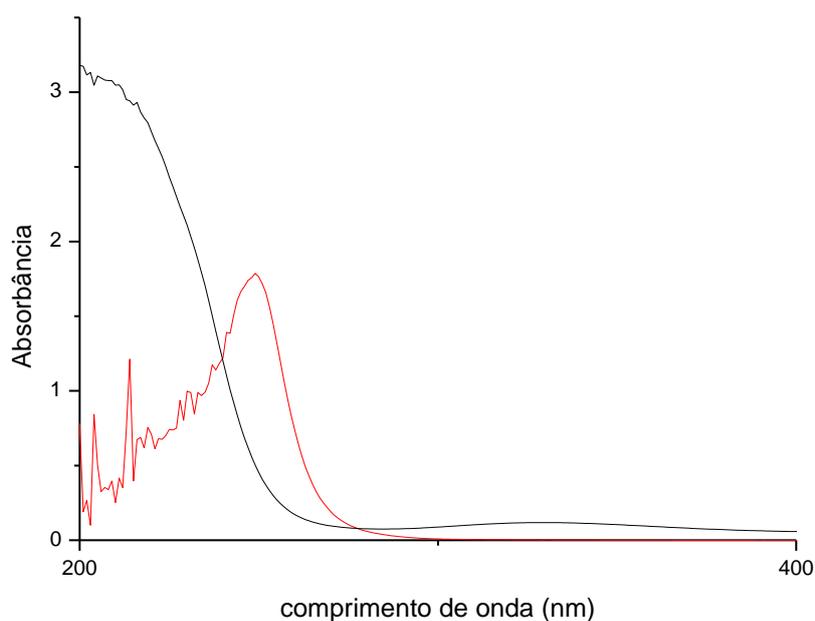
Segundo LIM et al (2014)⁹⁶ o espectro UV-vis a partir de uma solução aquosa de K_2PtCl_4 exibiu dois picos característicos associados com a 330 e 395 nm, o que corroboram para os dados apresentados para o mesmo complexo produzido nesta tese.

Figura 12. Espectros de absorção dos complexos $K_2[PtCl_4]$ (em preto) e LSGLL01 (em vermelho) sobrepostos (região de 300-700 nm).



Através do espectro de absorção é possível verificar a ausência das bandas, na região do visível, características do complexo precursor, sugerindo que a espécie formada apresenta estrutura eletrônica diferente do complexo de partida. Isto é um indício da formação do complexo desejado. Na Figura 13 são apresentados os espectros de absorção eletrônica do complexo LSGLL01 e o ligante 1,2-ditioetano.

Figura 13. Espectros de absorção do complexo LSGLL01 (em vermelho) e do ligante 1,2-ditioetano (em preto) sobrepostos (região de 200-400 nm).



Através dos espectros de absorção é possível verificar no ligante a presença de duas bandas em 205 e 325 nm; já no caso do complexo aparece uma banda em 249 nm. Esta mudança no perfil eletrônico do complexo sugere a coordenação do ligante ao íon Pt(II).

11. SÍNTESE DO LSGLL02

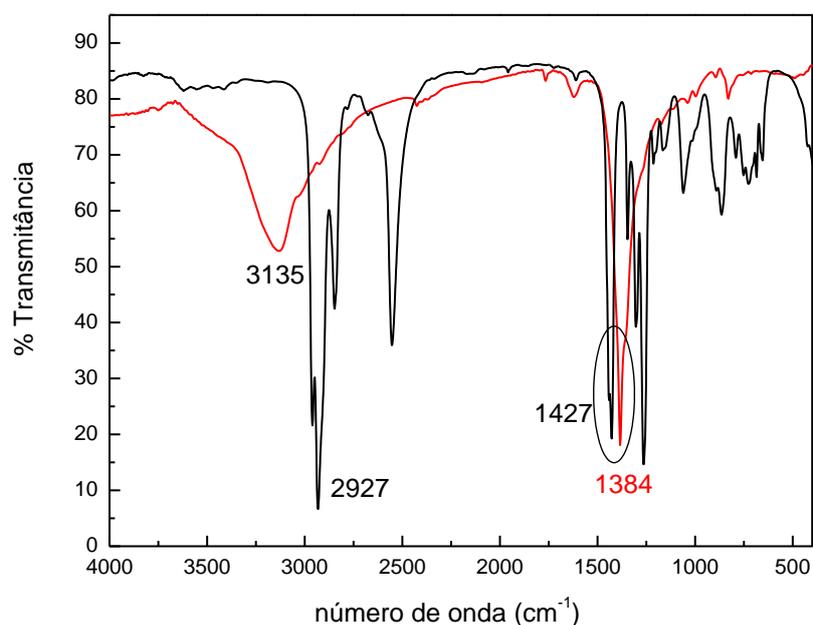
O composto LSGLL02 foi obtido na forma de um pó de coloração verde. A reação de formação do complexo é apresentada na Figura 14.

Figura 14. Reação da síntese do complexo LSGLL02.



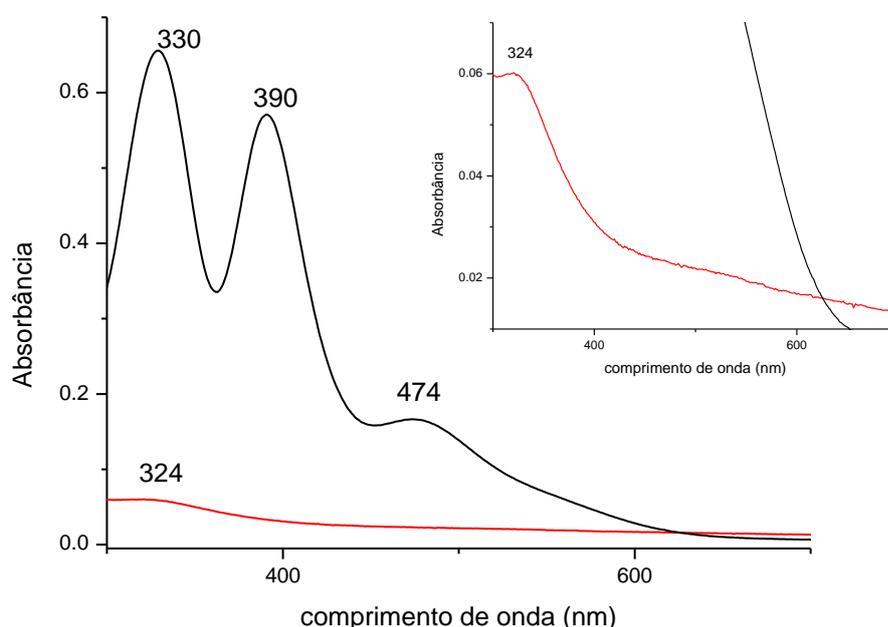
Na Figura 15 são apresentados os espectros de infravermelho do ligante 2 e o complexo LSGLL02, sobrepostos.

Figura 15. Espectros de infravermelho do ligante 2 e do complexo LSGLL02, sobrepostos.



O espectro do ligante apresenta estiramentos em regiões características, como grupos C-S e SH, em 1427 e 2927 cm^{-1} respectivamente. No complexo observa-se a presença de uma banda referente ao estiramento OH das moléculas de H_2O coordenadas em 3135 cm^{-1} , e a banda de C-S deslocada para menores frequências, sugerindo a coordenação efetiva do íon Pt(II) ao ligante 2. Na Figura 16 são apresentados os espectros de absorção dos complexos $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ e LSGLL02 sobrepostos, obtidos em solução aquosa ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

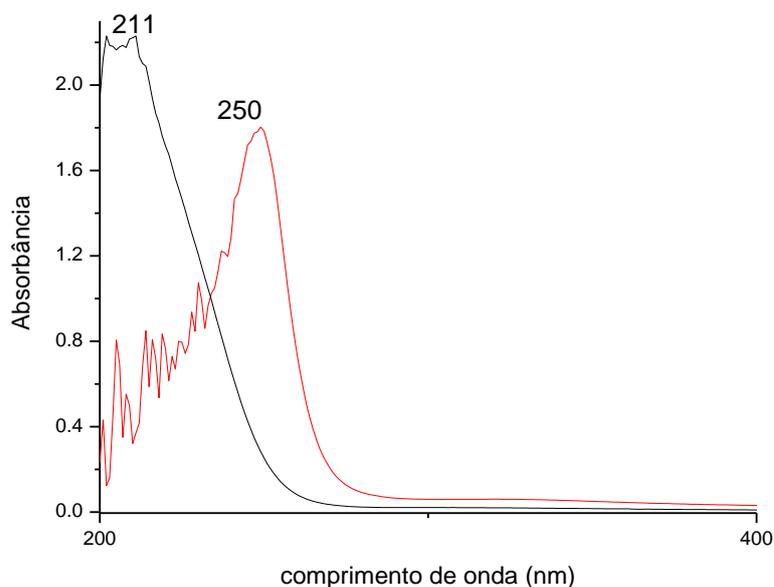
Figura 16. Espectros de absorção dos complexos $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (em preto) e LSGLL02 (em vermelho) sobrepostos (região de 300-700 nm).



Através do espectro de absorção é possível verificar a presença de uma banda no complexo em 324, na região do visível, característica do complexo precursor. As bandas em 390 e 474 nm oriundas do tetracloroplatinato (II) de potássio não são observadas no complexo LSGLL02, sugerindo que a espécie formada apresenta estrutura eletrônica diferente do complexo de precursor.

Na Figura 17 são apresentados os espectros de absorção eletrônica do complexo LSGLL02 e o ligante 2.

Figura 17. Espectros de absorção do complexo LSGLL02 (em vermelho) e do ligante 2 (em preto) sobrepostos (região de 200-400 nm).



Através dos espectros de absorção é possível verificar no ligante a presença de uma banda em 211 nm; já no caso do complexo aparece uma banda em 250 nm. Esta mudança no perfil eletrônico do complexo, deslocamento para maiores comprimentos de onda, sugere a coordenação do ligante ao íon Pt(II).

12. LEVANA

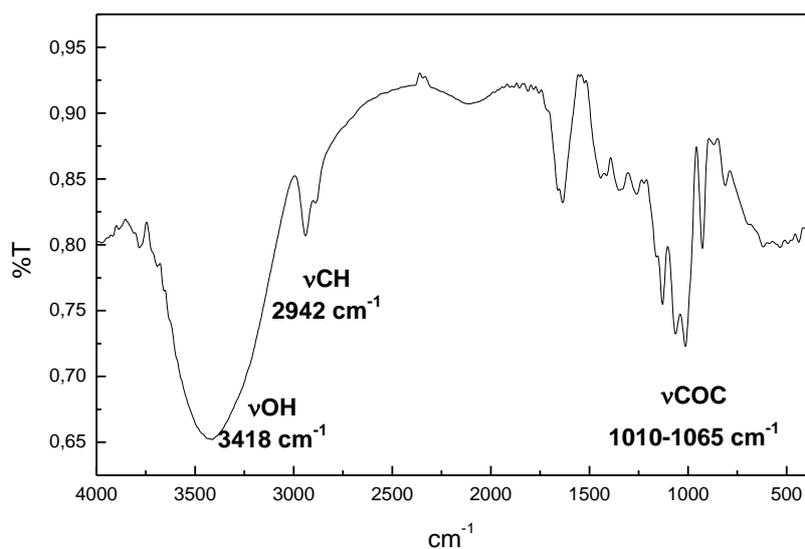
Foi utilizada uma linhagem de *Zymomonas mobilis* codificada como ZAG-12. Todos os meios de cultura foram preparados em béquer com água destilada e, em seguida, distribuídos em tubos de ensaio ou erlenmeyers tamponados e esterilizados em autoclaves a 121°C por 15 minutos. Em meio de cultura *Agar Nutritivo* não foi verificado contaminação durante os processos de crescimento e fermentação.

Após 48h de incubação a 30°C no meio de pré-fermentação, o produto foi incorporado no meio de Fermentação, onde ocorre a produção do polissacarídeo por 72h na mesma temperatura. Após 72h de fermentação, os meios foram centrifugados e filtrados. A fração de levana desejada (F70) foi obtida após adição da concentração etanólica. Dessa forma, precipitou-se a levana na concentração de 70%, codificadas de F70. A levana produzida foi liofilizada e apresentou-se na forma de um pó de coloração branco-amarelado. O rendimento da produção de levana foi de aproximadamente 5g L⁻¹ (g obtidas por litro do meio). Com base na produção da F70 por parte do

microrganismo (nas condições mencionadas), esta foi escolhida para a utilização junto ao composto de platina no tratamento antitumoral.

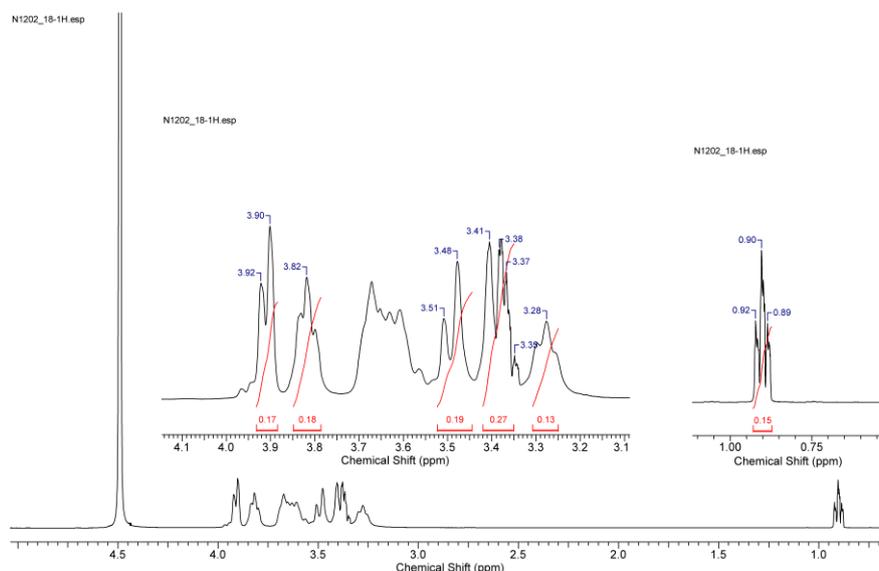
O espectro na região do infravermelho da levana F70 (Figura 18) foi realizado utilizando pastilha de KBr.

Figura 18. Espectro de infravermelho da levana F70.



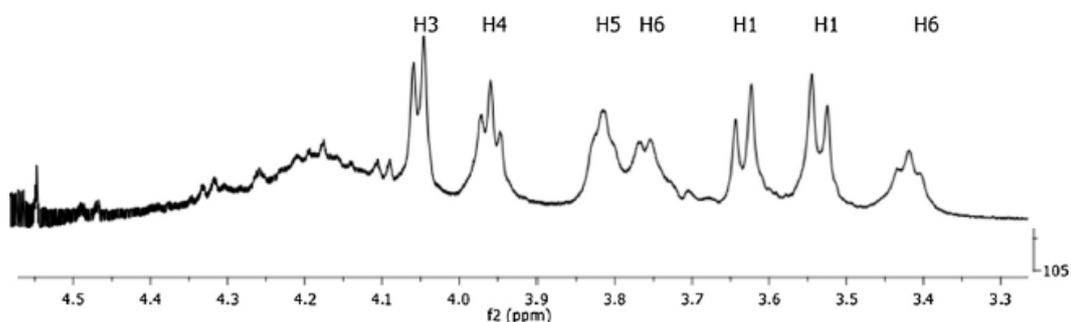
A partir do espectro observa-se uma banda de absorção forte, referente ao estiramento OH, na região de 3418 cm^{-1} . Entre $1010 - 1065 \text{ cm}^{-1}$ foram possíveis observar a presença de dois picos referentes aos grupos C-O-C, sendo o de maior frequência atribuído ao grupo éter do anel furanosídico, enquanto o de menor frequência refere-se ao da ligação glicosídica. É possível observar também a presença de duas bandas em 2942 cm^{-1} referente aos grupamentos CH presentes na estrutura do polissacarídeo. Na Figura 18 é apresentado o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H da levana, adquirido em D_2O .

Os dados obtidos são similares ao apresentado por ERGINER et al (2016) onde para todas as amostras de Levana, a ampla e banda de absorção característica a 3200 cm^{-1} devido ao alongamento OH dos anéis da frutofuranose, grupos $\text{CH}_2\text{-OH}$ e dois bandas de cerca de $2,850 \text{ cm}^{-1}$ são devidas ao (C-H) vibração de alongamento de resíduos de frutose. Além disso, as bandas de absorção observadas a $950, 1000$ e 1100 cm^{-1} são devidas as vibrações de dobramento C-O-C dos anéis da frutofuranose e das ligações glicosídicas.

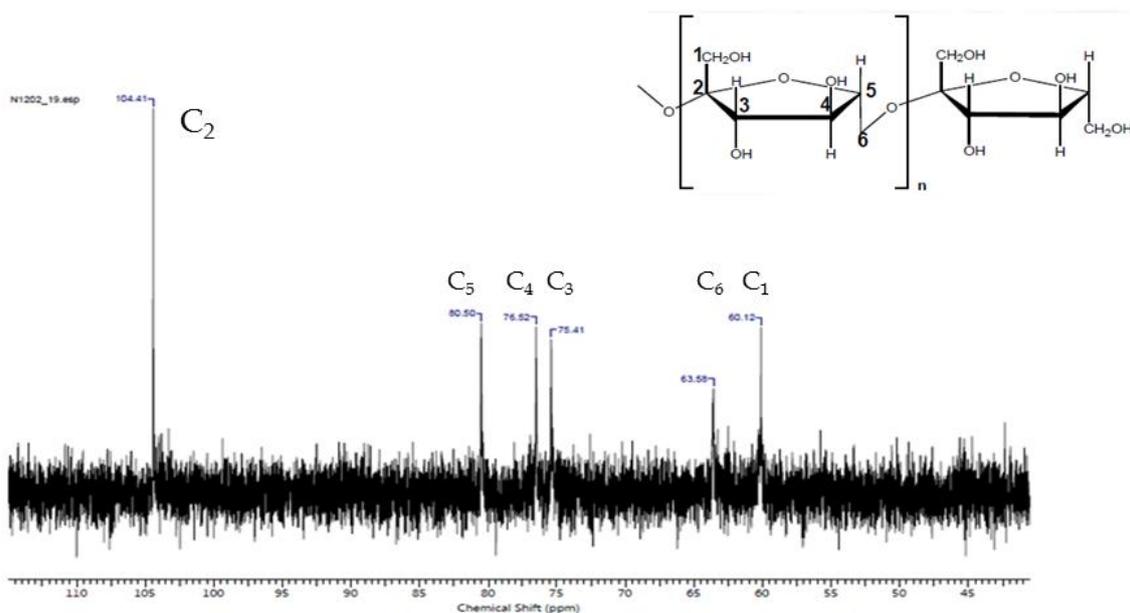
Figura 19. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H para Levana F70.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 19) é possível observar sinais entre 4,2 e 3,2 ppm, referentes aos prótons presentes na estrutura da levana. Na Figura 18 é apresentado o espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da levana, realizado em D_2O .

Os dados obtidos são similares ao apresentado por ERGINER et al (2016) onde os correspondentes picos ^1H RMN (ppm): H1 (3,54), H6 (3,76), H4 (3,96), H3 (4,05) e H5 (3,81) são os picos característicos de levana nativa, demonstrado na figura abaixo.

Figura 20. Dados de ^1H RMN por ERGINER et al (2016).

É importante notar que a ausência do pico do hidrogênio do carbono anomérico no espectro ^1H NMR indicou ligação linear (β -2-6) das unidades de fructofuronose da levana nativa. Neste mesmo trabalho, o espectro de ^{13}C RMN picos (ppm): C1 (59,8), C6 (63,3), C4 (75,0), C3 (76,2), C5 (80,2) e C2 (104) corroboram para caracterização da levana produzida nesta tese apresentada na figura 21.

Figura 21. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C em D_2O para Levana F70.

O espectro de RMN ^{13}C da levana F70 apresentou os seguintes picos:

C1 - 59,87; referentes ao carbono que apresenta maior blindagem sendo deslocado para a direita.

C2 - 104,32; referente ao carbono anomérico (ligado diretamente a dois átomos de oxigênio).

C3, C4 e C5 - 76,30, 75,24 e 80,39; referentes aos carbonos metina do anel furanosídico.

C6 - 63,46; referente ao carbono metileno lateral que forma ligação glicosídica.

A espectroscopia de ressonância magnética de ^{13}C e ^1H também são amplamente utilizados na caracterização da levana. Segundo JATHORE et al (2012), a levana produzida por uma linhagem de *Zymomonas mobilis* apresentou os seguintes desvios químicos em ppm: **C1**- 60,761; **C2**- 104,641; **C3**- 77,683; **C4**- 75,754; **C5**-80,783; **C6**- 63,957. Essas dados corroboram para caracterização da levana produzida pela linhagem de *Z. Mobilis* utilizada neste trabalho.

13. ENSAIOS BIOLÓGICOS

13.1. Estudo de citotoxicidade (*in vitro*)

Os compostos LSGLL01 e LSGLL02 foram testados na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens testadas conforme apresentado no Tabela 2.

Tabela 2. Percentual de inibição tumoral *in vitro*.

Produtos teste	% de inibição							
	Hep-2	DP*	HT-29	DP	MCF-7	DP	HL-60	DP
LSGLL 01	0,0	0,0	0,0	0,0	8,7	0,0	5,2	0,0
LSGLL 02	21,1	0,4	F	0,0	28,5	0,2	3,1	0,0
Doxorrubicina	79,4	2,6	64,1	1,1	74,8	2,1	92,9	0,6

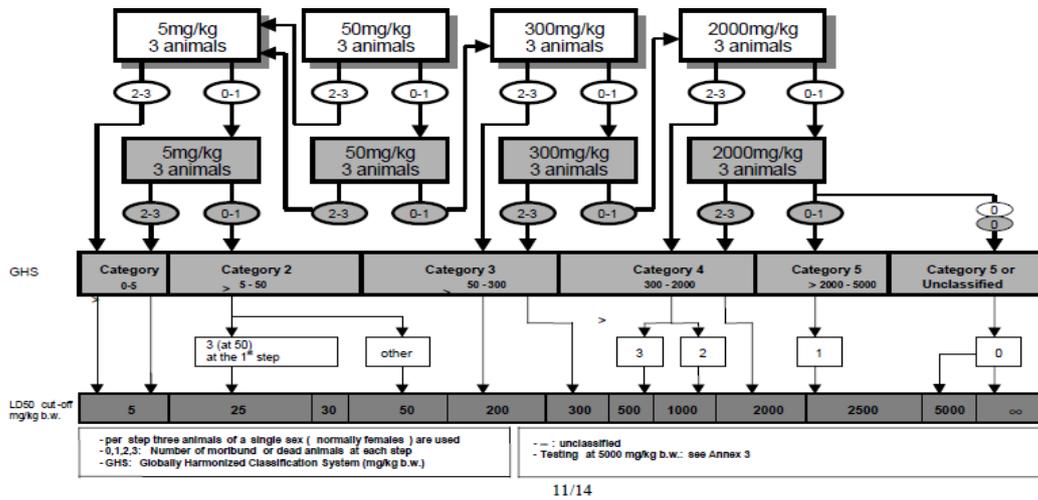
*DP = desvio padrão.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos antineoplásicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Os principais problemas apresentados neste tipo de ensaio biológico (para os complexos desenvolvidos) foi a dificuldade de solubilização. Havendo precipitação do produto no meio de cultura, não pode ser afirmado que estes não exercem ação inibitória e o resultado podem ser um falso-negativo, para alguns compostos, uma ação citotóxica baixa ou inexistente, como foi confirmado pelos testes *in vivo* realizados em seguida.

13.2. Toxicidade Aguda (Ensaio *in vivo*)

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados segundo o protocolo (Figura 21) da **OECD/OCDE 423** – *Organization for Economic Cooperation and Development* (2001) para os compostos LSGLL01, LSGLL02, levana e cisplatina.

Figura 22. Esquema do protocolo OECD utilizado para determinação da letalidade dos compostos.



Grupos de três camundongos albinos *swiss* fêmeas receberam via oral os compostos na dose de 300 mg/kg (LSGLL01 e LSGLL02), 2000 mg/kg (Levana) e o grupo controle recebeu o veículo (salina com 10% de Tween 80). Os animais foram observados na primeira hora após a administração pelo método de *screening* hipocrático (MALONE & ROBICHAUD, 1962). Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia). Durante 14 dias seguintes foram avaliados o consumo de água, ração, peso corporal e mortalidade. No último dia de observação, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue (exame hematológico) por punção cardíaca e coleta de órgãos (fígado, rim e baço) para observação macroscópica de lesões (histopatológico). Este experimento foi repetido, sendo o n final igual a 6 animais por grupo (OECD, 2001).

Frente aos dados de toxicidade aguda obtidos para os compostos testados os resultados são apresentados no Quadro 2.

Quadro 02. Resultados de toxicidade aguda, segundo OECD.

Produto teste	Nº de óbitos	Classe OECD
Levana 2000 mg/Kg	0	5
Cisplatina 50 mg/Kg	0	1
LSGLL01 300 mg/Kg	0	3
LSGLL02 300 mg/Kg	0	3

Com base nesse teste de toxicidade foi escolhida a concentração terapêutica de: 1mg/Kg para o tratamento antimuloso com Cisplatina e, embora os compostos LSGLL01 e LSGLL02 apresentem uma classificação diferente da cisplatina indicando o possível uso de uma dose terapêutica mais elevada, a dose utilizada também foi de 1mg/Kg para esses compostos, em virtude da possibilidade de risco aumentado de efeitos colaterais que essas drogas pudessem promover; e, 200 mg/kg para o tratamento antitumoral com Levana.

13.2.1 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

As análises sanguíneas dos animais foram realizadas no BIOFARMATOX-UFPE (Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos), e a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca. Análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador automático para química clínica (Cobas Mira Roche®). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos contendo acelerador de coagulação (Minicollect® – Greiner Bioum) e sem anticoagulantes, a 3500 rpm por 5 minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), uréia e creatinina. Análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo EDTA, utilizando um analisador automatizado hematológico (Contador de sangue animal Vet abcTIM). Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas.

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos estão demonstrados nas figuras 23 e 24, e serão considerados como referência para avaliação dos resultados em procedimentos experimentais que utilizaram os roedores do BIOFARMATOX como controle.

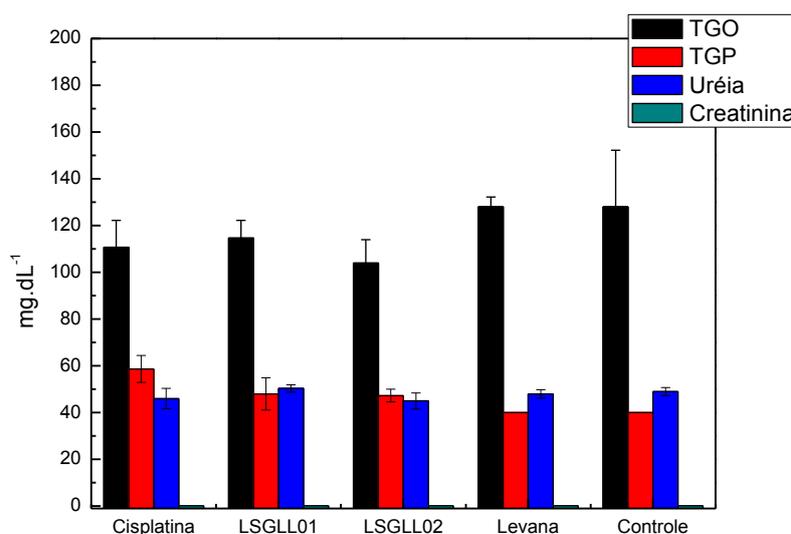
Seguindo os parâmetros Bioquímicos para Camundongos Swiss os valores encontram-se dentro da normalidade da espécie para todas as substâncias teste, e

podemos inferir que não houve qualquer alteração fisiológicas acerca dessas substâncias.

O teste bioquímico foi realizado coletando as amostras em tubos com ativador de coágulo e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. O soro obtido foi analisado em BIOPLUS 2000 utilizando kits bioquímicos Labtest para os seguintes parâmetros: uréia, creatinina, aspartato-transaminase (TGO), alanina-transaminase (TGP).

As concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, TGO e TGP estão apresentados na Figura 23. Os valores de creatinina não apresentaram alterações em relação ao grupo controle. Os valores de TGO e TGP apresentaram discreta diminuição da concentração sérica nos grupos tratados, entretanto, não houve diferença estatística em função da grande variância encontrada nas amostras do grupo Controle. Os valores apresentados para por todos os grupos, se comparados ao grupo Controle, resultaram em discretas alterações da concentração dessas proteínas no plasma sanguíneo (Figura 23), entretanto os valores estão dentro do limite de normalidade. Assim, apesar de reduções nos níveis plasmáticos das proteínas totais geralmente estarem associadas com doenças renais ou hepáticas é possível excluir esta possibilidade por este presente estudo.

Figura 23. Concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, TGO e TGP de camundongos durante toxicidade aguda para os compostos Cisplatina, LSGLL01, LSGLL02, levana e grupo controle.

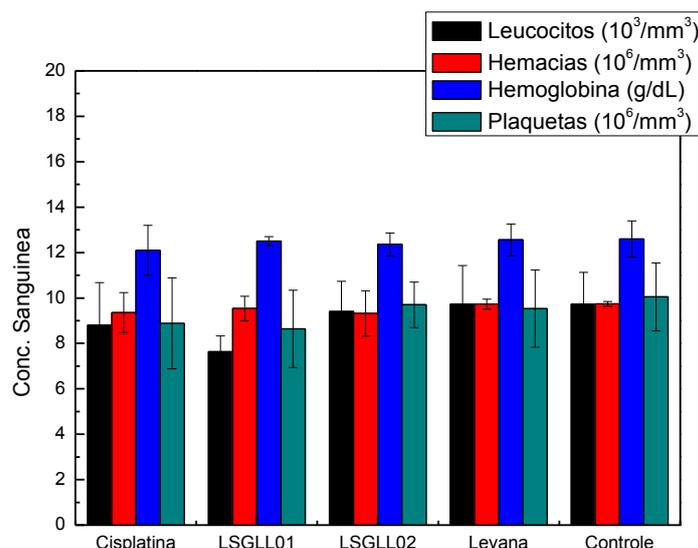


Para o teste hematológico, amostras sanguíneas foram coletadas em tubos contendo EDTA K2 e analisadas em contador hematológico de células ABX micros 60 (HORIBE medical).

Vários parâmetros hematológicos foram analisados. No entanto, apenas os resultados hematológicos mais significativos foram utilizados para comparação no teste de toxicidade aguda e estão apresentados na Figura 24. Os padrões hematológicos podem ser alterados por diversas razões como por exemplo, infecções, inflamação, câncer e leucemia que aumentam ou diminuem os níveis de alguns fatores sanguíneos como os leucócitos. Como a quimioterapia é um tratamento destinado a eliminar células de rápido crescimento, ela também acaba afetando células saudáveis. Entre essas células, estão aquelas responsáveis pelas ações no sangue. Nos tratamentos quimioterápicos ocorre a depleção de hemácias, leucócitos, eritrócitos e plaquetas, portanto o desenvolvimento dos fármacos com a finalidade antitumoral devem ser avaliados quanto sua capacidade de alterar esses níveis sanguíneos.

Seguindo os parâmetros hematológicos para os camundongos *swiss*, destaca-se apenas a concentração de leucócitos do grupo tratado com LSGLL01 que apresentou leve diminuição no sangue em relação ao grupo controle, os outros parâmetros encontram-se dentro da normalidade da espécie para as substâncias teste LSGLL01, LSGLL02, e podemos inferir que não qualquer alteração fisiológica acerca dessas substâncias para as concentrações testadas. Destaca-se a inexistência de modificações estatisticamente relevando quando comparamos o grupo controle com o grupo que recebeu a Levana.

Figura 24. Concentrações sanguíneas de parâmetros hematológicos camundongos durante toxicidade aguda para os compostos Cisplatina, LSGLL01, LSGLL02, levana e grupo controle.



13.2.2 Análise histológica

Após a eutanásia, o fígado, baço e rins dos animais foram fixados em formalina tamponada 10%. Após a desidratação dos tecidos com banhos sucessivos em álcool e diafanização com xilol, as peças foram incluídas em parafina. Cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura foram colhidos em lâminas e coradas em hematoxilina e eosina e foram observados ao microscópio de luz. Os resultados estão fase de avaliação final.

13.3. Avaliação da atividade antitumoral

Os animais que recebem células do sarcoma-180, foram divididos em quadro grupos formados por seis a oito animais para cada droga, foram implantados, na região axilar, com 25×10^6 células do sarcoma. Esses animais receberam soro fisiológico (Controle), Cisplatina, LSGLL01 e LSGLL02. Passado 48h os animais de cada grupo foram submetidos ao tratamento com as drogas *cisplatina* (1mg kg^{-1}), LSGLL01 (1 mg kg^{-1}) e LSGLL02 (1 mg kg^{-1}). Passado 48 horas os dois grupos de animais foram submetidos ao tratamento com as drogas quais foram administradas pela via intraperitoneal durante um período de 7 dias no oitavo dia os animais foram sacrificados sendo coletado o seus baço, fígado, rins, tumor e sangue.

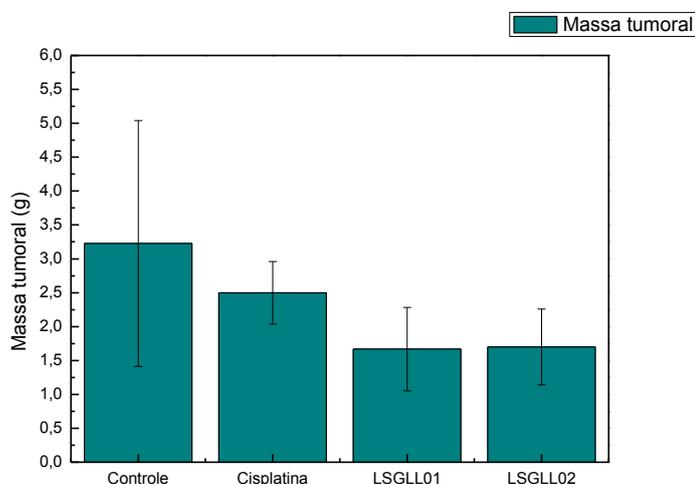
Para os animais tratados com LSGLL01 e LSGLL02 também foi administrado de forma associada 200mg/Kg/dia do polissacarídeo Levana.

A percentagem de inibição do crescimento do tumor (*TWI%*) foi calculada através da Equação: $TWI\% = [(C-T)/C] \times 100$, onde: *C* é a média das massas dos tumores nos animais do grupo controle, e *T* é a média das massas dos tumores do grupo tratado. O valor de *TWI%*, para o grupo padrão, é calculado também a partir da equação, bastando apenas substituir a média das massas dos tumores desse grupo em *T*. Na tabela 8 observamos a massa média tumoral (MMT) dos grupos testados com as drogas e dos controles. As massas tumorais de cada grupo e os desvios podem ser observados na Figura 25. O desvio apresentado no grupo controle pode ser explicado pelo número amostral reduzido devido ao óbito de um animal no experimento. Os valores de *TWI%* estão dispostos no Quadro 8.

Quadro 8. Massa média dos tumores (MMT) para os diferentes grupos de animais.

Grupo	MMT (g)	Tipo do tumor
Controle	3,2266	Sarcoma 180
Cisplatina	2,499	Sarcoma 180
LSGLL01	1,668	Sarcoma 180
LSGLL02	1,7006	Sarcoma 180

Figura 25. Massa média dos tumores de cada grupo avaliado, frente aos compotos e os respectivos desvios padrões.



Quadro 9. Percentual de inibição tumoral frente a tratamento com Cisplatina, LSGLL01 e LSGLL02.

Produto teste	% de inibição tumoral	
	Sarcoma 180	Observações
Cisplatina (1mg kg ⁻¹)	22,06%	Nenhum óbito foi registrado.
LSGLL01 (1 mg kg ⁻¹)	47,28%	Nenhum óbito foi registrado
LSGLL02 (1 mg kg ⁻¹)	48,31%	Nenhum óbito foi registrado

Os resultados obtidos evidenciam uma diminuição dos tumores dos animais tratados. O LSGLL01 (1mg/kg/dia) causou significativa inibição do crescimento tumoral (aprox. 47%). O LSGLL02 (1mg/kg/dia) causou significativa inibição do crescimento tumoral (aprox. 48%).

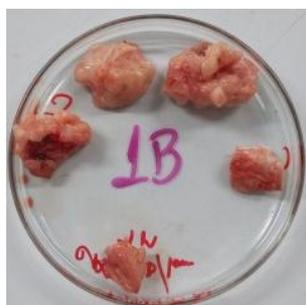
Os valores obtidos para os percentuais de inibição do crescimento do tumor (TWI%) dos compostos LSGLL01 e LSGLL02 apresentaram-se satisfatórios e comprovam sua ação como quimioterápico antineoplásico com efeitos colaterais atenuados. Mesmo para uma relação molar de platina por dose administrada inferior ao padrão de Cisplatina (cerca de 40%), ou seja, além da economia de platina para cada dose utilizada, os animais tratados com a presente invenção apresentaram-se menos

debilitados, evidenciado também, pelo aspecto toxicológico positivo para um regime quimioterápico proposto a partir das presentes invenções.

Adjunto a esses fatores positivos de ação antitumoral, a análise preliminar dos órgãos extraídos (fígado, rins e baço) não mostraram anomalias aparentes e metástases. Torna-se necessário ainda, a análise histopatológica dos tecidos dos órgão para confirmação dessas observações.

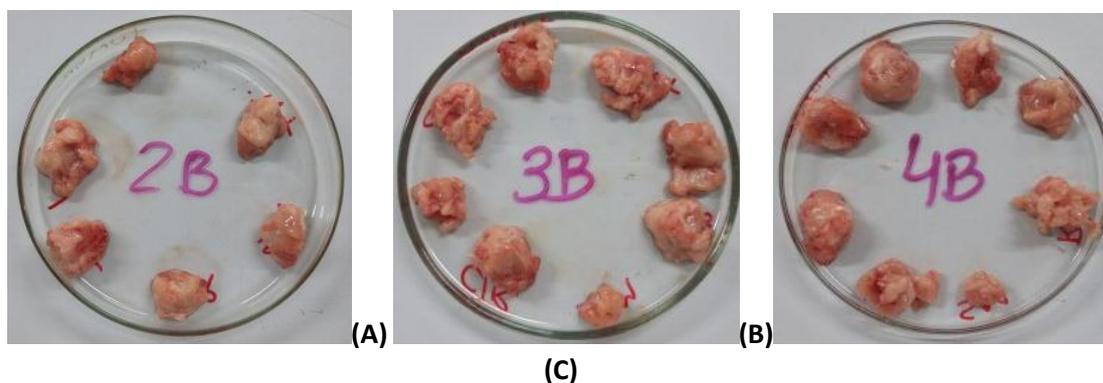
Na figura 26, encontram-se os tumores extraídos dos grupos controles (não tratados) de sarcoma 180 (A). Percebeu-se que os tumores apresentaram uma coloração avermelhada, podendo ser atribuída a uma vascularização intensa dos tumores.

Figura 26. Sarcomas 180 extraídos do grupo controle.



Na Figura 27, encontram-se os tumores extraídos dos grupos tratados de sarcoma 180. Percebeu-se que os tumores apresentaram uma coloração menos avermelhada, podendo ser indício de inibição de vascularização dos tumores.

Figura 27. Sarcomas 180 extraídos dos grupos tratados com Cisplatina (A), LSGLL01 (B), LSGLL02 (C).



No tempo de tratamento de 7 dias, todos os animais do estudo que foram tratados com as drogas LSGLL01 e LSGLL02 se apresentavam sem nenhuma alteração

física (apenas crescimento do tumor) e comportamental, e, nenhum animal foi a óbito. O mesmo não aconteceu com os animais do grupo controle do tumor, onde um animal foi à óbito. O efeito do tratamento nos parâmetros hematológicos (Ex.: hemácias, hemoglobina e leucócitos) dos animais dos grupos tratados também se apresentaram dentro da normalidade e superiores para os animais tratados com LSGLL01 e LSGLL02 (Figura 28), não demonstrando mielossupressão tão acentuada como nos tratamentos com a droga padrão Cisplatina. Nenhum animal do grupo tratado apresentou metástases. Enquanto que, no grupo controle um animal apresentou metástase no fígado. As massas dos órgãos (baço, fígado e rins) também foram avaliadas e encontram-se na figura 30, para os animais tratados, com os complexos, e para o grupo controle.

Figura 28. Parâmetros hematológicos dos animais dos grupos tratados e do controle.

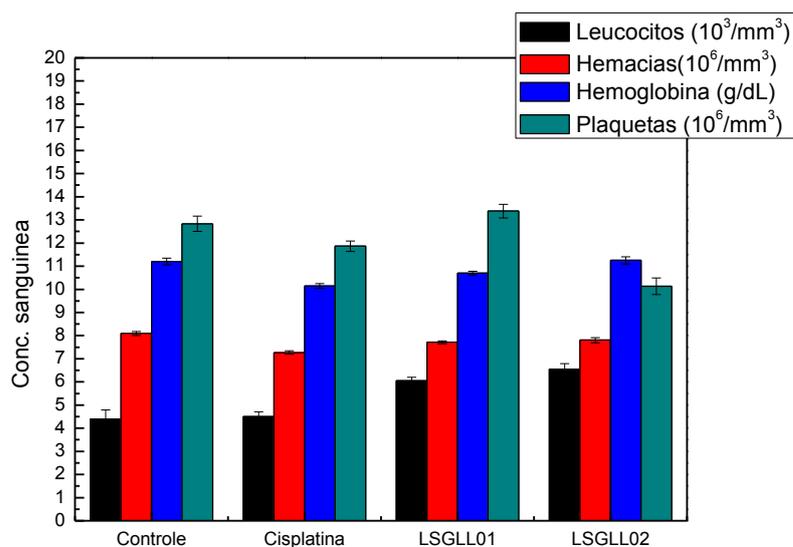
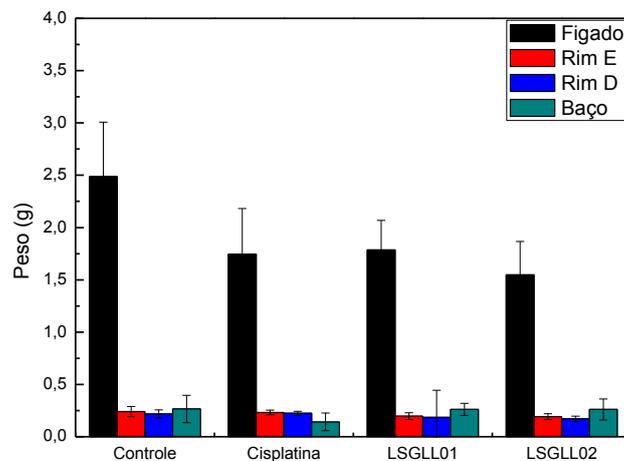


Figura 29. Massa média dos órgãos dos animais na avaliação da atividade antitumoral.

*E = esquerdo e D= direito.

As médias da massa corpórea dos animais durante os experimentos também foram avaliadas. As figuras 30 a 33 são apresentados os pesos corpóreos dos animais dos quatro grupos avaliados. Os dados apresentados na Figura 31 demonstram que a debilidade dos animais tratados com cisplatina apresentadas nos experimentos é confirmada pela perda acentuada de peso, reflexo dos efeitos colaterais da droga.

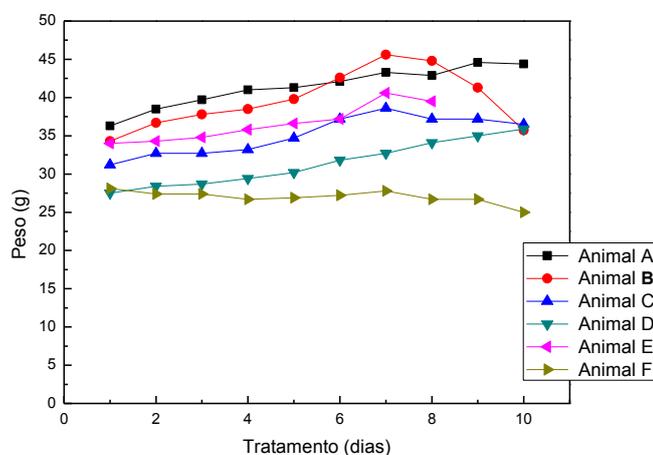
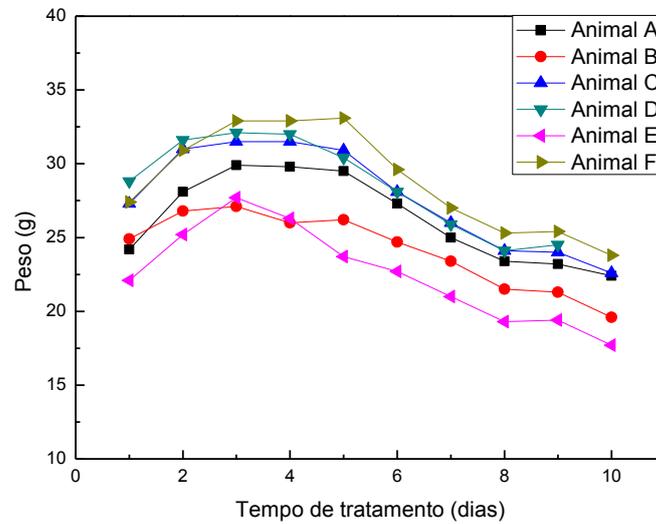
Figura 30. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo controle (sem tratamento).

Figura 31. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com Cisplatina CDDP.



O grupo tratado com LSGLL01 (figura 32) apresentou um aumento de massa em todos os animais do experimento, podendo indicar um reflexo positivo do tratamento frente ao estado clínicos dos animais. Na figura 33, são apresentados os dados para o grupo tratado com LSGLL02, onde se pode observar que a perda de massa não foi tão acentuada como no grupo tratado com cisplatina.

Figura 32. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com LSGLL01.

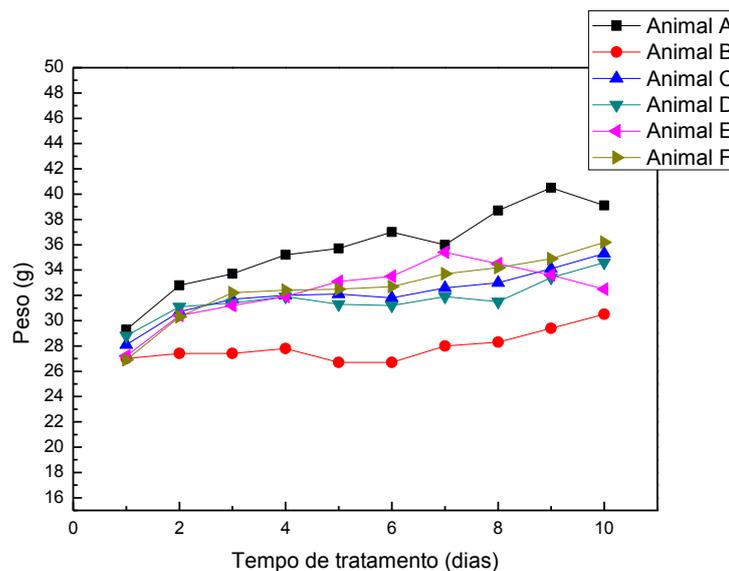
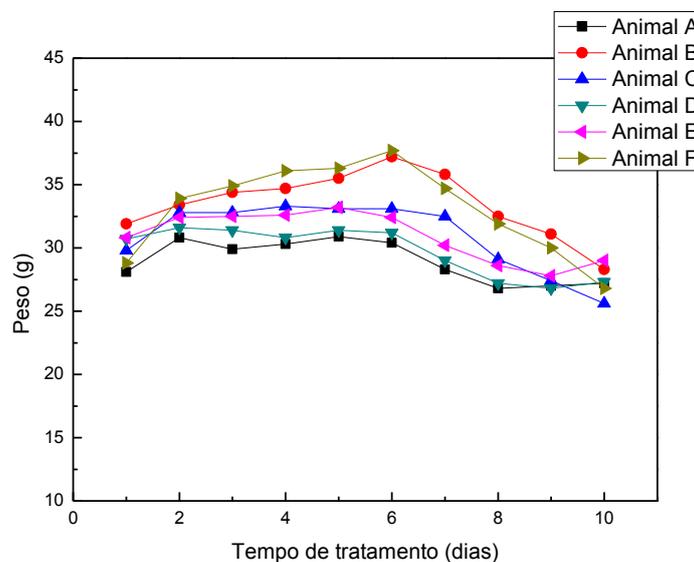
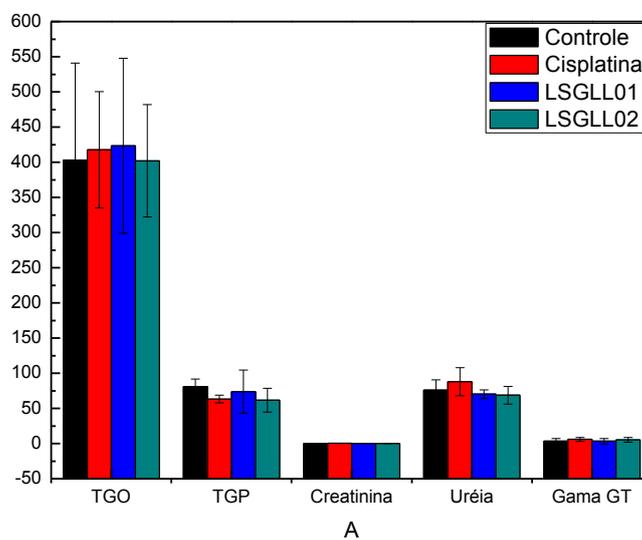


Figura 33. Massa corpórea versus tempo de tratamento para os animais do grupo tratado com LSGLL02



Resultados bioquímicos do teste antitumoral são apresentados na Figura 34.

Figura 34. Resultados bioquímicos do teste antitumoral.



Os resultados apresentados demonstraram maior perda de peso corporal dos camundongos tratados com CDDP do que aqueles tratados com LSGLL01 e LSGLL02, após administração via intraperitoneal. Pequenas alterações hematológicas e bioquímicas foram observadas após a administração das doses. Esses achados associados quando forem associados às alterações histopatológicas dos grupos pode

reafirmar o potencial antitumoral dos compostos desenvolvidos. Por outro lado, já podemos afirmar que o tratamento com LSGLL01 e LSGLL02 associados a levana não provocou modificações significativas, apenas alterações menos pronunciadas, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos camundongos no teste antitumoral. Nenhuma alteração morfológica foi observada em nenhum dos tratamentos. Tendo em vista a atividade antitumoral dos fármacos LSGLL01 e LSGLL02 comparados à Cisplatina podemos afirmar que os mesmos são candidatos promissores para a quimioterapia de tumores sólidos como o Sarcoma-180.

Com relação a esses fármacos, o composto LSGLL01 trata de um composto de coordenação de platina II, contendo em sua estrutura um único centro (núcleo) de platina e dois ligantes, sendo um dos ligantes bidentado neutro e o outro um ânion monodentado. Os compostos apresentaram atividade antitumoral contra células de Sarcoma-180, sendo este considerado um tumor sólido de baixo coeficiente de difusão de fármacos. Consideramos os mesmos como uma inovação tecnológica, do ponto de vista estrutural (novidade), e quanto ao seu potencial antitumoral. Quando comparado a um análogo comercial amplamente difundido, a cisplatina (CDDP), apresentou-se eficiente, com percentual de inibição tumoral superior ao do padrão utilizado e com efeitos colaterais atenuados para os animais testados, portadores de sarcoma 180.

Os conjugados baseados em matrizes inócuas apresentam diversas vantagens, como a melhoria da solubilidade dos compostos bioativos, a diminuição dos efeitos colaterais e a estabilização de compostos em solução. Esses efeitos desejados para os conjugados tornam as drogas baseadas em metais menos tóxicas sem o comprometimento de sua ação farmacológica.

Um dos grandes problemas envolvidos na terapia do câncer utilizando fármacos à base de platina está relacionado aos efeitos colaterais provocados pela administração desses compostos, os quais apresentam um potencial risco aos pacientes submetidos ao regime quimioterápico. A baixa média de sobrevivência dos pacientes constitui um reflexo da utilização de regimes quimioterápicos que não se preocupam com a adequação entre a dose ou composições sugeridas. Este problema juntamente com a expressão dos efeitos toxicológicos e ao mesmo tempo em que o regime quimioterápico sugerido poderá desencadear um processo de seleção natural entre as linhagens de células normais e tumorais, eliminando as mais susceptíveis,

deixando no corpo do paciente, já demasiadamente debilitado, as células tumorais mais resistentes, caracterizando o surgimento do fenômeno MDR, acarretando assim em um alto número de óbitos, muitas vezes através do próprio perfil toxicológico do fármaco ou coquetel utilizado.⁹⁵

Atualmente, a comunidade científica vem exaustivamente estudando as diversas expressões (genotípicas e fenotípicas) do fenômeno da resistência à multidrogas (MDR), que ocasiona a geração de células tumorais resistentes aos mais variados tipos de agentes quimioterápicos, independente de correlação estrutural ou mecanismo de ação. O MDR pode ser desencadeado pela alta toxicidade dos agentes antineoplásicos comercializados, conduzindo ao insucesso qualquer regime quimioterápico adotado pelos médicos. Entre os fármacos à base de platina é sabido que a cisplatina (CDDP) e a carboplatina (CBDCA) apresentam resistência cruzada, ou seja, pacientes tratados por CDDP que apresentam tumores resistentes apresentarão também resistência ao uso da CBDCA. A oxaliplatina e nedaplatina não desencadeiam o fenômeno MDR, porém apresentam restrições quanto a sua utilização, pois suas janelas de atuação entre os mais variados tipos de tumor são reduzidos quando comparados a CDDP, por exemplo. Além disso, estes fármacos possuem também efeitos colaterais severos como: mielosupressão e nefrotoxicidade.

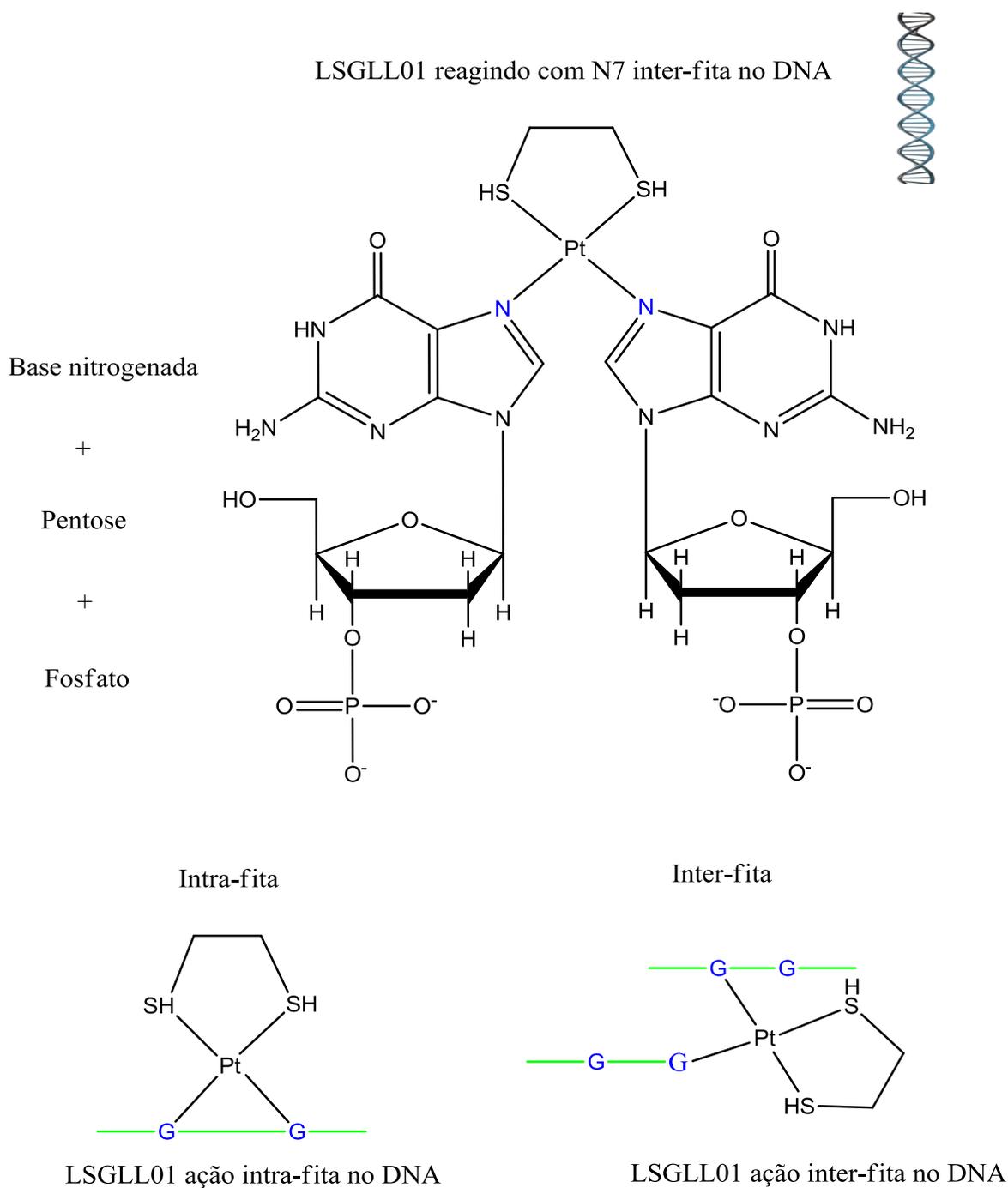
Foi apresentado neste trabalho dois complexos à base de platina (II); com atividade antitumoral satisfatória para uma administração de menores dosagens do composto à base de platina (quantidade molar de platina 25% inferior àquela utilizada para a dose do quimioterápico padrão (CDDP), disponível no mercado), o que pode conferir também, baixos efeitos colaterais em curto e longo prazo.

O mecanismo de ação proposto para o complexo LSGLL01 (Figura 31) desenvolvido é similar ao da cisplatina, o complexo atua formando ligação cruzada 1,2-intrafitita, no qual a platina (II) encontra-se ligada a duas bases adjacentes. A formação dos compostos de coordenação com a platina provoca distorções significativas na dupla hélice do DNA, causando desenovelamento e torção da sua estrutura, que por sua vez são responsáveis pela indução da apoptose (morte celular programada). O efeito menos tóxico do composto deveu-se a uma alta estabilidade dos ligantes na primeira

⁹⁵WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and clinical trials, *Dalton Trans.*, v. 39, p. 8113-8127, 2010.

esfera de coordenação, não propiciando com facilidade reações redox (danos oxidativos) aos rins.

Figura 35. Estrutura molecular proposta para ação do fármaco LSGLL01 na base nitrogenada (Guanina). LSGLL01 reagindo com os Nitrogênios 7 (N7) da base nitrogenada. Sua ação intra-fita e inter-fita do DNA.

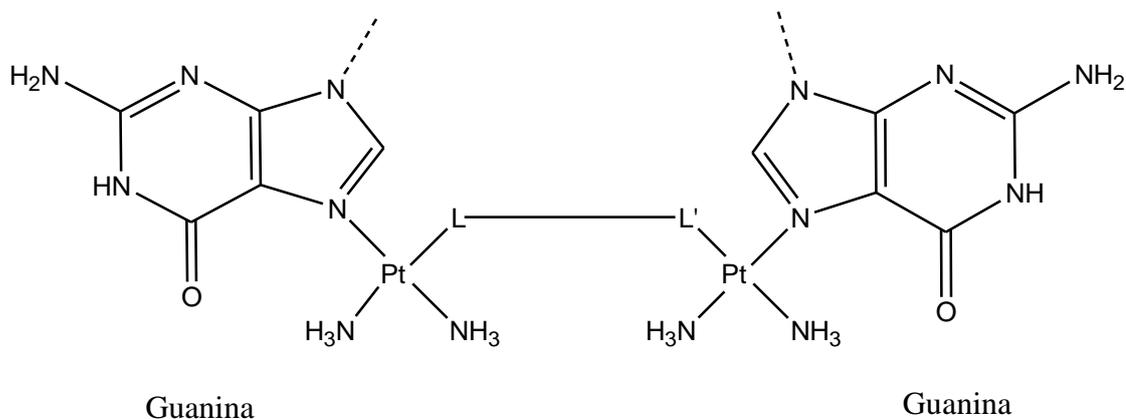


O procedimento de síntese adotado para a obtenção da presente invenção, codificado como LSGLL01, foi satisfatório uma vez que a rota sintética adotada apresentou bons rendimentos reacionais (~90%).

O complexo binuclear de platina II (LSGLL02), contendo em sua estrutura dois centros (núcleos) de platina (II) (complexo binuclear) e um ligante em ponte bidentado, composto de coordenação contendo dois centros de platina (II) e um ligante; o ligante caracterizado por ser um ligante em ponte entre os cátions Pt (II). A citotoxicidade do complexo binuclear sintetizado pode estar relacionada com a forma que os centros Pt(II) interagem com o nDNA (Figura 32) após a substituição de ligantes por água. No complexo LSGLL02 poderá ocorrer a hidrólise dos anéis de forma semelhante ao observado no mecanismo de hidrólise da nedaplatina e com isso a quantidade de ligações interfita do nDNA com os núcleos metálicos são favorecidas devido ao espaço que existe entre os centros. Sendo este tipo de interação mais citotóxica do que as ligações intrafitas, verificando assim, um aumento da atividade antitumoral desse composto para esse tipo de linhagem de células tumorais. Um fator que pode contribuir para a citotoxicidade desse complexo sintetizado deve-se ao fato de algumas linhagens celulares possuírem uma maior quantidade de proteínas transportadoras de cátions aumentando a captação e a dose antitumoral efetiva do composto proposto frente a certas linhagens de células tumorais.

Cada molécula deste complexo é capaz de gerar duas ligações monofuncionais com o nDNA. Este complexo liga-se na cavidade maior, podendo formar ligações cruzadas flexíveis, intra e interfita de longo alcance, sendo esta última, a principal delas. Por causa disso, a interação deste complexo causa diversas distorções na molécula do nDNA, que fazem com que estas ligações não sejam reconhecidos pelas proteínas HMG (*High mobility group*) responsável pela transcrição genética do sistema biológico.

Figura 36. Estrutura molecular proposta para ação do fármaco LSGLL02 na base nitrogenada Guanina. LSGLL02 reagindo com os Nitrogênios 7 (N7) da base nitrogenada na fita do DNA.



Os fármacos à base de platina estão entre os mais utilizados agentes quimioterapêuticos. A prevalência de resistência inerente e adquirida ao tratamento a base de platina, no entanto, exige o desenvolvimento de novos complexos que operam via diferentes mecanismos. Os desafios para os pesquisadores da área consistem em minimizar os efeitos colaterais dos medicamentos, e, simultaneamente, manter a sua potência contra as células cancerosas, além de estender um tratamento bem sucedido a uma variedade maior de tumores humanos. Os potenciais dos fármacos desenvolvidos LSGLL01 e LSGLL02 foram observados, no entanto faz-se necessário novos testes para a confirmação de suas benesses e estudos mais detalhados a cerca da ação desses fármacos nas células anti-tumorais.

CONCLUSÕES

A fração de levana utilizada foi caracterizada pelas técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , e por espectroscopia na região do infravermelho.

A combinação de quimioterápicos com polissacarídeos ofereceu benefícios como a vetorização para diferentes alvos biológicos em células cancerosas, maximizando assim a eficácia terapêutica e reduz o efeito adverso do tratamento.

Neste trabalho, dois compostos de platina foram propostos, sintetizados e caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e infravermelho.

Ambos foram obtidos dentro de valores apreciáveis de rendimento, e elevado grau de pureza. A metodologia sintética em solução (Água:Metanol) mostrou-se efetiva para a formação dos produtos finais. Os mesmos são estáveis durante as etapas de purificação. Portanto, essa metodologia apresentou-se satisfatória para a produção dos mesmos.

Os compostos com melhor atividade antitumoral foram os complexos LSGLL01 e LSGLL02, com atividade antitumoral maior que a CDDP. No entanto, novas estratégias de formulação podem ser desenvolvidas para o composto LSGLL01 e, desta forma, aumentar a solubilidade.

O efeito do tratamento nos parâmetros hematológicos (Ex.: hemácias, hemoglobina, plaquetas, linfócitos) dos animais dos grupos tratados com a presente invenção, se apresentaram dentro da normalidade, não demonstrando mielossupressão, além da não observação de metástases. O estado geral dos animais estava dentro da normalidade, apresentando quadros clínicos melhores que os animais tratados com cisplatina.

Comparando-se os dois compostos LSGLL01 e LSGLL02 conjugados à levana com a droga comercial CDDP e aos mesmos sem conjugação, os compostos conjugados nos ensaios de atividade biológica apresentaram uma melhor ação anti-proliferativa das células de S-180 nos camundongos. Com isso, sugere-se que esta associação é benéfica por exercer um efeito sinérgico na ação anti-tumoral.

Os resultados histopatológicos poderão indicar os efeitos menos tóxicos das formulações propostas em comparação com a CDDP.

Em conclusão, mantendo-se em consideração o potencial clínico e dose-limitante que leva a toxicidade da cisplatina, uma nova estratégia foi explorada compreendendo uma combinação de fármacos com base mecanismo simples de conjugação de polímero-droga. Considerando-se as características físico-químicas da levana, sua baixa toxicidade e seus efeitos sinérgicos ao tratamento anti-tumoral, duas formulações foram desenvolvidas e caracterizadas por vários parâmetros. O resultado resultou em um efeito anti-tumoral sinérgico que efetuará juntamente com a redução da dose da platina. Mais distante, a combinação polímero-droga foi superior quando comparada para a combinação de CDDP. As conclusões são de considerável importância tendo em vista as toxicidades dependentes da dose de compostos platínicos para o tratamento anti-tumoral. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o potencial desta combinação em diversos modelos animais.

PERSPECTIVAS

Com isso apresentado, a conclusão deste trabalho sugere a coleta de informações adicionais importantes acerca do:

- Obter os espectros de RMN de ^{195}Pt dos complexos sintetizados.
- Avaliar resultados histopatológicos dos órgão coletados.
- Determinação do perfil farmacocinético dos conjugados, isto é, o comportamento dos mesmos nos eventos de absorção, distribuição e metabolismo (ou biotransformação), eliminação e toxicidade.
- Determinar a concentração de platina nos órgãos extraídos do grupo tratado e padrão, a partir de medidas de absorção atômica para soluções preparadas a partir dos resíduos de digestão ácida (HNO_3 / HCl) oriundos desses tecidos;

REFERÊNCIAS

- ¹RUBIN, E.; RUBIN, R.; AARONSON, S. Neoplasia. Em *Bases clinicopatológicas da medicina*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. P. 172.
- ²PARDEE, A.B. Cell fates. Em: *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*. PARDEE, A.B; STEIN, G.S. Nova york: Springer, 2004, p. 60-96.
- ³MCKINNELL, R.G.; PARCHMENT, R.E.; PERANTONI, A.O.; PIERCE, G.B.; DAMJANOV, I. *The Biological Basis of Cancer*. Cambridge (United Kingdom), Cambridge University Press, 1998. p. 1-100.
- ⁴CHABNER, B.A.; ROBERTS JR. T.G. Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v. 5, p. 65–72, 2005.
- ⁵PAPAC, R.J. Origins of cancer therapy. *J. Biol. Med. Yale*, v. 74, p. 391–398, 2001.
- ⁶LI, M.C., HERTZ, R.; BERGENSTAL, D.M. Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *J. Med. N. Engl*, v. 259, p. 66–74, 1958.
- ⁷DEVITA JR , V.T., SERPICK, A.A.; CARBONE, P.P. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin’s disease. *Ann. Intern. Med.* v. 73, p. 881– 895, 1970.
- ⁸JAFFE N., E. FREI 3RD, D. TRAGGIS, Y. BISHOP, Adjuvant methotrexate and citrovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma, *N. Engl. J. Med.*, v. 291, p. 994–997. 1974.
- ⁹BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E.; CHRISTOFIS, P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy*, v. 5, p. 537–583, 2007.
- ¹⁰GOODMAN,J.; WALSH, V. *The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-cancer Drug*, Cambridge University, Cambridge, 2001.
- ¹¹POLLOCK, P.M.; MELTZER, P.S. Cancer: lucky draw in the gene raffle. *Nature*, v.417, p. 906–907,2002.
- ¹²HANAHAN, D.; ROBERT A. WEINBERG, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p. 646–674, 2011.
- ¹³ALMEIDA, V. L. DE; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Cancer and cell cicle-specific and cell cicle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction.*Química nova*, São Paulo,vol.28, nº.1 Jan./Feb. 2005.
- ¹⁴http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322., acessada em Junho, 2016.

- ¹⁵PEREZ-HERRERO, EDGAR., ALBERTO FERNANDEZ-MEDARDE. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 93, p. 52–79, 2015.
- ¹⁶CROCE, C.M. Oncogenes and cancer, *N. Engl. J. Med.* v. 358, p. 502–511, 2008.
- ¹⁷KRUG, U.; GANSER, A.; KOEFFLER, H.P.; Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis, *Oncogene*, v. 21, p. 3475–3495, 2002.
- ¹⁸KUFE, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHELBAUM, R.R.; BAST, R.C.; GANSLER, T.S.; HOLLAND, J.F.; FREI (EDS.) HOLLANDFREI, E. *Cancer Medicine*, sixth ed., BC Decker Inc., 2003, p. 86–102.
- ¹⁹FOYE, W. O.; SENGUPTA, S. K. Em *Principles of Medicinal Chemistry*; FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, 1996, p. 822-845.
- ²⁰ SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em *Oncology*; JONHSTON, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132.
- ²¹MURAD, A.M.; KATZ, A. *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, 1996, p. 41.
- ²² MACHADO, A. E. D.; *Quim. Nova*, v. 23,p. 237, 2000.
- ²³ MACHADO JUNIOR, J. C. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. Supl., p. 645-55, Dez. 2006.
- ²⁴SALMONM, S.E. Em: *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.
- ²⁵ CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.
- ²⁶ GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. *Clinic Pharmacokinetic. Vol. 42*, p. 419, 2003.
- ²⁷ ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, JE.; MANSOUR, VH. Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature. Vol. 222*, p. 385–386, 1969.
- ²⁸ BRABEC V.; KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat.*, vol. 8, p. 131–146, 2005.
- ²⁹ KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer. Vol. 7*, p. 573– 584, 2007.

- ³⁰ LOVEJOY, K.S.; LIPPARD, S.J. Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Trans.* P. 10651–10659. 2009.
- ³¹ PARK, G.Y.; WILSON, J.J.; SONG, Y.; LIPPARD, S.J. Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 109, p. 11987–11992. 2012.
- ³² PEYRONE, M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Liebigs Ann.*, vol. 51, p.1–29, 1844.
- ³³ SMITH, G.H. New drugs released in 1978. *Nurse Pract.* Vol. 4, p. 35–41, 1979.
- ³⁴ HOESCHELE, J.D. In remembrance of Barnett Rosenberg. *Dalton Trans.*, p. 10648–10650, 2009.
- ³⁵ JAMIESON, E.R.; JACOBSON, M.P.; BARNES, C.M.; CHOW, C.S.; LIPPARD, S.J. Heparin regulates vascular endothelial growth factor 165 dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, p. 12346–12354, 1999.
- ³⁶ JAMIESON E.R; LIPPARD, S.J. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *Chem. Rev.*, vol. 99, p. 2467–2498, 1999.
- ³⁷ HICKMAN, J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 11, p. 121–139, 1992.
- ³⁸ LIPPERT, B. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. *Wiley-VCH*, New York, NY, 1999.
- ³⁹ BRABEC, V. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. *Academic Press*, Brno, Czech Republic, 2002.
- ⁴⁰ COMESS, K.M.; LIPPARD, S.J. Molecular Aspects of Platinum–DNA Interactions, *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, Macmillan, London, 1993.
- ⁴¹ APPLETON, T.G. Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules. *Coord. Chem. Rev.*, vol. 166, p. 313–359, 1997.
- ⁴² KNIPP, M. A.; KAROTKI, V.; CHESNOV, S.; NATILE, G.; SADLER, P.J.; BRABEC, V.; VASAK, M. Mass spectrometry evidence for cisplatin as a protein cross-linking agent. *J. Med. Chem.* Vol. 50, p. 4075–4086, 2007.

- ⁴³ CASINI, A.; REEDIJK, J. Interactions of anticancer Pt compounds with proteins: an overlooked topic in medicinal inorganic chemistry?. *Chem. Sci.* vol. 3, p. 3135–3144, 2012.
- ⁴⁴ MESSORI, L.; MERLINO, A. Cisplatin binding to proteins: A structural perspective. *Coordination Chemistry Reviews.* v. 315, p. 67–89, 2016.
- ⁴⁵ WHEATE, N.J.; WALKER, S.; CRAIG, G.E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* Vol. 39, p. 8113–8127, 2010.
- ⁴⁶ STARHA, P.; TRAVNICEK, Z.; PAZDEROVA, L.; DVORAK, Z. Platinum(II) carboxylato complexes containing 7-azaindoles as *N*-donor carrier ligands showed cytotoxicity against cancer cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry.* v. 161, p. 3, 2016.
- ⁴⁷ SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human healthcare, *Nanomedicine* 3 (2007) 20–31.
- ⁴⁸ ALAM, N.; AREMQAYUM, KUMAR, A., KHARE, V.; SHARMA,P.R.; ANDOTRA, S.S.; SINGH, S.K.; KOUL, S; GUPTA, P.N. Improved efficacy of cisplatin in combination with a nano-formulation of pentacyclic triterpenediol. *Materials Science and Engineering C*, vol. 68 p. 109–116, 2016.
- ⁴⁹ PARHI, P. C.; MOHANTY,A.; SAHOO, S.K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug Discov. Today*, vol. 17, p. 1044–1052, 2012.
- ⁵⁰ PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1535–1542.
- ⁵¹ PELEG-SHULMAN, T.; GIBSON, D.; Cisplatin-protein adducts are efficiently removed by glutathione but not by 5'-guanosine monophosphate, *J. Am. Chem. Soc.* v. 123, p.3171–3172, 2001.
- ⁵² MADURO, J.H., PRAS, E.; WILLEMSE, P.H.; DEVRIES, E.G. Acute and long-term toxicity following radiotherapy alone or in combination with chemotherapy for locally advanced cervical cancer, *Cancer Treat. Rev.* v. 29, p. 471–488, 2003.
- ⁵³ SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, v. 22, p. 7265–7279, 2003.
- ⁵⁴ YAO, X.; PANICHPIAL, K.;KURTZMAN, N.; NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review, *Am. J. Med. Sci.* v. 334 p. 115–124, 2007.
- ⁵⁵ WANG,D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev.* v. 4, p. 307–320, 2005.

- ⁵⁶ BUNN, P.A. Chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: who, what, when, why? *J. Clin. Oncol.* v. 20, p. 23S–33S, 2002.
- ⁵⁷ MARTIN, M. Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer, *Clin. Breast Cancer* v. 2, p. 190–208, 2001.
- ⁵⁸ COSAERT, J.; QUOIX, E. Platinum drugs in the treatment of non-small-cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, v. 87, p. 825–833, 2002.
- ⁵⁹ YUNOS, N.M.; BEAL, P.; YU, J.Q.; HUQ, F. Synergism from sequenced combinations of curcumin and epigallocatechin-3-gallate with cisplatin in the killing of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* v.31, p. 1131–1140, 2011.
- ⁶⁰ SILVA, WAGNER E. Nova Geração de Agentes Antineoplásicos Conjugados. *Tese de doutorado*. 2010. Pág 92-93.
- ⁶¹ KIM, J.-H.; KIM, Y.-S.; PARK, K.; LEE, S.; NAM, H.Y.; MIN, K.H.; JO, H.G. ; PARK, J.H. ; CHOI, K.; JEONG, S.Y.. PARK, R.-W; KIM, I.-S.; KIM, K.; KWON, I.C. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J. Control. Release*, v. 127, p. 41–49, 2008.
- ⁶² ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research, *Carbohydr. Polym.* V. 90, p.1395–1410[2], 2012.
- ⁶³ ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P.C.K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends Food Sci. Technol.* v. 18, p. 4–19, 2007.
- ⁶⁴ LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem. Toxicol.* v.50, p. 767–772, 2012.
- ⁶⁵ SARILMISER, H. K.; ONER, E.T. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*, v. 92, p. 28–34, 2014.
- ⁶⁶ KANG, S. A.; JANG, K. H.; SEO, J. W.; KIM, K. H.; KIM, Y. H., RAIRAKHWADA, D. Levan: applications and perspectives. Em: B. H. A. Rehm (Ed.), *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Norfolk: Caister Academic Pres., 2009, p. 145–162.
- ⁶⁷ ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H.. Semina, *Ciências Agrárias*, v. 26, n.1, p. 71-82, 2005.
- ⁶⁸ ÖNER, E.T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances* xxx (2016).

- ⁶⁹ XU, Q.; YAJIMA, T.; LI, W.; SAITO, K.; OHSHIMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Levan (β -2,6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin. Exp. Allergy*, v. 36, p. 94-101, 2006.
- ⁷⁰ BELGHITH, K.S.; DAHECH, I.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; MEJDOUB, H.; BELGHITH, H. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 50, p. 1070–1074, 2012.
- ⁷¹ YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats, *J. Nutr. Biochem.* V. 10, p. 13–18. 1999.
- ⁷² DAHECH, I.; BELGHITH, K.S.; HAMDEN, K.; FEKI, A.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 49, p. 942–947, 2011.
- ⁷³ KIM, K.H.; CHUNG, C.B.; KIM, Y.H.; KIM, K.S.; HAN, C.S.; KIM, C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *J. Cosmet. Sci.* v. 56, p. 395–406, 2005.
- ⁷⁴ BAYOUMI, F.S.; EL AMIR, A.M.; EL DEEB, S.O.; EL ZAHER, H.A.; HAIAM, S.A. In vitro study of a bacterial polysaccharide as anti cancer. *J. Appl. Sci. Res.* v. 9 (3), p. 2007–2018, 2013.
- ⁷⁵ ESAWY, M. A.; AMER, H.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; EL ENSHASY, H. A.; HELMY, W. A.; ABO-ZEID, M. A. Scaling up, characterization of Levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydrate Polymers*, v. 95 (1), p. 578–587. 2013.
- ⁷⁶ ABDEL-FATTAH, A.M.; GAMAL-ELDEEN, A.M.; HELMY, W.A.; ESAWY, M.A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza, *Carbohydr. Polym.* v. 89, p. 314–322. 2012.
- ⁷⁷ DAHECH, I.; BELGHITH, K.S.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 51. P. 329–335. 2012.
- ⁷⁸ YOO, S.H.; YOON, E.J.; CHA, J.; LEE, H.G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 34, p. 37–41, 2004.
- ⁷⁹ YOO, S.H.; YOON, E.J.; CHA, J.; LEE, H.G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* v.34, p.191–194, 2004.
- ⁸⁰ CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; DE FRANCA, F.P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Lett.* V. 19, p. 19–21. 1997.

- ⁸¹ CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; DE FRANCA, F.P. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans, *Int. J. Biol. Macromol.* v. 27, p.245–247, 2000.
- ⁸² CROOKS, R.; GABBIANELLI, A.; GUNN, E.; SHANMUGANANDAMURTHY, K. Derivatized polysaccharide polymer. *Google Patents*. 2009.
- ⁸³ KÜCÜKAİK, F., KAZAK, H., GÜNEY, D., FINORE, I., POLI, A., YENIGÜN, O. Molasses as fermentation substrate for Levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89(6), p; 1729–1740. 2011.
- ⁸⁴ KAUFFMAN, G. B.; TETER, L. A. *Inorg. Syn.*, v. 7, p. 232-6. 1963.
- ⁸⁵ PEYRONE, M. *Ann.chim. et phys.*, v. 12, p. 193. 1844.
- ⁸⁶ RAMBERG, L. *Z. anorg. Chem.*, v.88, p.33. 1913.
- ⁸⁷ CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O. F. D.; SOUZA, M. D. F. V. Q.; MARCAL, M. D. C. R.; LEIX, S.; LOPES, C. E. The levan and ethanol production by *Zymomonas mobilis* strain ZAP in sucrose media. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v. 32, p. 631, 1989.
- ⁸⁸ ALLEY M.C.; SCUDIÈRE D.A.; MONKS A.; HURSEY, M.L; CZERWINSKI, M.J.; FINE D.; ABBOTT B.J.; MAYO J.G., SHOEMAKER, R.H.; BOYD, MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* v. 48: p. 589-601. 1988.
- ⁸⁹ MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* v. 65: p. 55-63. 1983.
- ⁹⁰ http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class/method_9789264071001-en;jsessionid=17tfibpfp1wlz.x-oecd-live-02 Acesso em julho, 2016.
- ⁹¹ MALONE, M.H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, v.25, p.23-53, 1962.
- ⁹² MENENDEZ RC, Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomedicas, *La Habana: CienciasMedicas*, p. 205, 1985.
- ⁹³ CHORILLI M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de Laboratório: o camundongo, *Rev. Ciênc. Farm. BásicaApl.*, v. 28 (1), p. 11-23, 2007.
- ⁹⁴ LIMA, R. M. O. C., S. C. NASCIMENTO, L. W. BIEBER, I. V. SOUZA, *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. 16 (3) p. 23-25. 1992.

⁹⁵WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and clinical trials, *Dalton Trans.*, v. 39, p. 8113-8127, 2010.

⁹⁶Lim, Guh-Hwan; Yu, Taekyung; Koh, Taeyoung; Lee, Jung Heon; Jeong, Unyong; Lim, Byungkwon. **Reduction by water for eco-friendly, capping agent-free synthesis of ultrasmall platinum nanocrystals.** *Chemical Physics Letters*, Volumes 595–596, 18 March 2014, Pages 77–82.

⁹⁷ Livro: **Introdução a Espectroscopia** - Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz.

⁹⁸Rapala Srikanth, Chinta H S S Sundhar Reddy, Gudimalla Siddartha, M. Janaki Ramaiah, Kiran Babu Uppuluri. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers* 120 (2015) 102–114

APÊNDICE 1

RESULTADOS BIOQUÍMICOS PARA TESTE ANTITUMORAL

Controle tumor	TGO	TGP	Creatinina	ureia	gama GT
	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	U/L
C	330	94	0,1	94	0
L	377	83	0,2	69	7
R	288	89	0,2	56	7
CR	607	68	0,2	78	0
SM	277	83	0,1	67	0
CRL	539	68	0,2	91	7
Média	403	80,83333	0,16666667	75,8333	3,5
Desvio	137,9986	10,75949	0,05163978	14,7162	3,834058
Cisplatina	TGO	TGP	Creatinina	ureia	gama GT
	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	U/L
C	460	68	0,2	71	7
L	471	68	0,2	79	7
R	330	62	0,2	116	7
CR	534	57	0,2	72	7
SM	371	68	0,2	79	7
CRL	340	57	0,2	111	0
Média	417,6667	63,33333	0,2	88	5,833333
Desvio	82,5413	5,428321	3,0405E-17	20,09975	2,857738
LSGLL01	TGO	TGP	Creatinina	ureia	gama GT
	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	U/L
C	513	83	0,1	65	7
L	513	120	0,1	73	0
R	309	68	0,2	83	7
CR	424	62	0,1	62	0
SM	356	52	0,1	68	0
TM	539	83	0,2	69	7
CLR	309	73	0,2	69	7
Média	423,2857	73,8	0,1571429	70,125	3,5
Desvio	124,5431	30,70342	0,0534522	6,289163	3,834058
LSGLL02	TGO	TGP	Creatinina	ureia	gama GT
	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	U/L
C	445	57	0,1	93	7

L	324	52	0,1	60	7
R	350	57	0,2	71	7
CR	460	99	0,2	72	0
SM	350	41	0,2	71	7
CRL	560	57	0,2	60	7
RPATAS	361	68	0,2	50	7
PATAS	366	62	0,3	72	0
Média	402	61,625	0,1875	68,625	5,25
Desvio	79,86238	16,98686	0,064087	12,67097	3,24037

APÊNDICE 2

COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL



23/05/2016 870160021942

13:49



00.000.2.2.18.0387633.7

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 011642 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 08104

Fax: (81) 332 08001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL

Resumo: "COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL". A presente invenção trata-se de um composto de coordenação de platina (II), contendo em sua estrutura um centro platinico e dois ligantes, sendo um desses bidentado, apresentando este composto atividade antitumoral, consistindo assim, em um promissor composto a ser utilizado no tratamento do câncer, atuando como fármaco antineoplásico. O referido complexo apresentou ação antineoplásica, mediante ensaios pré-clínicos, não apresentando óbitos nos grupos tratados. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica, (a) do ponto de vista estrutural (novidade); e (b) quanto ao seu potencial antitumoral. O referido composto apresentou-se como uma alternativa satisfatória ao tratamento antitumoral quando comparada a análogo similar que contém apenas um núcleo de platina (II), denominado comercialmente de cisplatina. O percentual de inibição tumoral obtido para a presente invenção, após realização de ensaios in vivo, frente às linhagens de células de sarcoma 180 foi de 48%, comprovando assim, sua ação como quimioterápico antineoplásico.

Figura a publicar: 2

APÊNDICE 3

CONJUGADO ANTINEOPLÁSICO À BASE DE PLATINA E EXOPOLISSACARÍDEO, COM EFEITOS COLATERAIS ATENUADOS



30/05/2016 870160024170

20:35



00.000.2.2.16.0414679.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 012331 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): CONJUGADO ANTINEOPLÁSICO À BASE DE PLATINA E EXOPOLISSACARÍDEO, COM EFEITOS COLATERAIS ATENUADOS

Resumo: "CONJUGADO ANTINEOPLÁSICO À BASE DE PLATINA E EXOPOLISSACARÍDEO, COM EFEITOS COLATERAIS ATENUADOS". A presente invenção consiste em novo conjugado, codificado como Pt-EPS, contendo complexo de platina (Pt) e uma matriz de exopolissacarídeo (EPS). O percentual de inibição tumoral, da presente invenção, apresentou-se satisfatório, mediante experimentação animal, em modelo animal portador de sarcoma 180, camundongos suíços – albinos machos (Mus musculus), bem como em algumas linhagens de células tumorais humanas. Observou-se uma diminuição dos efeitos colaterais, apresentados comumente por esta classe de compostos antineoplásicos à base de platina, o que se expressou pela ausência de óbitos, não comprometimento de fígado, baço e rins, avaliados macroscopicamente; e ganho de massa corpórea, nos grupos submetidos ao tratamento com o conjugado (Pt-EPS) e diminuição dos efeitos hepatotóxicos, seguido de estabilização dos efeitos nefrotóxicos. Os ensaios de inibição tumoral (in vivo) mostraram que uma dosagem utilizada em mg Kg⁻¹ do conjugado, apresentou percentual de inibição tumoral em torno de 41,0%. Os ensaios in vitro mostraram percentuais de inibição que variaram de 82,3% para câncer de próstata (PC3); 99,7% para cólon - humano (HCT-116); 99,6% para Leucemia promielocítica (HL-60) e 58,0% para Hepatocarcinoma (HEPG2), utilizando-se uma dosagem entre 1,0 e 100,0 µg/mL do conjugado.

Figura a publicar: 2