

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**TRIAZENOS: CLIVAGEM DO DNA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE FRENTE À
Artemia Salina LEACH.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Luiz Paraginski

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**TRIAZENOS: CLIVAGEM DO DNA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE FRENTE À
Artemia Salina LEACH.**

por

Gustavo Luiz Paraginski

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TRIAZENOS: CLIVAGEM DO DNA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
TOXICIDADE FRENTE À *Artemia Salina* LEACH.**

elaborada por
Gustavo Luiz Paraginski

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosmari Hörner, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)

Manfredo Hörner, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 de dezembro de 2007.

*À minha família:
Especialmente a minha mãe, meu pai, minha irmã e minha avó Irene.
Aos meus outros avós, e tios pelas horas de convivência
que tive de abdicar pelo trabalho.*

*À minha namorada:
Vanessa Teixeira Kunz
por ter estado sempre a meu lado com
apoio e como conselheira necessária
para que chegasse até aqui.*

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e por fornecer os subsídios necessários para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela estrutura física oferecida.

À Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner pela orientação, dedicação, incentivo, amizade e exemplo profissional, além dos conselhos que certamente contribuíram e permanecerão para a minha formação pessoal...

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Manfredo Hörner do Departamento de Química Inorgânica pela colaboração, ajuda com o mecanismo de clivagem e conselhos.

Aos mestrandos, bolsistas de iniciação científica, funcionários e aos colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica, em especial: Luiz Gustavo Brenner Reetz, Vanessa Oliveira Domingues, Tiago M. Michelot, Fabiane Rigatti, Cláudia Bertoncheli, Fernanda Stücker, Diego Souza, Mariane Maraschin, Lídia Einsfeld.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa NÍTriCo (Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos) do laboratório de química inorgânica pela síntese dos compostos.

À minha namorada Vanessa Teixeira Kunz pelos conselhos, pela colaboração, compreensão, apoio e pelo amor.

À minha mãe, meu pai, minha irmã, meus avós e tios por tudo.

À família da minha namorada pelo incentivo e apoio.

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

TRIAZENOS: CLIVAGEM DO DNA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E TOXICIDADE FRENTE À *Artemia Salina* LEACH.

AUTOR: GUSTAVO LUIZ PARAGINSKI

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de Dezembro de 2007.

Neste estudo, seis compostos triazenos são avaliados quanto à atividade de clivagem do DNA. Os mesmos seis triazenos e o medicamento Asercit[®] (dacarbazina) são avaliados quanto à atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach.: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**), 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**T2**), 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**T3**), 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno (**T4**), 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno (**T5**), 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-azofenil)triazeno (**T6**) e 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (dacarbazina, Asercit[®]). O triazeno **T1** cliva aproximadamente 50 % do DNA plasmidial (pBSKII e pUC18, a 3,75 mM, 50 °C/24 horas, tampão Tris.HCl 200 mM pH 8,0). Seqüestradores de radicais hidroxil (glicerol 0,1 e 1 %, DMSO 0,04 M e tiouréia 0,04 M) e atmosfera de argônio não interferem na clivagem do DNA por **T1**. Os K_b de **T1** determinados por titulação espectrofotométrica com DNA são $4,50 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ (pH 6,5), $1,00 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (pH 7,0) e $2,33 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (pH 8,0). **T1**, **T6** e o Asercit[®] são os mais ativos na atividade antibacteriana com CIM/CBM de até 16/64 µg/ml. As LC_{50} mais baixas determinadas pela toxicidade para *A. salina* são para **T1** ($0,081 \pm 0,008 \text{ µg/ml}$), **T5** ($0,076 \pm 0,011 \text{ µg/ml}$) e **T6** ($0,077 \pm 0,007 \text{ µg/ml}$). Esses estudos mostram a ampla atividade biológica conferida pelos compostos triazenos.

Palavras-chave: triazenos; clivagem do DNA; atividade antibacteriana; *Artemia salina*.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Course of Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

TRIAZENES: DNA CLEAVAGE, ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND TOXICITY FRONT TO *Artemia Salina*

AUTHOR: GUSTAVO LUIZ PARAGINSKI

ADVISER: PROF^a DR^a ROSMARI HÖRNER

Place and date of Defense: Santa Maria, December 13th, 2007.

In this work, six triazene compounds are assayed to DNA cleavage activity. The same six triazenes and the drug Asercit[®] (dacarbazine) are assayed to antibacterial activity and toxicity to *Artemia salina* Leach.: 1,3-bis-(phenyl)triazene-1-*N*-hidroxide (**T1**), 1-(4-bromophenyl)-3-(4-nitrophenyl)triazene, (**T2**), 1-(4-azophenyl)-3-(4-nitrophenyl)triazene (**T3**), 1,3-bis-(4-azophenyl-triazene) (**T4**), 1,3-bis-(2-bromophenyl)triazene (**T5**), 1-(4-carboxyphenyl)-3-(4-azophenyl)triazene (**T6**) and 5-(3,3-dimethyl-1-triazenyl)imidazol-4-carboxamide (dacarbazine, Asercit[®]). Triazene **T1** cleaves approximately 50 % of plasmid DNA (pBSKII and pUC18, 3.75 mM, 50 °C/24 hours, Tris.HCl buffer 200 mM pH 8.0). Hydroxyl radical scavengers (glycerol 0.1 and 1.0 %, DMSO 0.04 M and tiourea 0.04 M) and argon atmosphere not interfere in DNA cleavage by **T1**. The K_b of **T1** determined by spectrofotometric titrations with DNA are $4.50 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ (pH 6,5), $1.00 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (pH 7,0) e $2.33 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (pH 8,0). **T1**, **T6** and Asercit[®] are the more actives in antibacterial activity with CIM/CBM of even 16/64 µg/ml. LC_{50} more lower determined by toxicity to *A. salina* are to **T1** ($0.081 \pm 0.008 \text{ µg/ml}$), **T5** ($0.076 \pm 0.011 \text{ µg/ml}$) and **T6** ($0.077 \pm 0.007 \text{ µg/ml}$). Theses studies show the wide biological activity conferred by triazene compounds.

Keywords: triazenes; DNA cleavage; antibacterial activity; *Artemia salina*.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Estruturas químicas dos compostos triazenos testados quanto à clivagem do DNA. | 45 |
| TABELA 2 – Porcentagem de clivagem do DNA apresentada pelos compostos 1 , 2 e 3 nas condições citadas, em pH 8,0. | 46 |
| TABELA 3 – Estruturas químicas dos compostos triazenos utilizados neste estudo de clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente <i>Artemia salina</i> e seus respectivos nomes químicos. | 51 |
| TABELA 4 – Bactérias utilizadas na análise antibacteriana dos compostos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina e seus perfis de resistência. | 55 |
| Tabela 5 – Bactérias gram-negativas utilizadas na análise antibacteriana dos compostos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®) e suas características. .. | 56 |
| TABELA 6 – Porcentagem de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno T1 a 3,75 mM, nos diferentes pHs testados a 50 °C/24 h. | 60 |
| TABELA 7 – Comparação da atividade dos triazenos que clivam o DNA. | 62 |
| TABELA 8 – Estruturas químicas dos compostos triazenos aptos a clivar o DNA. .. | 65 |
| TABELA 9 – Estruturas químicas dos triazenos que não são aptos de clivar o DNA. | 66 |
| TABELA 10 – Constantes de ligação intrínsecas (K_b) compostos-DNA à 25 °C. | 72 |
| TABELA 11 – Resultados da atividade antibacteriana para os triazenos avaliados frente à bactérias gram-positivas. | 76 |
| TABELA 12 – Resultados da atividade antibacteriana para os triazenos avaliados frente à bactérias gram-negativas. | 77 |
| TABELA 13 – Valores de CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para os triazenos T1 a T6 e para a dacarbazina frente <i>Artemia salina</i> | 80 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Estruturas químicas dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) mostrando as ligações fosfodiéster entre os açúcares, as ligações de hidrogênio (---) entre as bases nitrogenadas e as extremidades 5'-Fosfato (5'-OPO ₃) e 3'-Hidroxila (3'-OH). Entre Adenina (A) e Timina (T) ou Uracila (U), há duas ligações de hidrogênio, e entre Guanina (G) e Citosina (C) há três. | 21 |
| FIGURA 2 – Estrutura química da bleomicina, indicando as diferentes unidades estruturais. Os nitrogênios destacados podem se ligar a metais formando complexos. O domínio de ligação ao DNA foi constantemente modificado em busca de atividade mais eficiente. (STUBBE et al., 1996). | 22 |
| FIGURA 3 – a) Eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (forma I) nas formas circular aberta (forma II) e linear (forma III); b) e c) eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando em clivagem não seletiva e seletiva, respectivamente. * indica o terminal do polinucleotídeo que possui o marcador que serve para revelação, assim como um filme. | 24 |
| FIGURA 4 – Estruturas químicas de alguns compostos capazes de clivar o DNA por mecanismos oxidativo e hidrolítico. | 28 |
| FIGURA 5 – Representação da intercalação do brometo de etídio entre as bases do DNA fita dupla. A intercalação aumenta o espaçamento dos pares de bases sucessivos, distorcendo o esqueleto fosfato e reduzindo a densidade do DNA. Modificada de CREIGHTON, T. E. Encyclopedia of Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, Inc., v. 1-4, p. 1517, 1999). | 30 |
| FIGURA 6 – Estruturas químicas de alguns compostos clássicos que interagem com o DNA por diferentes mecanismos. a) moléculas que se intercalam no DNA; b) moléculas que se ligam aos sulcos do DNA. | 31 |
| FIGURA 7 – Representações estruturais de uma seção do DNA em 3 dimensões mostrando os sulcos menor e maior do DNA. Modificadas de http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry) e http://www.sciencephoto.com | 32 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 8 – Representação das etapas de reação de uma molécula no sulco do DNA. (a) Primeiramente, a molécula ligante na fenda é transferida do meio para o sulco menor do DNA. (b) Uma vez no sulco do DNA, o ligante pode formar uma ampla variedade de interações moleculares, como as ligações de van der Waals e de hidrogênio (BAILLY, CHAIRES, 1998). | 33 |
| FIGURA 9 – Estrutura química de algumas mostardas nitrogenadas. | 35 |
| FIGURA 10 – Efeitos citotóxicos da mostardas nitrogenadas: representação das ligações cruzadas (<i>crosslinking</i>) que podem ocorrer com o DNA; ligação intrafita, interfita e inter-hélices. A e B representam domínios eletrofílicos de um agente alquilante de interesse. Inicialmente, um agente alquilante bifuncional forma uma ligação com DNA (monoaduto), para posteriormente formar a segunda ligação, a qual pode ser com o mesmo DNA (bisalquilação), uma proteína ou sofrer hidrólise. | 36 |
| FIGURA 11 – Estruturas químicas dos compostos a) 3,3-dimetil-1-feniltriazeno; b) 3,3-dimetil-1- <i>p</i> -nitrofeniltriazeno; c) 3,3-dimetil-1- <i>p</i> -toluiltriazeno. | 37 |
| FIGURA 12 – a) Ativação da dacarbazina pelo citocromo P450 e metilação do DNA: a hidroxilação da dacarbazina pelo citocromo P450 resulta na formação de 5-(3-hidroximetil-3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (HMMTIC). 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC) é gerado não-enzimaticamente por perda de formaldeído. MTIC rapidamente se decompõe em 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e $\text{CH}_3\text{-N}^+\equiv\text{N}$, o qual alquila o DNA. b) Fotodecomposição da dacarbazina gerando dimetilamina e 5-diazoimidazol-4-carboxamida (DIAZO-IC) o qual cicliza para 2-azahipoxantina (2-AH). | 40 |
| FIGURA 13 – Estruturas químicas da temozolomida (a) e mitozolomida (b) e suas decomposições químicas em pH fisiológico, com a abertura do anel tetrazinona formando o triazeno aberto 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC) e 5-(3-cloroetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida, respectivamente. | 41 |
| FIGURA 14 – a) Estrutura química da molécula do berenil. b) Estrutura química do análogo do berenil, o 3-hidroxiopropil-1,3-bis-(4-amidinofenil)triazeno ou <i>N</i> -(3-hidroxiopropil)-berenil que através de uma fotodegradação gera o composto 4-amidinobenzenodiazônio, ao qual foi atribuída a atividade de clivagem do DNA pBR322. hv: luz ultravioleta. | 41 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 15 – Estrutura química da combilexina acridina-triazeno. | 43 |
| FIGURA 16 – Porcentagem de clivagem do DNA superenovelado (forma I) para circular aberto (forma II) pelo composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1- <i>N</i> -hidróxido (T1) em diferentes condições: a) Tampão Pipes 200 mM pH 6,5, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; b) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 7,0, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; c) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 7,5, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; d) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 8,0, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII. Em todos: linha 1, somente DNA; linha 2, DNA + 3,75 mM de T1 ; linha 3, DNA + 1,88 mM de T1 ; linha 4, DNA + 1,25 mM de T1 ; linha 5, DNA + 0,75 mM de T1 ; linha 6, DNA + 0,375 mM de T1 ; todas as reações foram realizadas a 50 °C/24 h. | 60 |
| FIGURA 17 – Atividade de clivagem do DNA plasmidial pelo composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1- <i>N</i> -hidróxido (T1) sob diferentes condições para verificar o mecanismo. a) Linha 1, somente plasmídeo pUC 18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 ; linhas 3-4, plasmídeo pUC18 + glicerol 0,1 e 1,0 %, respectivamente; linhas 5-6, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 + glicerol 0,1 e 1,0 %, respectivamente. b) Linha 1, somente plasmídeo pUC18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 ; linha 3, plasmídeo pUC18 + DMSO 40 mM; linha 4, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 + DMSO 40 mM. c) Linha 1, somente plasmídeo pUC18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 ; linha 3, plasmídeo pUC18 + tiouréia 40 mM; linha 4, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de T1 + tiouréia 40 mM. d) Linha 1, plasmídeo pUC18 + argônio; linha 2, plasmídeo pUC 18 + argônio + 3,75 mM de T1 . Todas as reações foram incubadas a pH 8,0 (Tris.HCl 200 mM) a 50 °C/24 h. | 61 |
| FIGURA 18 – Hiper Cromismo do composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1- <i>N</i> -hidróxido (T1) sob adições de DNA plasmidial fita dupla (pUC18) em pH 6,5 (tampão Pipes 35 mM). A absorbância foi monitorada como uma função do aumento da concentração do DNA. 9,38 µM de T1 na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 240, 336, 480, 720, 960 e 1200 µM de nucleotídeos (linhas 2-11) resultou em um aumento da absorbância (hipercromismo): λ_{\max} de T1 sozinho, 344,9 nm; λ_{\max} de T1 -ligado ao DNA, 342,4 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\max} = 2,5$ nm (linha 0-5). | 68 |

- FIGURA 19 – Hiper Cromismo do composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) com a adição de Dna plasmidial fita dupla em pH 7,0 (tampão Tris.HCl 35 mM). A absorvância foi monitorada como uma função do aumento da concentração do DNA. 9,38 μ M de **T1** na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 240, 336, 480, 720, 960 e 1200 μ M de nucleotídeos (linhas 2-11) resultou em um aumento da absorvância (hipercromismo): λ_{\max} de **T1** sozinho, 345,2 nm; λ_{\max} de **T1**-ligado ao DNA, 343,0 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\max} = 2,2$ nm (linha 0-5). 69
- FIGURA 20 – Hiper Cromismo de 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) com a adição de DNA plasmidial fita dupla (pUC18) em pH 8,0 (tampão Tris.HCl 35 mM). A absorvância foi monitorada como uma função do aumento da quantidade de DNA. 9,38 μ M de **T1** na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 336, 480, 720, 960 e 1200 μ M nucleotídeos (linhas 2-10) resultou em um aumento da absorvância (hipercromismo): λ_{\max} de **T1** sozinho, 343,4 nm; λ_{\max} de **T1**-ligado ao DNA, 341,0 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\max} = 2,4$ nm (linha 0-5). 70
- FIGURA 21 – Estruturas químicas de alguns hidroxitriazenos que apresentam atividade antibacteriana e/ou antifúngica (GOSWAMI, PUROHIT, 2001). 79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------|---|
| 2-AH | 2-azahipoxantina |
| A | adenina |
| Abs | absorbância |
| AIC | 5-aminoimidazol-4-carboxamida |
| AmpC | gene AmpC (o qual medeia a resistência bacteriana pela produção de beta-lactamase) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| bp | pares de bases |
| C | citossina |
| Ca256 | carcinoma 256 |
| Ca755 | adenocarcinoma 755 |
| CBM | concentração bactericida mínima |
| CL ₅₀ | concentração letal média |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CIM | concentração inibitória mínima |
| CT-DNA | DNA de timo de bezerro - "Calf Thymus DNA" |
| DIAZO-IC | 5-diazoimidazol-4-carboxamida |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DTIC | 5-(ou 4)-(dimetiltriazeno)imidazol-4(ou 5)-carboxamida ou dacarbazina |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| ESBL | beta-lactamase de espectro ampliado (do inglês, <i>extended spectrum beta-lactamase</i>) |
| FI | forma superenovelada do DNA plasmidial |
| FII | forma circular aberta do DNA plasmidial |
| FIII | forma linear do DNA plasmidial |
| G | guanina |
| HMMTIC | 5-(3-hidroximetil-3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida |
| HUSM | Hospital Universitário de Santa Maria |
| kDa | quilo Daltons |

| | |
|-----------|---|
| kpb | quilobase - 1 Kpb corresponde a 1000 pares de base |
| MES | ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)-etanosulfônico |
| MβL | metalo-beta-lactamase |
| MDR | multidroga resistência |
| ml | mililitro |
| MTIC | 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida |
| NCCLS | <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> |
| nm | nanômetro |
| pBSKII | plasmídeo Bluescript SK II |
| pb | pares de bases de DNA |
| Pipes | piperazina- <i>N,N</i> -bis(ácido 2-etano sulfônico) |
| S180 | sarcoma 180 |
| T | timina |
| T1 | 1,3-bis-(fenil)triazeno-1- <i>N</i> -hidróxido |
| T2 | 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno |
| T3 | 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno |
| T4 | 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno |
| T5 | 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno |
| T6 | 1-(4-carbóxifenil)-3-(4-azofenil)-triazeno |
| TAS | toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> Leach. |
| TBE | tampão Tris/Borato/EDTA |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometano |
| UFC | unidade formadora de colônia |
| UV | luz ultravioleta |
| UV-Vis | ultravioleta-visível |
| μg | micrograma |
| μl | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Objetivos | 19 |
| 1.1.1 Objetivo geral | 19 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 20 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 2.1 Clivagem do DNA | 21 |
| 2.2 Tipos de interações com o DNA: intercalação, alquilação e ligação nas fendas | 29 |
| 2.2.1 Moléculas intercalantes do DNA | 30 |
| 2.2.2 Moléculas que se ligam aos sulcos do DNA | 32 |
| 2.2.3 Moléculas que alquilam o DNA | 34 |
| 2.3 Triazenos | 37 |
| 2.3.1 Recente atividade de clivagem do DNA por compostos triazenos | 44 |
| 2.4 Atividade antibacteriana | 46 |
| 2.5 Toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach. | 48 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.1 Reagentes, equipamentos e acessórios | 49 |
| 3.1.1 Clivagem do DNA, mecanismo de clivagem e titulação espectrofotométrica UV-Vis | 49 |
| 3.1.2 Atividade antibacteriana | 50 |
| 3.1.3 Toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach. | 50 |
| 3.2 Compostos triazenos utilizados | 50 |
| 3.3 <i>Screening</i> de clivagem do DNA plasmidial pelos triazenos T1 a T6 ... | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 Mecanismo de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno T1 | 53 |
| 3.5 Titulação espectrofotométrica UV/Vis DNA-triazeno T1 | 54 |
| 3.6 Atividade antibacteriana dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®) | 54 |
| 3.6.1 Bactérias utilizadas | 54 |
| 3.6.2 Microdiluição em caldo | 57 |
| 3.7 Toxicidade dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®) frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach. | 58 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 59 |
| 4.1 <i>Screening</i> de clivagem do DNA plasmidial pelos triazenos T1 a T6 ... | 59 |
| 4.2 Mecanismo de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno T1 | 61 |
| 4.2.1 Análise estrutura-atividade para a clivagem do DNA | 64 |
| 4.3 Titulação espectrofotométrica UV/Vis DNA-triazeno T1 | 67 |
| 4.4 Atividade antibacteriana dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®) | 74 |
| 4.4.1 Análise estrutura-atividade antibacteriana | 78 |
| 4.5 Toxicidade dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®) frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach. | 79 |
| | |
| 5 CONCLUSÕES | 81 |
| | |
| 6 REFERÊNCIAS | 82 |

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de novos compostos com atividade antitumoral continua sendo uma das mais importantes metas da química medicinal. Além dos agentes quimioterápicos que atuam por ligação aos sulcos, alquilação ou intercalação no DNA, existem moléculas que possuem atividade antitumoral por clivarem o DNA e levarem as células a apoptose. Por isso, há grande interesse no desenvolvimento de moléculas desse tipo. Além da atividade antitumoral, moléculas que clivam o DNA podem ser úteis em diversas outras aplicações, como na biotecnologia ou na engenharia genética, na biologia molecular, como sondas estruturais quando específicas para certas seqüências de pares de bases do DNA, e serem utilizadas em outras áreas da medicina.

Moléculas sintéticas que clivam o DNA são chamadas de nucleases sintéticas, artificiais, químicas ou quimioenzimas, por imitarem as enzimas naturais (nucleases naturais). A busca por nucleases químicas menores também ocorre devido às nucleases naturais serem moléculas grandes e de alto custo para obtenção. Nucleases sintéticas que, igualmente as nucleases naturais possuem mecanismo hidrolítico são altamente desejáveis, uma vez que permitem, posterior ao seu corte (ou sua atuação), a religação do DNA. As primeiras nucleases químicas obtidas foram agentes com mecanismo oxidativo, sendo que o complexo 1,10-fenantrolina-cobre ($(OP)_2Cu^+$) foi o primeiro complexo e coordenação sintético com atividade de nuclease reportado. Os fragmentos produzidos através da clivagem oxidativa produzem fragmentos que não podem ser enzimaticamente religados e esta é a razão pela qual o mecanismo hidrolítico é preferido. Na busca de moléculas mais eficientes na clivagem do DNA, tem-se utilizado metais ligados a estas, pois eles neutralizariam a carga negativa do esqueleto polianiónico do DNA (grupos fosfato; 5-OPO₃). Dessa forma fica mais fácil a aproximação de qualquer nucleófilo (molécula carregada negativamente) ao DNA. Além do mais, a maioria das moléculas já estudadas possuem um tamanho relativamente grande, justificando com isso, a busca de moléculas de tamanho pequeno.

Os triazenos ou diazoaminas ($-N=N-N(H)-$) são compostos que têm sido alvo de constante pesquisa na busca de novos compostos biologicamente ativos. A

dacarbazina e o berenil são compostos triazenos clássicos: o primeiro é um fármaco antitumoral adotado como droga de referência no tratamento do melanoma maligno metastático e o segundo é um antiprotozoário utilizado no tratamento infeccioso por *Trypanosoma rhodesiense*. Moléculas que possuem o grupo fundamental diazoamina conferem diversas atividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antitumoral, repelente, herbicida, tricomonocida, inseticida, mutagênica, carcinogênica e teratogênica, e mais recentemente, atividade de clivagem do DNA plasmidial *in vitro*.

Em vista da diversificada atividade biológica desses compostos, aliado ao rápido aumento da resistência bacteriana, tanto de cepas hospitalares e comunitárias, a pesquisa desta classe de compostos com atividade bacteriostática e/ou bactericida representa pesquisa importante na atualidade. Em paralelo a essa busca da atividade antibacteriana, ocorre a busca pela atividade de clivagem do DNA por esses compostos, com potencial aplicação nas diversas áreas já citadas.

Ainda, é desejável que compostos antineoplásicos ou antibacterianos efetuem sua atividade especificamente nas células cancerígenas ou microrganismos, não apresentando toxicidade para outras células do organismo humano. Por isso, efeitos teratogênicos ou carcinogênicos, apresentados por grande parte dos compostos que apresentam estes tipos de ações, são indesejáveis. Assim, para verificar a toxicidade dos compostos envolvidos neste estudo utilizou-se o teste de toxicidade frente ao microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* Leach. Os resultados com este teste podem, inclusive serem correlacionados com a atividade citotóxica frente a células tumorais.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Estudar, *in vitro*, as atividades de clivagem do DNA plasmidial, antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. de 6 compostos triazenos inéditos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade de clivagem dos DNAs plasmidiais pUC18 e pBSKII por 6 compostos triazenos inéditos em diferentes concentrações, a diferentes pHs (6,5; 7,0; 7,5; 8,0) e temperaturas (37 e 50 °C).
- Procurar indícios sobre os possíveis mecanismos envolvidos nas reações de clivagem do DNA efetuada pelos compostos identificados como ativos.
- Verificar a capacidade de intercalação com o DNA plasmidial dos compostos identificados, utilizando a técnica de titulação espectrofotométrica ultravioleta-visível com adições de quantidades de DNA plasmidial a uma solução contendo o composto triazeno em estudo sob diferentes pHs (6,5; 7,0 e 8,0). Através disto, calcular as constantes de ligação (K_b) do(s) composto(s) triazeno(s) em estudo e comparar com a de intercalantes clássicos do DNA como o brometo de etídio.
- Determinar a atividade antibacteriana dos 6 compostos triazenos e da dacarbazina (Asercit[®]) frente a bactérias padrões American Type Culture Collection (ATCC) e bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) incluindo as multirresistentes.
- Determinar a toxicidade dos 6 compostos triazenos e do fármaco dacarbazina (Asercit[®]) frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Clivagem do DNA

A descoberta de novos compostos com atividade antitumoral continua sendo uma das mais importantes metas da química medicinal (STARCEVIC et al., 2006). Uma classe de agentes quimioterápicos freqüentemente empregada na terapia anticâncer inclui moléculas que interagem com o DNA (Figura 1), como os ligantes dos sulcos, os agentes alquilantes e os intercalantes do DNA (STARCEVIC et al., 2006). Além disso, moléculas aptas a clivar o DNA podem exibir efeitos antitumorais

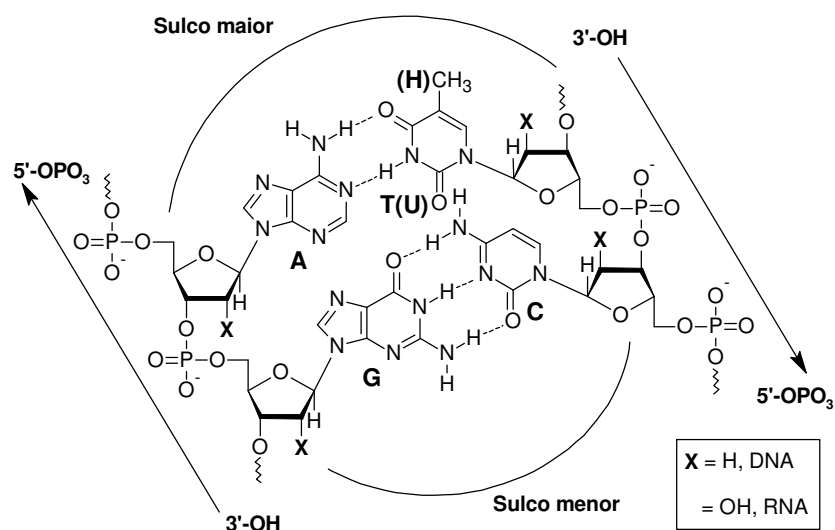


Figura 1 – Estruturas químicas dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) mostrando as ligações fosfodiéster entre os açúcares, as ligações de hidrogênio (---) entre as bases nitrogenadas e as extremidades 5'-Fosfato (5'-OPO₃) e 3'-Hidroxila (3'-OH). Entre Adenina (A) e Timina (T) ou Uracila (U), há duas ligações de hidrogênio, e entre Guanina (G) e Citosina (C) há três.

ao induzirem as células a apoptose (GONZALEZ et al., 2001; MIZUTANI et al., 2002). A habilidade de clivar eficientemente os ácidos nucleicos, de uma maneira não degradativa, e com alta seletividade de sítios ou estruturas oferecem muitas aplicações para a manipulação de genes, o *design* de sondas estruturais e o desenvolvimento de novos fármacos (COWAN, 2001), entre outras. Assim, há um grande interesse no desenvolvimento de moléculas capazes de efetuar a clivagem

do DNA fita dupla, sendo que a maioria das moléculas descobertas até agora utilizam íons metálicos como catalisadores (COWAN, 2001). Moléculas capazes de clivar o DNA, como o antibiótico antitumoral bleomicina (Figura 2) e seus análogos, como a bleomicina A2, a bleomicina A5, bleomicina B2, Fe-bleomicina, constituindo a família das bleomicinas, exibem atividade antitumoral (STUBBE et al., 1996; SUH, POVIRK, 1997; CHARLES, POVIRK, 1998; HASHIMOTO et al., 2001; PEISACH, 2002).

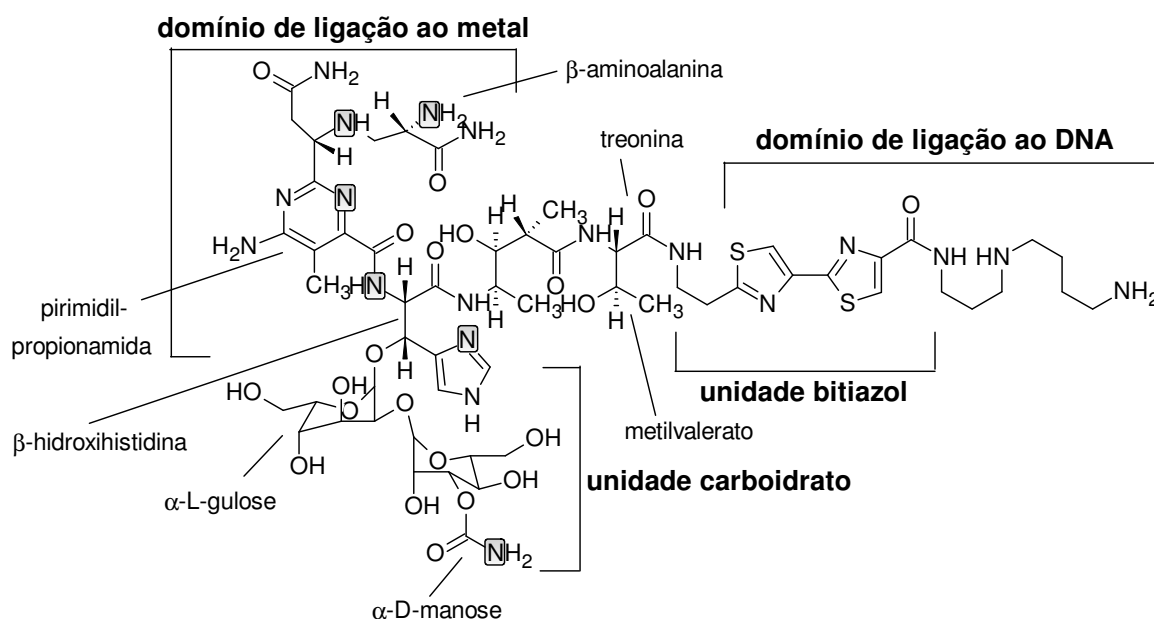


Figura 2 – Estrutura química da bleomicina, indicando as diferentes unidades estruturais. Os nitrogênios destacados podem se ligar a metais formando complexos. O domínio de ligação ao DNA foi constantemente modificado em busca de atividade mais eficiente. (STUBBE et al., 1996)

A clivagem do DNA fita dupla reportada até o ano 2001 por pequenas moléculas acontecia por um mecanismo oxidativo (BRANUM et al., 2001). Em vista disso, considerável esforço tem sido feito no desenvolvimento de pequenas moléculas que utilizam mecanismo hidrolítico para clivagem do DNA (HEGG, BURSTYN, 1998; BRANUM et al., 2001), a fim de desenvolver agentes hidrolíticos, que possuem mais aplicações e vantagens em relação aos oxidativos, com potencial aplicação na biologia molecular e na terapia anticâncer (PAN, LAZARUS, 1997). Porém, a estabilidade hidrolítica do DNA é alta, de modo que muitos reagentes capazes de clivar hidroliticamente o RNA, não apresentam sucesso frente ao DNA (WESTHEIMER, 1987). Esta estabilidade é o resultado da repulsão entre as cargas

negativas do esqueleto fosfodiéster que inibe o ataque dos nucleófilos (cargas negativas) ao DNA (WESTHEIMER, 1987; HEGG, BURSTYN, 1996; REN et al., 2000; SREEDHARA, COWAN, 2001). Segundo Cowan (2001), a meia-vida para a hidrólise das ligações fosfodiéster, quando extrapoladas para as condições fisiológicas, são estimadas serem de 1.000.000 anos para o DNA e 1.000 para o RNA. Esta excepcional estabilidade dos diésteres fosfato é sugerida como um motivo pelo qual os ácidos nucleicos foram escolhidos como material genético (WESTHEIMER, 1987).

A clivagem do DNA pode ser verificada por diferentes técnicas, sendo mais comumente usadas a eletroforese em gel de agarose e a eletroforese em gel de poliácridamida. Na primeira, a clivagem é observada pela migração das diferentes formas do DNA no gel de agarose. Sendo assim, a efetivação da clivagem é visualizada pela diminuição da banda referente a forma I do DNA (superenovelada ou FI) e conseqüente aumento da forma II (circular aberta ou FII) e, às vezes, com formação da forma III (linear ou FIII). Esta segunda clivagem, quando ocorre é mais específica, pois é efetuada cerca de 12 pares de base da primeira (Figura 3a) (NEVES et al., 2001). Para visualizar as diferentes formas do DNA no gel, utiliza-se um corante fluorescente, geralmente brometo de etídio, que se intercala no DNA (AUSUBEL et al., 1995; HEGG, BURSTYN, 1996). Na segunda técnica, utiliza-se um fragmento de DNA, com seqüências de bases nucleotídicas conhecidas ou não, possuindo um marcador radioativo, fluorescente ou quimioluminescente em um dos terminais (ARMITAGE, 1998). A clivagem gera fragmentos menores que migram diferentemente no gel de poliácridamida, separando-se. Esta técnica permite verificar se a clivagem possui seletividade para seqüências de pares de bases ou não (ARMITAGE, 1998). Quando não há seletividade, o DNA é clivado em diversos sítios, gerando muitas bandas separadas após a eletroforese (Figura 3b). Quando há seletividade, o DNA é clivado somente na seqüência de pares de bases de reconhecimento do agente clivador, produzindo somente alguns fragmentos que aparecem como poucas bandas após a revelação do gel (Figura 3c) (ARMITAGE, 1998). Portanto, quando se conhece a seqüência polinucleotídica usada, pode-se saber quais os sítios ou pares de bases preferidos para a clivagem.

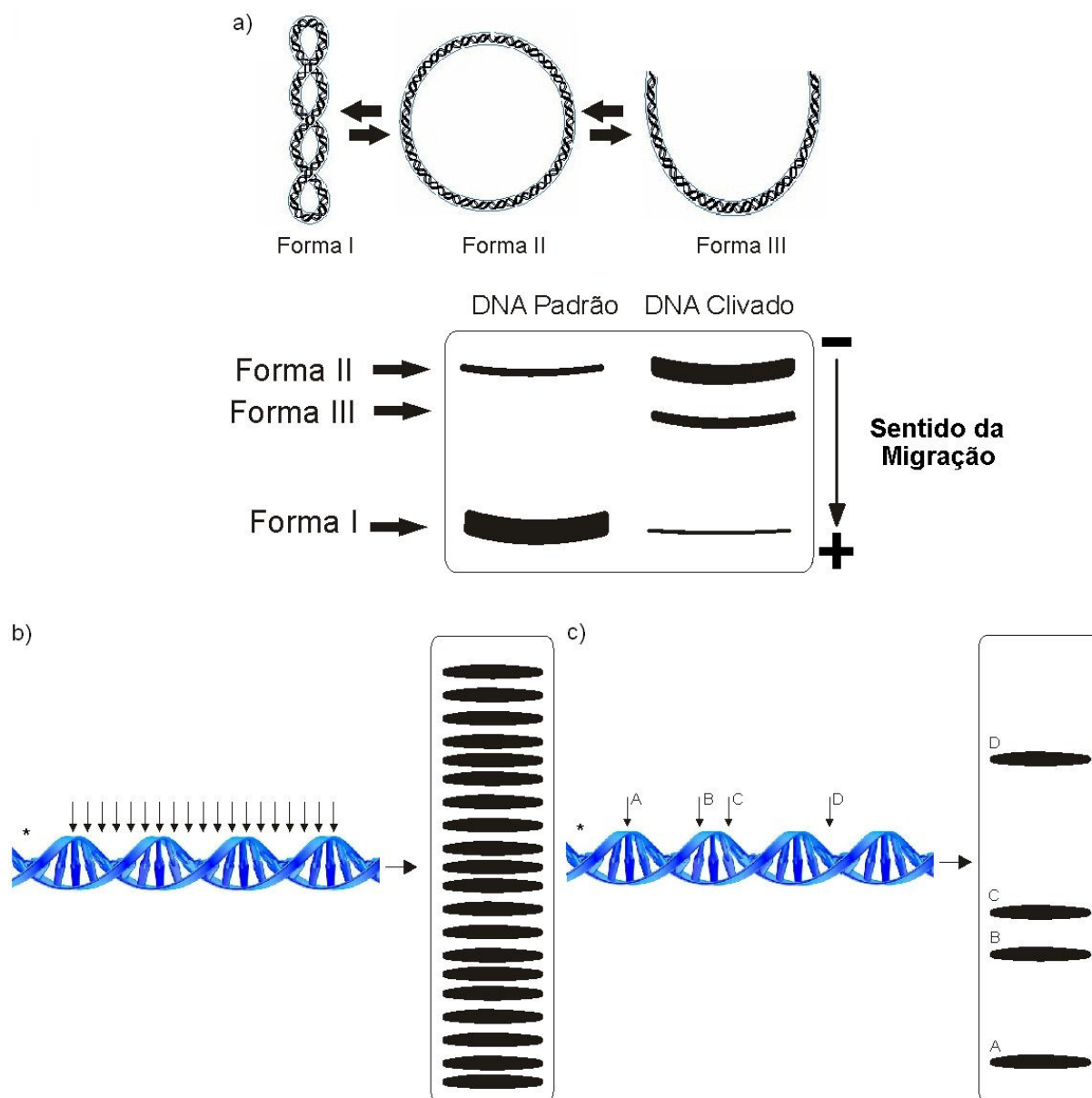


Figura 3 – a) Eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (forma I) nas formas circular aberta (forma II) e linear (forma III); b) e c) eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando em clivagem não seletiva e seletiva, respectivamente. * indica o terminal do polinucleotídeo que possui o marcador que serve para revelação, assim como um filme.

A habilidade de clivar o DNA constitui um interesse predominante nos campos da medicina (quimioterapia) e biotecnologia (ou engenharia genética). É uma das áreas na qual a síntese química tem feito substanciais contribuições para o desenvolvimento de agentes que clivam os ácidos nucleicos com potencial utilização como sondas estruturais e agentes terapêuticos (ARMITAGE, 1998). Enquanto as enzimas de restrição naturais têm sido extremamente úteis em muitas aplicações,

seu grande tamanho e/ou limitada seqüência de reconhecimento de cerca de 4-8 pares de bases (bp) e o requisito de serem palindrômicas (isto é, mesma seqüência de pares de bases nas duas fitas do DNA lidas em sentido antiparalelo) diminui seu uso (ARMITAGE, 1998). Aplicações que requerem clivagem com alto nível de seletividade ou não-palindrômicas necessitam de um agente de clivagem com estas características (ARMITAGE, 1998). Assim, recentemente, tem havido grande interesse dos químicos inorgânicos e orgânicos na modelagem molecular de pequenas moléculas, contendo ou não metais, incluindo complexos metálicos de compostos extraídos de plantas, as quais são capazes de hidrolisar cataliticamente o DNA, RNA e proteínas (SCHNAITH et al., 1994; HEGG, BURSTYN, 1998; LIU et al., 1999; REN et al., 2000; NEVES et al., 2001; LIU et al., 2002; ROSSI et al., 2002; BATISTA et al., 2003; HORN JR. et al., 2005; JUN et al., 2007a; JUN et al., 2007b). Recentemente, Jun et al. (2007a e 2007b) publicaram dois trabalhos sobre complexos de manganês(II) e zinco(II) com a quercetina (extraída de plantas) capazes de clivar o DNA plasmidial por mecanismo hidrolítico.

De acordo com Blackburn & Gait (1996), os compostos metálicos podem interagir reversivelmente através de seus íons metálicos carregados positivamente neutralizando essa carga negativa do esqueleto do DNA, constituindo desta forma, através da interação eletrostática, uma maneira fácil de aproximação da molécula ao DNA, para que posteriormente seja efetuada a clivagem hidrolítica no átomo de fósforo. Dessa, maneira, os complexos metálicos que catalisam a clivagem hidrolítica do DNA poderão ser úteis para manipulação dos genes, e também mimetizando e elucidando o importante papel dos íons metálicos na catálise das metaloenzimas (LIU et al., 2002) e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (LALEZARI, AFGHAHI, 1975).

Na clivagem do DNA, como já citado, existem basicamente dois mecanismos, o oxidativo e o hidrolítico. No entanto, o passo inicial da interação de um composto no local de clivagem ocorre igualmente como fazem os intercalantes ou os ligantes das fendas, porém, ao invés de estabilizarem o DNA, as moléculas enfraquecem as ligações de hidrogênio entre as bases, ligando-se a uma das fitas ou deslizando entre as bases (BISCHOFF, HOFFMANN, 2002), para posteriormente clivar o DNA.

Armitage (1998), em sua revisão sobre alguns tipos de agentes oxidativos, os “fotoclivadores” ou “agentes de fotoclivagem” (ROS et al., 2001), cita que estes são compostos que em seus estados excitados podem iniciar uma série de reações

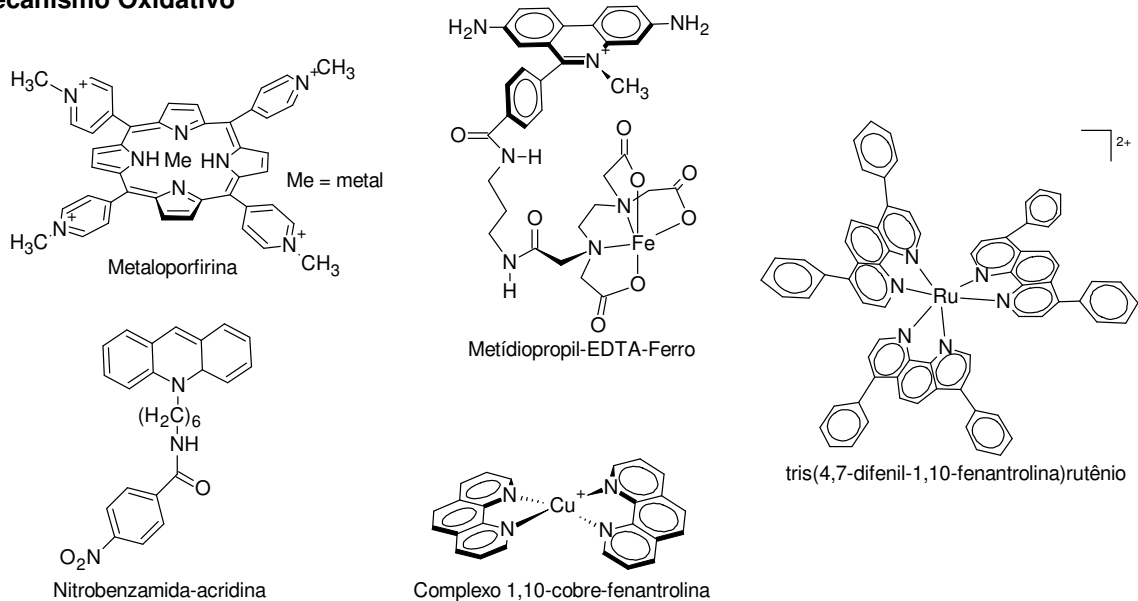
químicas que levam a clivagem dos ácidos nucléicos. Esses agentes de fotoclivagem têm uma característica em comum, ou seja, o fato de que todos os componentes de um sistema podem ser misturados juntos sem iniciar a reação química, até que a amostra seja irradiada. Ao contrário da clivagem hidrolítica que inicia no grupamento fosfato, a clivagem oxidativa envolve, tipicamente, uma reação oxidativa inicial na base nitrogenada ou no resíduo açúcar do DNA (ARMITAGE, 1998). O dano ao nucleotídeo pode degradar o ácido nucléico espontaneamente ou necessitar de incubação com piperidina quente (no caso do DNA) ou anilina (no caso do RNA) para revelação. Já os agentes que clivam no resíduo açúcar não são seletivos quanto à seqüência de clivagem, sendo que o mesmo se encontra em todos os nucleotídeos ao longo do DNA. Agentes de fotoclivagem que agem nas bases nitrogenadas atuam por três processos distintos: (a) transferência direta de elétrons da base nitrogenada para o estado excitado do fotoclivador; (b) transferência de energia *triplet* do fotoclivador excitado para o O₂, produzindo o oxigênio *singlet*, o qual reage com a base; e (c) formação de um aduto com a base (ARMITAGE, 1998) (alquilação). Além do mais, devido aos clivadores oxidativos requererem adição de agentes externos e os produtos não serem avaliáveis para futura manipulação enzimática pela perda dos terminais 3'-OH e 5'-OPO₃, suas aplicações são remarcadamente limitadas nos campos da biologia molecular e biotecnologia (LIU et al., 2002). Entre os motivos disso estão: a) muitos clivadores oxidativos e fotoclivadores (FU et al., 2001) requerem a adição de um agente externo como peróxido de hidrogênio ou luz para iniciar a clivagem (REN et al., 2000); b) freqüentemente, geram radicais livres os quais são indesejáveis ao organismo, pois apresentam um papel crítico em vários processos biológicos, incluindo mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (PEISACH, 2002) e eles ainda c) não geram fragmentos com finais 3'-OH e 5'-OPO₃ como os que são produzidos pelas nucleases naturais, e dessa maneira, os ácidos nucléicos clivados por esses agentes oxidativos não podem ser religados enzimaticamente (SIGMAN, 1990; FREY et al., 1996; REN et al., 2000; LIU et al., 2002). Contudo, muitos clivadores oxidativos e fotoclivadores têm sido utilizados com grande sucesso para o "footprinting" do DNA, determinar o posicionamento, protuberâncias e giros de bases, e determinar a variação conformacional do DNA e como agentes quimioterápicos (LIU et al., 2002). Exemplos de fotoclivadores (ARMITAGE, 1998)

são: cobalto-bleomicina e análogos, antraquinonas, geradores de radical hidroxil, enediinas, porfirinas, compostos diazo, azido e azidas etc.

Já a hidrólise do DNA é uma importante reação enzimática, mas uma das mais difíceis de imitar no laboratório devido a estabilidade do DNA à hidrólise (HEGG, BURSTYN, 1998). A hidrólise dos fosfodiésteres é dificultada principalmente pela carga negativa do esqueleto polianiónico que inibe o ataque de nucleófilos, sendo por isso, que enzimas nucleases naturais utilizam íons metálicos como cofatores para neutralizar essa carga e interagir com o DNA. O mecanismo hidrolítico de clivagem do DNA fita dupla produz terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH, sendo uma meta desejável em química, pois imita a ação de enzimas de restrição naturais. Além disso, esses terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH podem ser eficientemente ligados pela T₄-DNA ligase e ATP (SCHNAITH et al., 1994; BLACKBURN, GAIT, 1996; LIU et al., 2002; ROSSI et al., 2002; SCARPELLINI et al., 2003), ou serem marcados enzimaticamente (LIU et al., 2002). Para efetuar a clivagem fita dupla, um produto químico deve promover a clivagem das duas fitas do DNA nas proximidades uma da outra sem que haja liberação da ligação com o DNA (COWAN, 2001). Um conjugado nitrobenzamida-acridina (considerado uma exceção) é capaz de clivar o DNA após a irradiação (fotoclivagem), porém, apesar de se supor um mecanismo oxidativo, seus produtos de clivagem podem ser parcialmente religados com a T₄-DNA ligase, indicando a presença de 3'-OH nos terminais dos produtos gerados pela clivagem (ARMITAGE, 1998).

Para verificar se o mecanismo de clivagem é oxidativo ou hidrolítico, além da técnica de religação, também podem ser utilizados seqüestradores de radicais livres, como glicerol, dimetilsulfóxido, tiouréia e D-manitol que seqüestram radicais hidroxil (OH[•]) da solução (SCHNAITH et al., 1994; FREY et al., 1996; HEGG, BURSTYN, 1996; REN et al., 2000; ROSSI et al., 2002; HÖRNER, 2003; SCARPELLINI et al., 2003; DAS et al., 2005). Se utilizando estes, a clivagem continua a ocorrer, significa que a presença dessas espécies reativas não são essenciais para que a clivagem ocorra e o mecanismo envolvido possa ser o hidrolítico, já que o oxidativo, geralmente, depende destes radicais livres. Além do mais, muitas reações de clivagem por mecanismo oxidativo dependem da presença de O₂, sendo por isto, realizadas reações de clivagem em atmosfera de argônio (THOMAS et al., 2004; HORN JR. et al., 2005) ou em anaerobiose (HEGG, BURSTYN, 1996; REN et al., 2000; DECK et al., 2002; SCARPELLINI et al., 2003).

Mecanismo Oxidativo



Mecanismo Hidrolítico

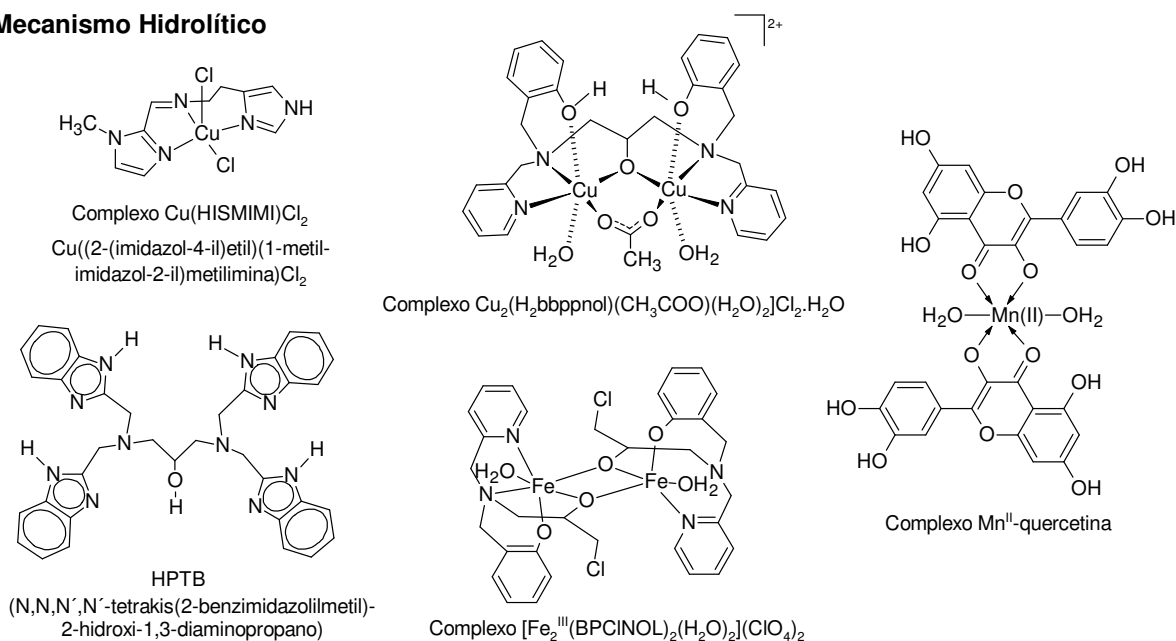


Figura 4 – Estruturas químicas de alguns compostos capazes de clivar o DNA por mecanismos oxidativo e hidrolítico.

Inicialmente, as primeiras nucleases químicas ou nucleases sintéticas foram conhecidas como agentes oxidativos, pois elas cortavam os ácidos nucleicos, sob condições fisiológicas, através de seu ataque oxidativo na ribose ou desoxirribose. 1,10-cobre-fenantrolina (Figura 4) foi o primeiro complexo de coordenação sintético a ter esta eficiente atividade nucleolítica, em 1979 (SIGMAN, 1986). Outros exemplos de nucleases químicas que foram descobertos constituíram Fe-EDTA e seus

derivados, algumas metaloporfirinas, complexos octaédricos do 4,7-difenil-1,10-fenantrolina e bleomicina (Figuras 2 e 4) (SIGMAN, 1990; SCHNAITH et al., 1994; SREEDHARA, COWAN, 2001). Vários destes agentes de clivagem oxidativa têm no *footprinting* do DNA sua maior utilização, apesar de ainda serem empregados na localização de bases, determinação das variações conformacionais do DNA e como agentes quimioterapêuticos (REN et al., 2000; LIU et al., 2002). A maioria das enzimas naturais que medeiam as reações de hidrólise do DNA utilizam íons metálicos como cofatores. Os íons metálicos apresentam um papel importante em muitas enzimas, e seu papel preciso no mecanismo de clivagem ainda não está claro. Por isso, tem havido um interesse especial em obter esses complexos de metais que catalisam a clivagem hidrolítica do DNA. Existem na literatura exemplos destes compostos capazes de clivar hidroliticamente o DNA (SCHNAITH et al., 1994; REN et al., 2000; COWAN, 2001; NEVES et al., 2001; LIU et al., 2002; ROSSI et al., 2002; SCARPELLINI et al., 2003), inclusive alguns triazenos (HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006).

2.2 Tipos de interações com o DNA: intercalação, alquilação e ligação nas fendas

Vários são os tipos de interações que as moléculas químicas apresentam frente ao DNA (STARCEVIC et al., 2006), o que possibilita sua diversificada utilização. Os estudos que envolvem este tipo de interação são essenciais para a elucidação do mecanismo de ação desses agentes, que causam danos ao DNA, e para o desenvolvimento de novas ferramentas na medicina, no tratamento as doenças e como ferramentas em toda a Biologia Molecular, pois se objetiva sempre maior especificidade e menor toxicidade (DAI et al., 1999). Assim, convém-nos relatar uma breve revisão sobre os tipos de interações e algumas das principais drogas. Constantemente estão surgindo novas drogas que atuam no DNA pelos mecanismos de ligação abaixo citados. Moléculas que se ligam ao DNA são chamadas ligantes ao DNA, e incluem os ligantes de fendas, os intercalantes, os alquilantes, os agentes clivadores e aquelas com interações mistas.

2.2.1 Moléculas intercalantes do DNA

Existem diferentes técnicas para se verificar o tipo de interação que ocorre desses agentes clivadores com o DNA: interação por intercalação, alquilação, ligação eletrostática externa nas fendas maior e/ou menor do DNA ou mais de uma dessas ao mesmo tempo. Um modo de se verificar a intercalação com o DNA é pela titulação espectrofotométrica ultravioleta-visível de uma solução com o determinado composto químico na qual se adicionam quantidades crescentes de DNA, fazendo-se a leitura espectrofotométrica (PYLE et al., 1989). A partir daí podem ser calculados os valores das constantes de ligação (K_b) e fazer a comparação com intercalantes clássicos, como o brometo de etídio (Figura 5).

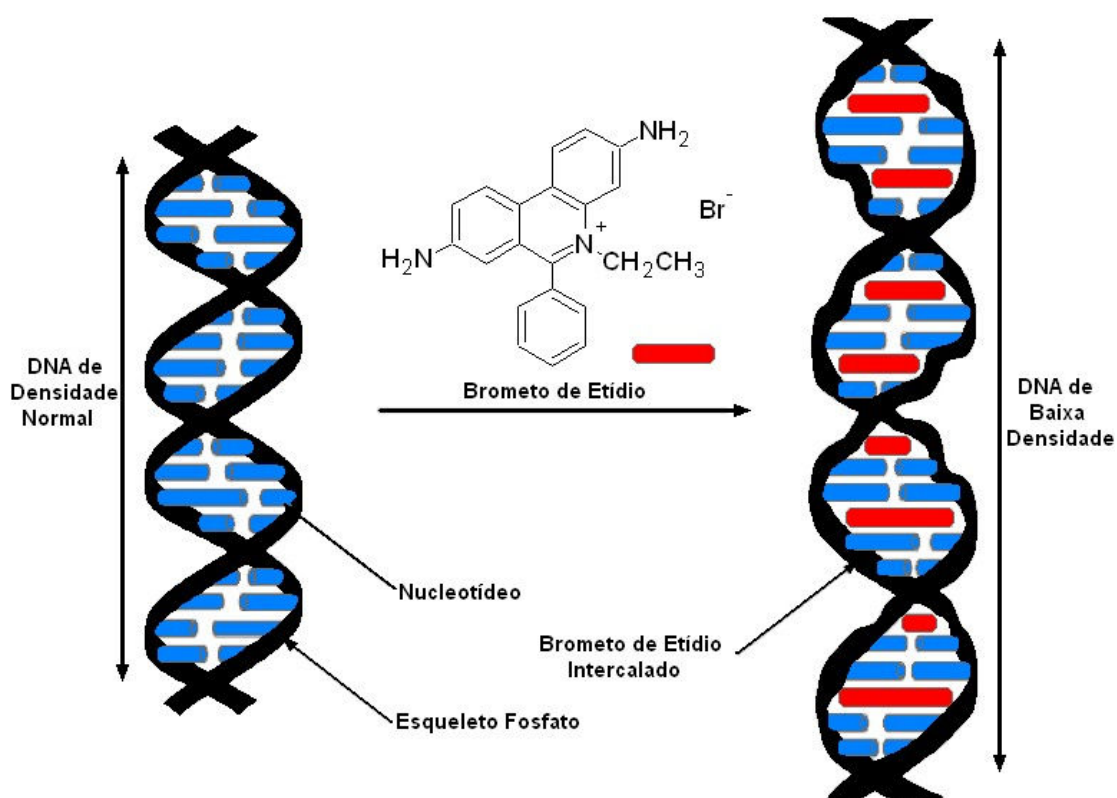


Figura 5 – Representação da intercalação do brometo de etídio entre as bases do DNA fita dupla. A intercalação aumenta o espaçamento dos pares de bases sucessivos, distorcendo o esqueleto fosfato e reduzindo a densidade do DNA. Modificada de CREIGHTON, T. E. Encyclopedia of Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, Inc., v. 1-4, p. 1517, 1999.

Além do mais, a ligação de moléculas intercalativas ao DNA pode ser observada por um hipocromismo (diminuição do coeficiente de extinção molar) e um desvio para o vermelho (batocromismo) (MAHADEVAN, PALANIANDAVAR, 1998; MUDASIR et al., 2007). Por outro lado, a observação de hipercromismo (aumento na absorvidade molar) e hipsocromismo (desvio para o azul), como ocorre com outros triazenos citados na literatura (HÖRNER, 2003), indica que a interação com o DNA possa ser por interação eletrostática de repulsão de ânions. O cálculo do K_b é muito importante, pois valores altos predizem a intercalação do DNA assim como brometo de etídio. Moléculas intercalantes do DNA são moléculas cromóforas aromáticas planares, geralmente tri ou tetracíclicas (ANTONINI et al., 1997), como os compostos brometo de etídio (brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridínio), laranja de acridina (cloreto de 3,6-bis-(dimetil)acridínio) e azul de metileno (cloreto de 3,7-bis-(dimetilamino)fenotrazin-5-io) (Figura 6a) que se ligam ao DNA e RNA de modo intercalativo deslizando entre as bases adjacentes e causando um alongamento da estrutura dupla hélice (DOUTHART et al., 1973).

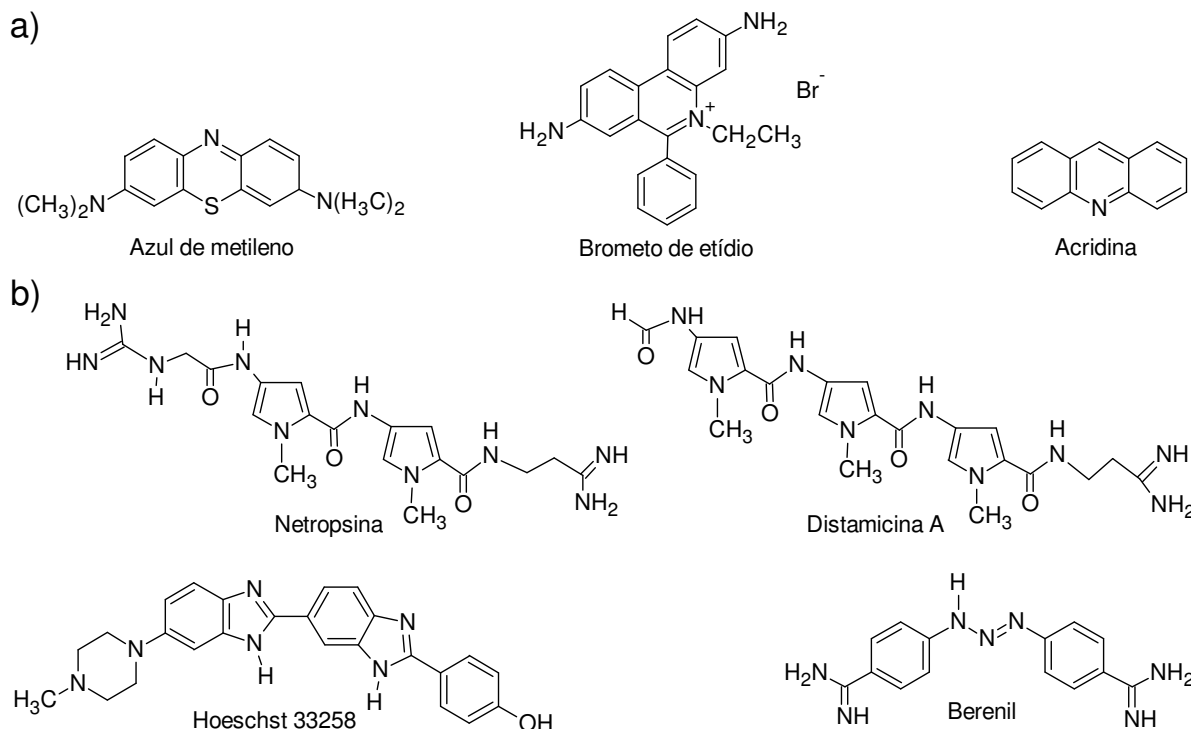


Figura 6 – Estruturas químicas de alguns compostos clássicos que interagem com o DNA por diferentes mecanismos. a) moléculas que se intercalam no DNA; b) moléculas que se ligam aos sulcos do DNA.

2.2.2 Moléculas que se ligam aos sulcos do DNA

Existem moléculas, como os antibióticos antitumorais clássicos netropsina e distamicina A, Hoeschst 33258 e o berenil (1,3-bis-(4-amidinofenil)triazeno) (Figura 6b), que se ligam ao sulco menor do DNA (Figura 7) (KOPKA et al., 1985a; KOPKA et al., 1985b; CALDWELL, KOLLMAN, 1986; MARKY, BRESLAUER, 1987; PORTUGAL, WARING, 1987; DEMEUNYNCK et al., 2003).

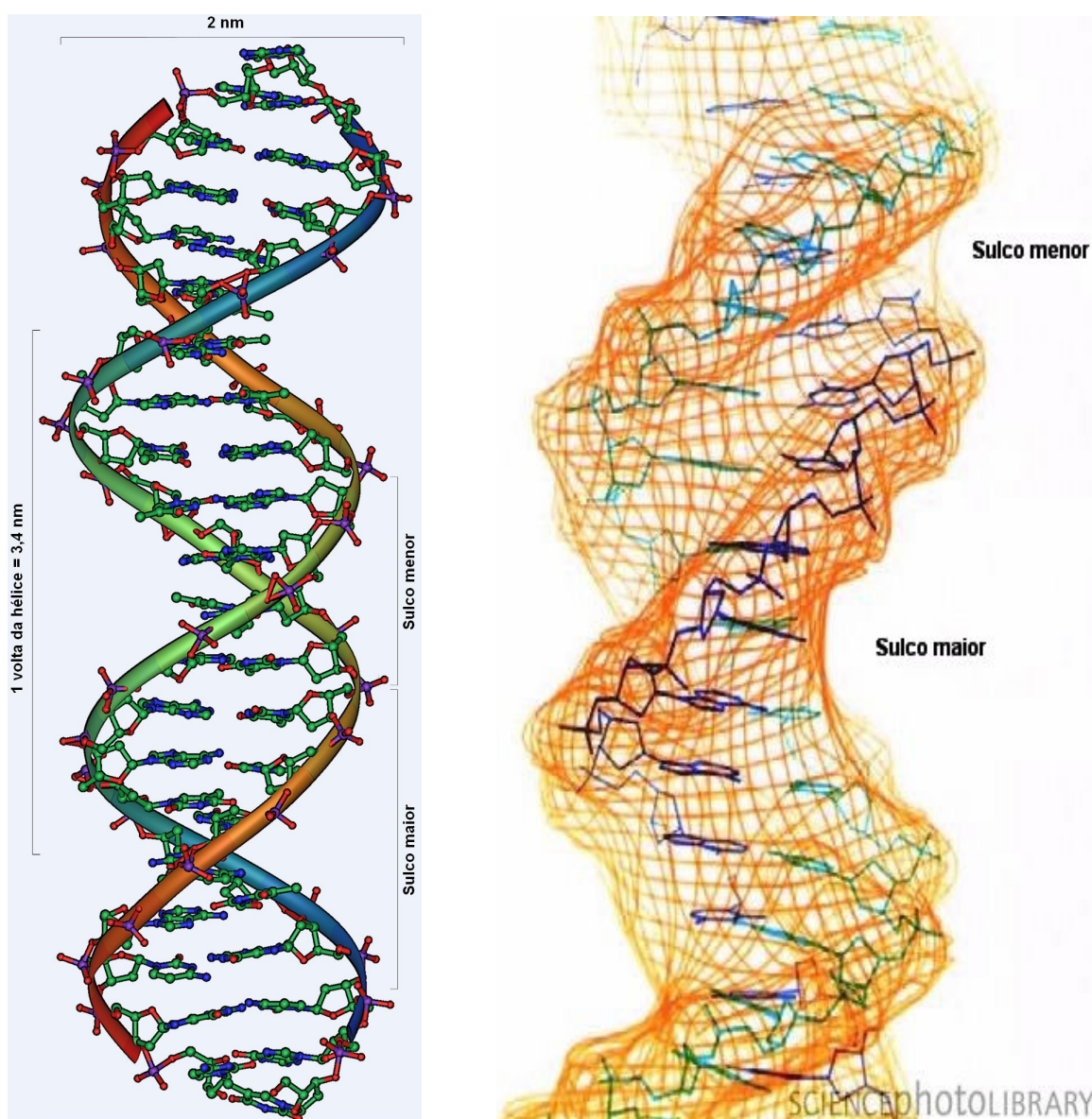


Figura 7 – Representações estruturais de uma seção do DNA em 3 dimensões mostrando os sulcos menor e maior do DNA. Modificadas de [http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry)) e <http://www.sciencephoto.com>.

O mecanismo geral de ligação à fenda do DNA (Figura 8) inicia pela transferência do ligante da solução para o DNA (BAILLY, CHAIRES, 1998). Se o ligante é carregado positivamente, este evento é acompanhado pela liberação de contra-íons carregados que cercam o DNA (BAILLY, CHAIRES, 1998). Uma vez no sulco menor, interações moleculares específicas podem então ser formadas, incluindo as ligações de van der Waals e de hidrogênio (BAILLY, CHAIRES, 1998). A ligação na fenda maior do DNA é freqüentemente realizada por um padrão de reconhecimento altamente específico, enquanto a ligação na fenda menor pode ser realizada de modo inespecífico, sendo por isso, mais usada na descoberta de drogas (BISCHOFF, HOFFMANN, 2002).

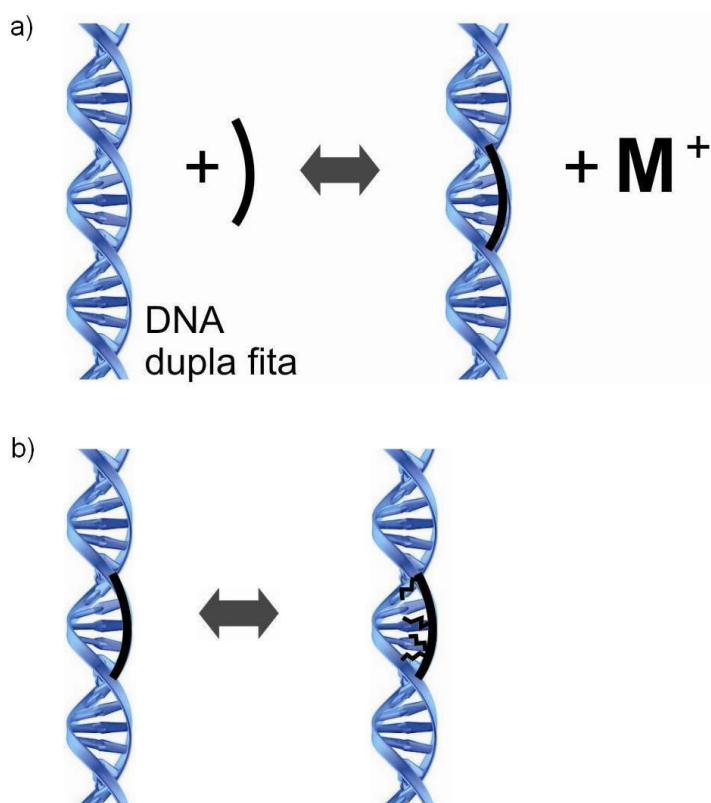


Figura 8 – Representação das etapas de reação de uma molécula no sulco do DNA. (a) Primeiramente, a molécula ligante na fenda é transferida do meio para o sulco menor do DNA. (b) Uma vez no sulco do DNA, o ligante pode formar uma ampla variedade de interações moleculares, como as ligações de van der Waals e de hidrogênio (BAILLY, CHAIRES, 1998).

Pequenas moléculas que se ligam às fendas do DNA têm mostrado uma ampla variedade de atividades biológicas como antitumoral, antiviral, antifúngica e antibacteriana (GEIERSTANGER, WEMMER, 1995). Seus modos de ação, em todos

os casos, envolvem ligação inicial a fenda, seguida por interferência nas funções de regulação do DNA, como replicação e transcrição (ZIMMER, WÄHNERT, 1986; SAPSE, LOWN, 1998). A netropsina exibe ampla faixa de atividade antibiótica contra bactérias, fungos e vírus (HAHN, 1975). A distamicina é conhecida por inibir a multiplicação de vírus como vaccinia, herpes simples e vírus do sarcoma Rous, por ligar-se preferencialmente nas fendas menores do DNA ricas em seqüências de bases A-T (LOMBARDI, CRISANTI, 1997), sendo capaz de reconhecer seqüências contendo ao menos 4 pares de bases A-T e liga-se reversivelmente (BARALDI et al., 2002). A distamicina possui atividade malaricida, porém com alta toxicidade, e por isso, alguns derivados seus foram testados e provaram ser altamente ativos contra o *Plasmodium falciparum*, porém com baixa toxicidade *in vitro* (LOMBARDI, CRISANTI, 1997). O berenil possui uma atividade biológica reconhecida, sendo que seus derivados são antiprotozoários para leishmaniose (MUKHOPADYAY, MADHUBALA, 1995), babesiose (ARIYIBI et al., 2001; BARCELO et al., 2001), criptosporidiose (REDDY et al., 1999), e também antitumorais (REDDY et al., 1999). Sua atividade é melhor discutida adiante, quando citamos os compostos triazenos. O berenil também pode se intercalar ao DNA dependendo da seqüência de bases nucleotídicas do DNA (REDDY et al., 1999).

2.2.3 Moléculas que alquilam o DNA

Moléculas alquilantes do DNA são compostos capazes de transferir grupos alquil aos sítios nucleófilos do DNA, sob condições fisiológicas. Eles são capazes de reagir com uma variedade de O, N e S que constituem os sítios nucleófilos dos compostos celulares. Exemplos de agentes alquilantes citotóxicos usados como terapêuticos incluem as mostardas nitrogenadas, etileniminas e metilmelaninas, alquil-sulfonatos, nitrosuréias e os triazenos (SANDERSON, SHIELD, 1996). A alquilação das bases do DNA constitui um dos modos comuns de causar danos ao DNA pelos agentes anticancerígenos orgânicos (DAI et al., 1999). A reação desses compostos com o DNA, RNA e proteínas pode causar a morte celular (PICCIONI et al., 1995). Seqüências com guaninas repetidas têm o menor potencial eletrostático molecular, e então, são mais vulneráveis ao ataque nucleofílico (BACHERIKOV et

al., 2005). A guanina sofre oxidação mais facilmente devido ao baixo potencial de redução e a sua habilidade para se ligar a íons metálicos de transição capazes de catalisarem processos oxidativos (MORENO et al., 2006). O sítio primário para a alquilação do DNA por agentes biológicos é considerado o átomo N7 da guanina (BACHERIKOV et al., 2005). A alquilação do DNA é descrita como uma anomalia que também pode aumentar a curvatura do polinucleotídeo (NINABER, GOODFELLOW, 1999). A curvatura natural do DNA é importante para a interação proteína-DNA (HAGERMAN, 1984).

A dacarbazina é uma pró-droga que precisa ser ativada *in vivo* para formar um agente alquilante, o diazometano que ao reagir, causa metilação do DNA inativando-o (CHABNER, CALABRESI, 1995), como veremos. As mostardas nitrogenadas (Figura 9) exercem efeitos citotóxicos ao fazerem ligações cruzadas

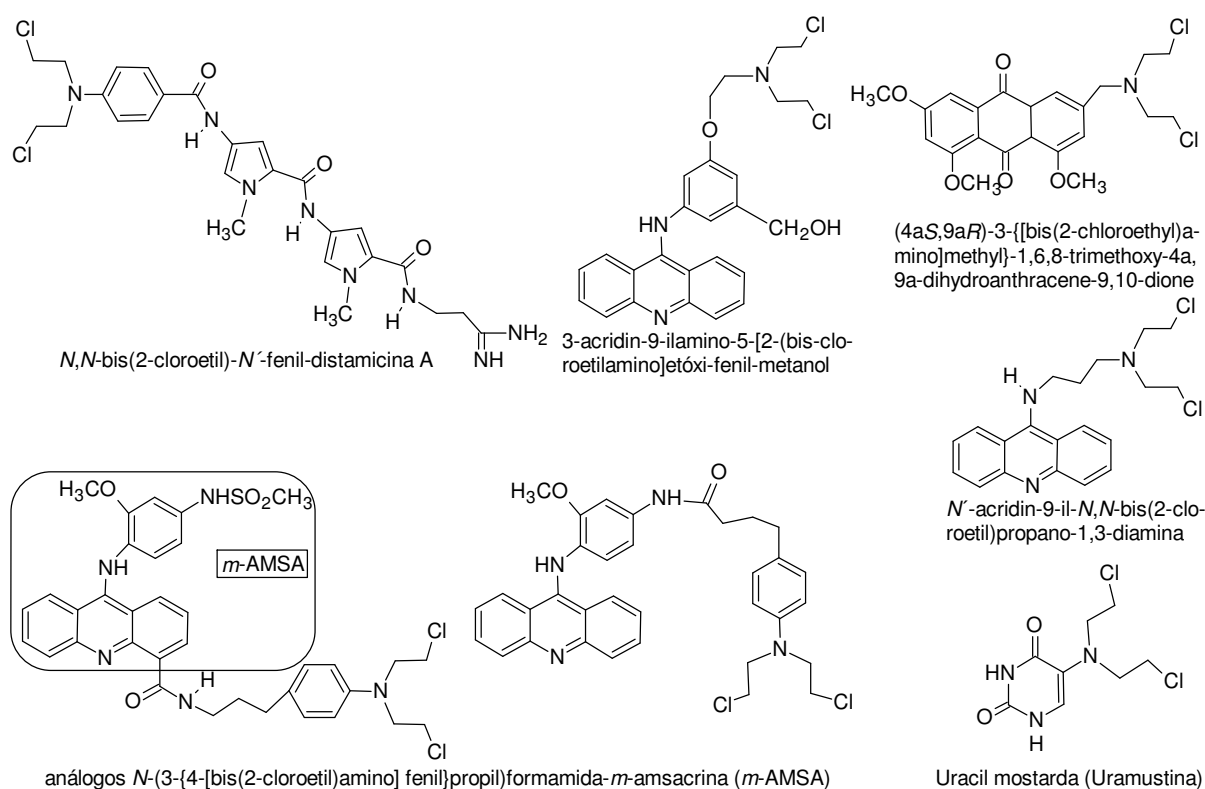


Figura 9 – Estrutura química de algumas mostardas nitrogenadas.

(*crosslinking*) entre as fitas do DNA (BACHERIKOV et al., 2005), como mostrado na Figura 10. A uracil mostarda (uramustina) é um barato agente alquilante oral que tem sido efetivo para o tratamento de pacientes com linfossarcoma, leucemia linfática crônica e trombocitopenia (BARALDI et al., 2002). Uramustina interage com sítios do

DNA ricos em pares de bases G-C (BARALDI et al., 2002). Mostardas nitrogenadas ligadas a intercalantes como 9-aminoacridina, 9-anilinoacridina, antraquinonas entre outros, possuem maior atividade (efeito sinérgico). Mostardas nitrogenadas contendo unidades acridina ou antraquinonas mostraram de 10 a 100 vezes maior atividade antileucêmica quando comparada com suas mostardas nitrogenadas sem essas unidades (GOURDIE et al., 1990; BACHERIKOV et al., 2005). Além disso, mostardas nitrogenadas contendo o ligante da fenda menor do DNA distamicina A (Figura 9) mostram alta seletividade para se ligar ao DNA (BACHERIKOV et al., 2005). Agentes alquilantes são agora usados clinicamente principalmente para o tratamento de doenças neoplásicas, embora eles tenham sido usados como agentes imunossupressores no tratamento de doenças inflamatórias do tecido conectivo e em terapias experimentais para esclerose múltipla (SANDERSON, SHIELD, 1996).

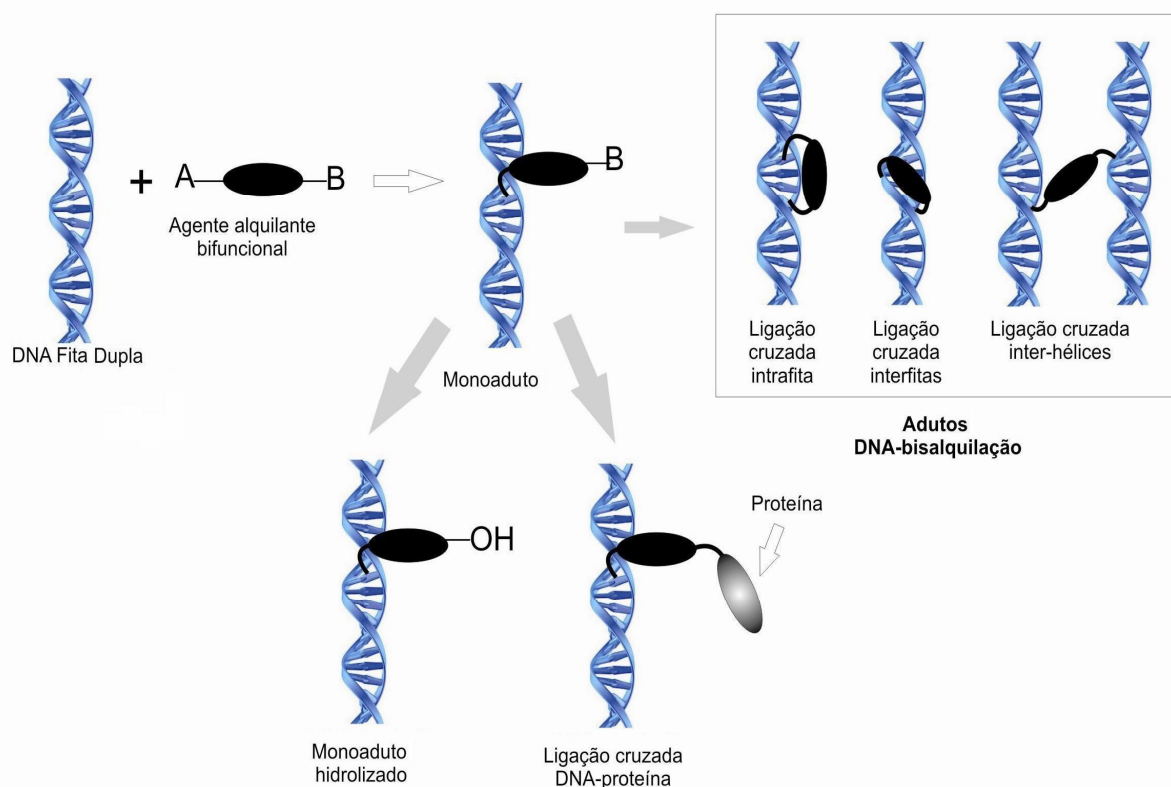


Figura 10 – Efeitos citotóxicos da mostardas nitrogenadas: representação das ligações cruzadas (*crosslinking*) que podem ocorrer com o DNA; ligação intrafita, interfita e inter-hélices. A e B representam domínios eletrofílicos de um agente alquilante de interesse. Inicialmente, um agente alquilante bifuncional forma uma ligação com DNA (monoaduto), para posteriormente formar a segunda ligação, a qual pode ser com o mesmo DNA (bisalquilação), uma proteína ou sofrer hidrólise.

2.3 Triazenos

Triazenos (TZC) ou diazoaminas constituem uma classe de compostos de cadeia aberta que contém 3 átomos de nitrogênio interligados em seqüência (-N=N-N(H)-). Os TZC têm constituído alvo de constante pesquisa na busca de novos compostos biologicamente ativos, e elucidação do provável mecanismo de ação (NIFONTOV et al., 1994). Os compostos triazenos apresentam um histórico de pesquisa muito interessante quanto às suas atividades biológicas. A dacarbazina e o berenil constituem exemplos de compostos triazenos clássicos. A dacarbazina é o fármaco de referência para o tratamento do melanoma metastásico (TENTORI et al., 1995) e o berenil é um antiprotozoário (FARRELL et al., 1987). Variações estruturais nas moléculas dos compostos triazenos lhes conferem diferentes atividades: repelente, antifúngica, antibacteriana, herbicida, tricomonocida, inseticida, antitumoral, mutagênica, carcinogênica e teratogênica (NIFONTOV et al., 1994) e atividade de clivagem do DNA (BURR et al., 2003; HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006). Assim, esta ampla gama de atividade biológica estimula a síntese de compostos triazenos inéditos em busca de novos agentes farmacológicos. As evidências de que diferentes moléculas possuem diferentes formas de atuar na cisão do DNA fita dupla e fita simples, dano às bases nitrogenadas e dano oxidativo (ELMROTH et al., 2003), estimulam as pesquisas sobre drogas conhecidas para novos mecanismos de ação, como a clivagem do DNA, pois esta é um mecanismo recente de atividade antitumoral e muitas moléculas ainda não possuem um mecanismo totalmente conhecido.

O primeiro relato de um composto triazeno com atividade antitumoral foi reportado por Clarke et al., em 1955. Naquela pesquisa, o composto 3,3-dimetil-1-feniltriazeno (Figura 11) inibiu o crescimento tumoral do sarcoma 180 (S-180) *in vivo*,

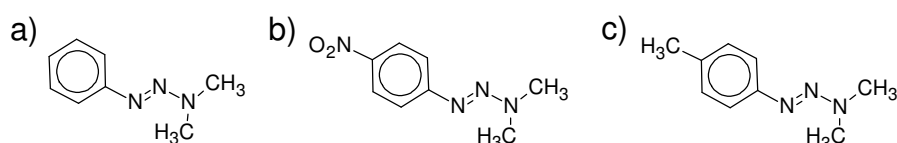


Figura 11 – Estruturas químicas dos compostos a) 3,3-dimetil-1-feniltriazeno; b) 3,3-dimetil-1-*p*-nitrofeniltriazeno; c) 3,3-dimetil-1-*p*-toluiltriazeno.

em ratos. Esse composto foi chamado de “o triazeno”. No mesmo ano, dois outros compostos foram apresentados por inibirem o crescimento tumoral foram: 3,3-dimetil-1-*p*-nitrofeniltriazeno; 3,3-dimetil-1-*p*-toluiltriazeno (Figura 11). Dagg et al. (1955), publicaram na mesma data que o 3,3-dimetil-1-feniltriazeno possuía, além da atividade antitumoral, atividade teratogênica no embrião de galinha. A partir destes dois trabalhos, iniciou-se a investigação da atividade antitumoral dos triazenos. Um outro trabalho (RONDESTVEDT JR., DAVIS, 1957) mostrou que a atividade antitumoral de uma série de triazenos análogos estruturais do 3,3-dimetil-1-feniltriazeno dependia da presença de pelo menos um grupo metil ligado ao N3 do triazeno e que os análogos 1-fenil-3,3-dialquiltriazenos foram os mais ativos em comparação com aqueles que apresentavam 1-*p*-nitrofenil, 1-*p*-metoxifenil, 1-*o*-toluil ou 1-*m*-trifluorometiltriazeno no lugar da fenila.

Shealy et al. (1962) publicaram a atividade antitumoral *in vivo* do composto 5(ou 4)-(dimetiltriazeno)imidazol-4(ou 5)-carboxamida (DTIC) contra o sarcoma 180 (S180), o adenocarcinoma 755 (Ca775) e a leucemia linfóide L1210 em ratos. Este foi o primeiro relato do que seria depois o fármaco dacarbazina. Após, Shealy & O'Dell, em 1966, sintetizaram e avaliaram a atividade antitumoral de vários compostos 5-(*X,X*-triazeno)-*v*-triazol-4-carboxamida (onde os *X* representam grupos alquil), e observaram que o dimetiltriazeno mostrou atividade contra L1210, além do isopropilmetiltriazeno, que mostrou baixa atividade. No mesmo ano, Shealy & Krauth (1966) publicaram que o composto 5(ou 4)-[3,3-*bis*(2-cloroetil)-*l*-triazeno]imidazol-4(ou 5)-carboxamida mostrara atividade contra S180 e Ca755 em camundongos e contra carcinoma 256 em ratos. A partir daí, surgiram vários estudos com respeito a essa atividade antitumoral *in vivo* (SHEALY et al., 1968a; SHEALY et al., 1968b; SHEALY, O'DELL, 1970; SHEALY, O'DELL, 1971; LIN et al., 1972; LALEZARI, AFGHAHI, 1975; ATWELL et al., 1977; GIRALDI et al., 1977; HANSCH et al., 1978; HATHEWAY et al., 1978; LIN, LOO, 1978; EARL, TOWNSEND, 1979; WILMAN, GODDARD, 1980; VAUGHAN et al., 1984; WILMAN et al., 1984), da mutagenicidade (VENGER et al., 1979; HANSCH et al., 1980) e carcinogenicidade (PREUSSMANN et al., 1969; KOLAR, 1986) de diversos triazenos substituídos, além de estudos clínicos sobre a dacarbazina (LUCE et al., 1970), seu metabolismo (SKIBBA et al., 1970) e sua farmacocinética (BREIHAUPT et al., 1982). Também são encontrados artigos de revisão sobre os triazenos (SHEALY, 1970; JULLIARD, VERNIN, 1981), artigos sobre agentes quimioterapêuticos que citam os triazenos (MONTGOMERY,

1986) e outros sobre estudos da relação quantitativa estrutura-atividade (GUPTA, 1994). Em 1989 foi realizada a “International Conference on Triazines: Chemical, Biological and Clinical Aspects” em Trieste, na Itália. Em 1990 foi editado o livro “*Triazines – Chemical, Biological and Clinical Aspects*” (GIRALDI et al., 1990).

A dacarbazina é, atualmente, usada em um regime de dosagem juntamente com adriamicina, bleomicina e vincristina (ABVD) para doença de Hodgkin, porém, é mais ativa sozinha para o tratamento de melanoma avançado e sarcoma de tecidos moles (LEGHA, 1989). Na clínica, a dacarbazina foi o primeiro composto triazeno utilizado no tratamento de pacientes com câncer, e é considerada na atualidade como a droga de referência no tratamento do melanoma maligno metastásico (TENTORI et al., 1995). A dacarbazina constitui um composto triazeno antitumoral, e suas propriedades citotóxicas haviam sido atribuídas, principalmente, à sua habilidade de formar adutos principalmente com a posição O⁶ da guanina (DOLLERY, 1991; PICCIONI et al., 1995). No entanto, apesar da formação da O⁶-metilguanina ser a principal responsável pela atividade antineoplásica (e também mutagênica) devido determinar pareamento de bases incorreto, as bases mais comumente metiladas *in vivo* são: N⁷-metilguanina (70 %), N¹-metiladenina (15 %), N³-metiladenina (10 %), O⁶-metilguanina (6-8 %) (MARCHESI et al., 2007).

A dacarbazina foi originalmente considerada uma inibidora da síntese das purinas (KOLAR, 1986). Porém, a dacarbazina é uma pró-droga sendo hidroxilada por oxidação pelo sistema citocromo P450 para produzir 5-(3-hidroximetil-3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (HMMTIC) que por eliminação não enzimática de formaldeído, resulta em 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual rapidamente se decompõe para 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e diazometano (CH₃-N⁺≡N), sendo este o alquilante do DNA (GERULATH, LOO, 1972; CARVALHO et al., 2000; ROOSEBOOM et al., 2004; MARCHESI et al., 2007) (Figura 12a). Esse processo é chamado de N-demetilação. Entretanto, a oxidação metabólica diminui o nível desta “droga” no plasma, e conseqüentemente diminui a atividade (JEAN-CLAUDE et al., 1999). Além do mais, a molécula 5-aminoimidazol-4-carboxamida quando administrada em animais causa uma variedade de tumores (timo, estômago, bexiga e mama), apesar de que em humanos isto não foi relatado (KOLAR, 1986). Além do mais, a dacarbazina pode sofrer fotodecomposição sob luz ultravioleta gerando dimetilamina e 5-diazoimidazol-4-carboxamida (DIAZO-IC) o

qual cicliza para 2-azahipoxantina (2-AH) (Figura 12b) (GERULATH, LOO, 1972; SAUNDERS, CHAO, 1974; KOLAR, 1986; MARCHESI et al., 2007).

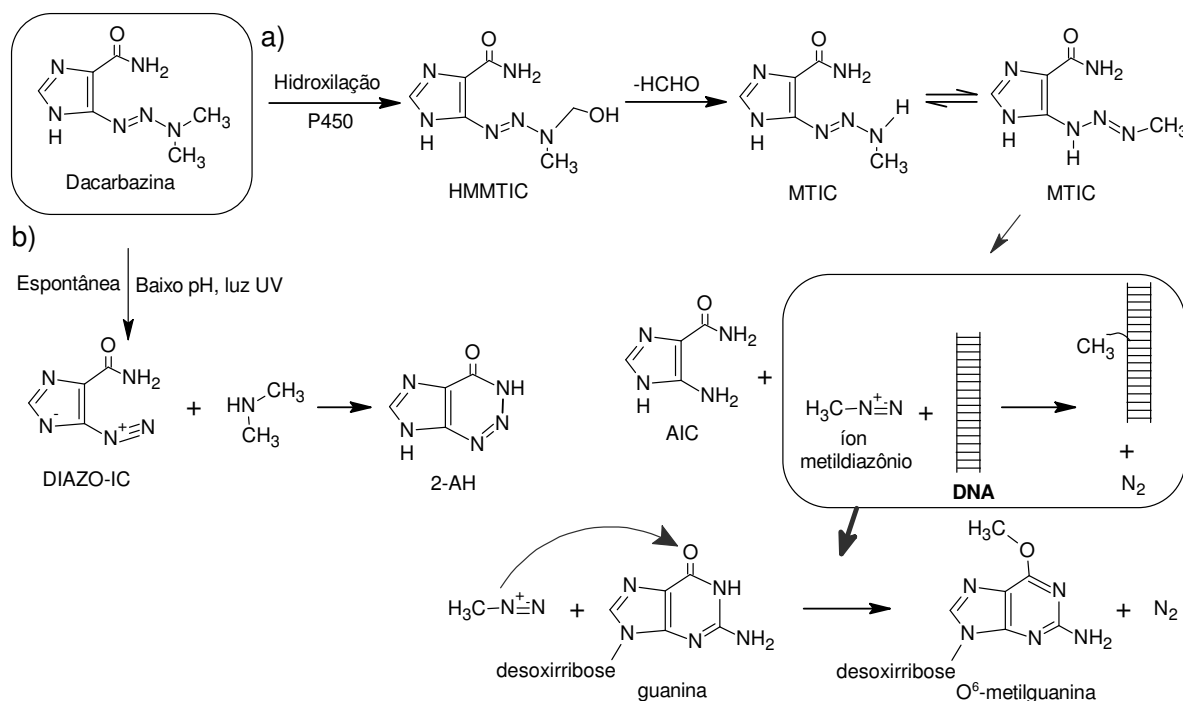


Figura 12 – a) Ativação da dacarbazina pelo citocromo P450 e metilação do DNA: a hidroxilação da dacarbazina pelo citocromo P450 resulta na formação de 5-(3-hidroximetil-3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (HMMTIC). 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC) é gerado não-enzimaticamente por perda de formaldeído. MTIC rapidamente se decompõe em 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e $\text{CH}_3-\text{N}^+\equiv\text{N}$, o qual alquila o DNA. b) Fotodecomposição da dacarbazina gerando dimetilamina e 5-diazoimidazol-4-carboxamida (DIAZO-IC) o qual cicliza para 2-azahipoxantina (2-AH).

Na bula do medicamento referência da dacarbazina no Brasil, o Dacarb[®], da Eurofarma, encontra-se que o seu mecanismo exato de ação ainda é desconhecido, porém existem três hipóteses prováveis: a) inibição da síntese de DNA pela ação como um análogo de purina, b) ação como um agente alquilante, e c) interação com grupos SH. Porém, não se encontrou referências sobre a interação da dacarbazina com grupos SH.

Lönn & Löhn (1987) publicaram que a dacarbazina causou a quebra do DNA gerando seqüências curtas de DNA em células de melanoma e adenocarcinoma de cólon. A análise eletroforética permitiu a visualização DNA com alto (mais de 10 kilobases) e baixo (2 a 10 kilobases) peso molecular para as células tratadas com dacarbazina e somente DNA de alto peso molecular nas não tratadas. Além do mais, os fragmentos pequenos de DNA não são formados nas células tratadas com

afidicolina antes da adição da dacarbazina. A afidicolina é uma inibidora da DNA polimerase α , enzima responsável pela replicação do DNA. Sendo assim, esses pesquisadores concluíram que a dacarbazina causa dano ao DNA nas células que estão sintetizando novo DNA.

Assim, na busca de compostos mais ativos e menos citotóxicos surgiram na década de 80 a temozolomida (8-carbamóil-3-metil-imidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3*H*)-ona e a mitozolomida (3-(2-cloroetil)-imidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3*H*)-ona) (Figura 13).

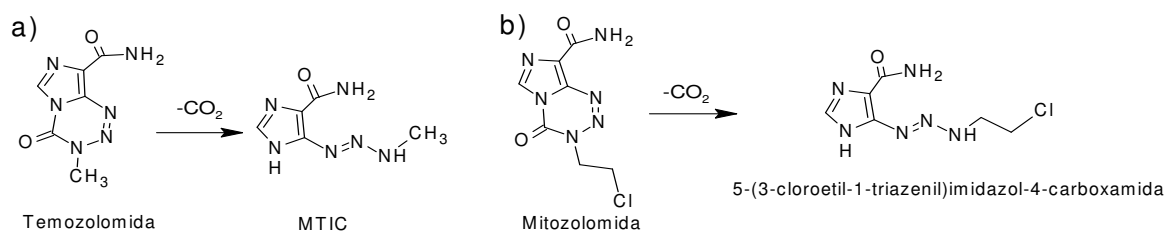


Figura 13 – Estruturas químicas da temozolomida (a) e mitozolomida (b) e suas decomposições químicas em pH fisiológico, com a abertura do anel tetrazinona formando o triazeno aberto 5-(3-metil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC) e 5-(3-cloroetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida, respectivamente.

Temozolomida e mitozolomida são pró-drogas que geram os trizenos de cadeia aberta sem a necessidade de metabolismo hepático para ativação e sim por decomposição química no pH fisiológico (TSANG et al., 1991; JEAN-CLAUDE et al., 1998; ARROWSMITH et al., 2002). A temozolomida parece possuir menos toxicidade e espectro de ação antitumoral mais amplo que a mitozolomida (FRIEDMAN et al., 2000). A mitozolomida alquila o DNA por uma cloroetilação (MIDDLETON, MARGISON, 2003) e não metilação como faz a MTIC.

O berenil (Figura 14a) constitui um triazeno que apresenta ampla atividade

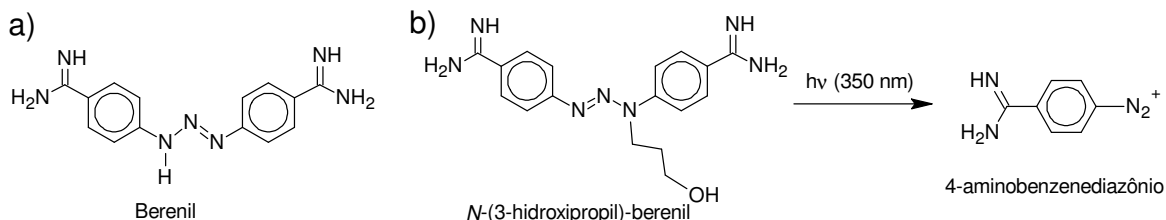


Figura 14 – a) Estrutura química da molécula do berenil. b) Estrutura química do análogo do berenil, o 3-hidroxipropil-1,3-bis-(4-amidinofenil)triazeno ou *N*-(3-hidroxipropil)-berenil que através de uma fotodegradação gera o composto 4-amidinobenzenodiazônio, ao qual foi atribuída a atividade de clivagem do DNA pBR322. $h\nu$: luz ultravioleta.

biológica. Essa molécula é usada para babesiose canina, sendo ativa contra o parasita *Babesia canis rossi* por interferir na glicólise aeróbica e também na sua síntese do DNA (ARIYIBI et al., 2001; BARCELO et al., 2001). Ele é capaz de inibir uma enzima isolada de fígado de ratos, leveduras e *Escherichia coli*, considerada alvo primário de agentes quimioterápicos, a S-adenosil-L-metionina (AdoMet) descarboxilase, sendo portanto, útil em desordens proliferativas como o câncer (MUKHOPADYAY, MADHUBALA, 1995).

O berenil também possui atividade contra *Leshmania donovani* ao inibir essa mesma enzima (MUKHOPADYAY, MADHUBALA, 1995), e por inibir a síntese do DNA, possui atividade contra o protozoário *Trypanosoma rhodesiense* (FARRELL et al., 1987). Análogos do berenil contendo furanos possuem atividades contra infecções *in vivo* de *Pneumocystis carinii* e *Cryptosporidium parvum* (REDDY et al., 1999). O conjugado platina(II)-berenil possui boa atividade contra células leucêmicas humanas HL60 e U-937 (REDDY et al., 1999). Um análogo do berenil, o N-(3-hidroxipropil)-berenil (Figura 14b e Tabela 1), recentemente apresentou a propriedade de clivagem do DNA plasmidial na presença de luz (BURR et al., 2003).

O mecanismo de ação do berenil foi, recentemente, melhor elucidado (PILCH et al., 1995) e sua ação como agente antitripanossômico tem sido atribuída pela ligação nas regiões ricas em pares de bases A-T dos ácidos nucléicos. Essa ligação ocorre via complexação no sulco menor dos domínios A-T do DNA fita dupla. Ele pode se ligar ao DNA e ao RNA duplex, exibindo propriedades características de intercalação e ligação no sulco menor do DNA. Esta ligação desenrola a superenovelagem negativa do DNA plasmidial e também interfere na atividade de enzimas topoisomerases tipo II de eucarióticos (PORTUGAL, 1994). Também foi reportada a inibição da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase da membrana, dependente da concentração do berenil, assim como a sua ligação secundária dentro do DNA nos sítios ricos em bases G+C (ARIYIBI et al., 2001).

Shealy et al. (1966) também relataram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos triazenos, contra fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* e bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei*. A atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de triazenoimidazóis também foi demonstrada e é citada em uma revisão (SHEALY, 1970). Mais recentemente, uma nova classe de triazenos, os hidroxitriazenos, mostraram possuir atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, como *Streptococcus faecalis* e

Staphylococcus aureus, e contra fungos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, “*Sporotrichum schenckii*” (hoje *Sporothrix schenckii*), *Tricophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus* (GOSWAMI, PUROHIT, 2001). Além dessas, diariltriazenos substituídos mostraram atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas e gram-negativas (MICHELOT et al., 2006). Os compostos 1-(4-etóxfenil)-3-(4-carbóxfenil)triazeno e 1,3-bis-(4-acetiloximafenil)triazeno inibiram a multiplicação de *Oerskovia* sp. e *Staphylococcus aureus* ATCC25923, respectivamente, enquanto que o composto 1,3-bis-(trifluorometilfenil)triazeno inibiu as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus* sp., *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Oerskovia* sp. (MICHELOT et al., 2006).

Existem ainda as combilexinas, isto é, moléculas que exibem modos de ligação ao DNA distintos, pois combinam diferentes subunidades ligadas e que podem ser estudadas para adaptar propriedades farmacológicas de suas subunidades, podendo mostrar atividade como inibidoras de topoisomerasas e potenciais novas e melhores drogas anticancerígenas (BAILLY, CHAIRES, 1998). Uma combilexina constituída de acridina-triazeno (Figura 15) exhibe uma preferência maior para sítios ricos em bases AT do que para bases CG, sendo cerca de 40 vezes mais citotóxica que as subunidades triazeno ou acridina sozinhas contra leucemia L1210 em ratos e contra uma linhagem celular de câncer de colo uterino tipo A2780 (MCCAUNAUGHIE, JENKINS, 1995).

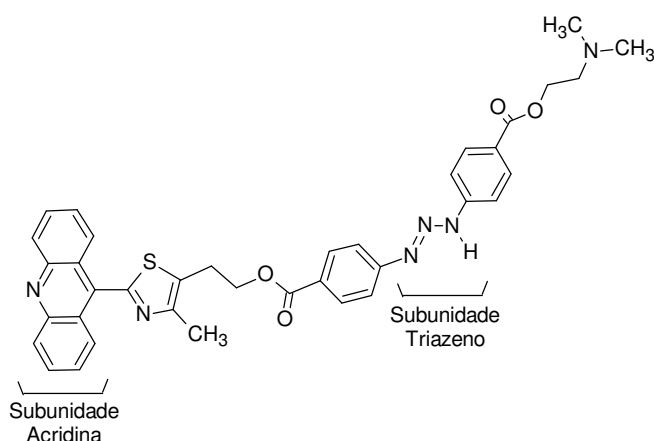


Figura 15 – Estrutura química da combilexina acridina-triazeno.

2.3.1 Recente atividade de clivagem do DNA por compostos triazenos

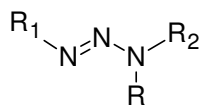
Como já citado anteriormente, uma grande quantidade de drogas exibem efeitos antitumorais por efetivarem a clivagem do DNA levando a apoptose celular (GONZALEZ et al., 2001; MIZUTANI et al., 2002). Recentemente, esta propriedade de clivagem do DNA por compostos triazenos foi relatada (BURR et al., 2003; HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006). Na Tabela 1 estão listados alguns triazenos avaliados quanto à capacidade de clivar o DNA plasmidial fita dupla. Hörner (HÖRNER, 2003), no Brasil, foi quem primeiro avaliou a atividade de clivagem por sete compostos triazenos em sua tese de doutorado, sendo que três deles apresentaram esta atividade: 1,3-bis-(4-carbóxfenil)-triazeno (**1**); 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno (**2**); 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido (**3**) (Tabela 1).

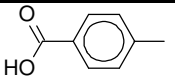
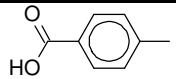
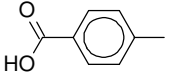
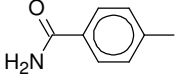
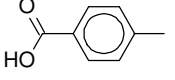

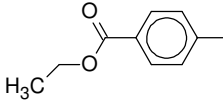
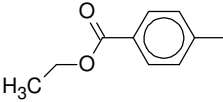
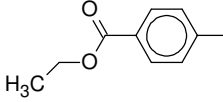
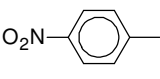
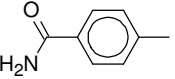
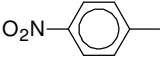
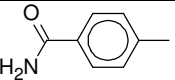
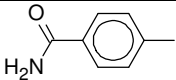
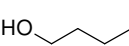
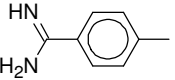
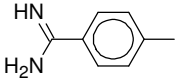
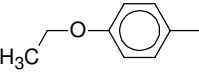
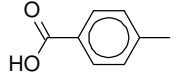
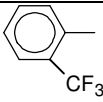
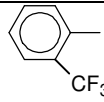
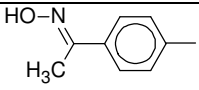
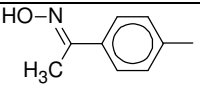
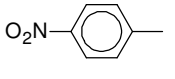
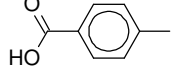
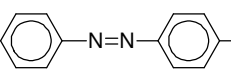
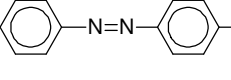
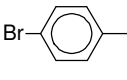
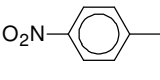
O composto 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno (**13**) (PARAGINSKI et al., 2006) da Tabela 1 é o mesmo **T4** do estudo em questão, assim como o 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil) (**14**) (HÖRNER et al., 2005) é o mesmo **T2**, e suas atividades haviam sido publicados, juntamente com outros triazenos, pelo nosso grupo de pesquisa. A porcentagem total de clivagem do DNA efetuada pelos compostos **1**, **2** e **3** em pH 8,0 é apresentada na Tabela 2. Os compostos **8** (BURR et al., 2003) e **9** (PARAGINSKI et al., 2006), que também foram aptos de clivar o DNA plasmidial, não possuem % de clivagem relatada, por isso, não estão incluídos na Tabela 2.

Os compostos triazenos **1**, **2**, **3** e **9** parecem clivar o DNA por um mecanismo hidrolítico, a presença de seqüestradores de radicais livres (glicerol, DMSO e tiouréia) não afetou a clivagem do DNA plasmidial. Porém, o composto **8** possui um mecanismo oxidativo, pois necessita de luz ultravioleta, durante a incubação com o DNA, para que ocorra a clivagem.

Titulação espectrofotométrica foi realizada com os compostos **1** e **2** (HÖRNER, 2003), permitindo o cálculo da constante de ligação intrínseca (K_b) e indicando um possível mecanismo de interação com o DNA. A interação destes com o DNA é do tipo eletrostática de repulsão de ânions através do grupamento carboxílico ($-\text{COOH}$) do 4-carbóxfenil ligado ao triazeno.

Tabela 1 – Estruturas químicas dos compostos triazenos testados quanto à clivagem do DNA.



| | Nome Químico | R | R ₁ | R ₂ | Cli. ^a | Referência |
|----|---|---|---|---|-------------------|---------------------------|
| 1 | 1,3-bis-(4-carbóxfenil)triazeno | H |  |  | Sim | (HÖRNER, 2003) |
| 2 | 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)triazeno | H |  |  | Sim | (HÖRNER, 2003) |
| 3 | 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido | ←O |  |  | Sim | (HÖRNER, 2003) |
| 4 | 1,3-bis-(4-etiloxicarbanilfenil)triazeno | H |  |  | ∅ ^b | (HÖRNER, 2003) |
| 5 | 1-(4-etiloxicarbanilfenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (HÖRNER, 2003) |
| 6 | 1-(4-amidofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (HÖRNER, 2003) |
| 7 | 1,3-bis-(4-amidofenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (HÖRNER, 2003) |
| 8 | 3-hidroxiopropil-1,3-bis-(4-amidinofenil)-triazeno |  |  |  | Sim | (BURR et al., 2003) |
| 9 | 1-(4-etóxfenil)-3-(4-carbóxfenil)triazeno | H |  |  | Sim | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 10 | 1,3-bis-(2-trifluorometilfenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 11 | 1,3-bis-(4-acetiloxima)triazeno | H |  |  | ∅ | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 12 | 1-(4-nitrofenil)-3-(4-carbóxfenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (HÖRNER, 2003) |
| 13 | 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 14 | 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | ∅ | (HÖRNER et al., 2005) |

^a Cli. = Clivagem do DNA fita dupla; ^b ∅ = não cliva o DNA.

Tabela 2 – Porcentagem de clivagem do DNA apresentada pelos compostos 1, 2 e 3 nas condições citadas, em pH 8,0.

| Composto e condições (concentração, tipo de DNA plasmidial, temperatura e tempo de incubação) | Clivagem total do DNA (pH 8,0) |
|--|---------------------------------------|
| 1 , 1,88 mM, DNA pBEND, 50 °C, 24 horas | 90 % |
| 2 , 1,88 mM, DNA pBSKII, 50 °C, 24 horas ^a | 70 % |
| 3 , 3,75 mM, DNA pBSKII, 50 °C, 24 horas ^b | 65,7 % |

^a diluído com água, pois quando diluído com etanol, não houve clivagem; ^b concentração maior que de 1 e 2. Composto 1: 1,3-bis-(4-carbóxfenil)-triazeno; Composto 2: 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno; Composto 3: 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido.

2.4 Atividade Antibacteriana

Um dos maiores problemas de Saúde Pública, enfrentados nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar devido ao maior uso dos antibacterianos. Muitas cepas bacterianas, principalmente hospitalares, que antes eram sensíveis a maioria dos fármacos rotineiramente utilizados na clínica, atualmente possuem resistência a todos ou quase todos os fármacos disponíveis no mercado (resistência adquirida). Isto é a chamada resistência à múltiplas drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistance*). Atualmente, cepas com diferenciados fatores de virulência e promovendo infecções com alta mortalidade são isoladas de infecções comunitárias, constituindo assim, um novo e preocupante perfil.

Essa resistência exacerbada pode ter ocorrido devido a uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos durante a década passada (LEVY, MARSHALL, 2004). Coincidindo com esse aumento da MDR, as indústrias têm diminuído cada vez mais as pesquisas em busca de novos agentes antibacterianos, devido a diversos fatores: perda de produtividade industrial, competição com o mercado de medicamentos genéricos e outras pressões sobre os preços dos fármacos, mercado abarrotado e confuso e consolidação industrial (PROJAN, SHLAES, 2004).

Esta multirresistência tem ocorrido, sobretudo, com bactérias gram-negativas.

Nestas bactérias gram-negativas, a MDR deve-se, principalmente, a três mecanismos conhecidos: cepas produtoras da enzima beta-lactamase de espectro ampliado (do inglês *ESBL*, *extended-spectrum beta-lactamase*) (PATERSON, BONOMO, 2005), cepas produtoras da enzima Metallo-beta-lactamase (do inglês *MβL*, Metallo-beta-lactamase) (WALSH et al., 2005) e as cepas que possuem o gene AmpC (HANSON, 2003) o qual confere a produção de uma beta-lactamase diferente das outras duas.

Em síntese, as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) (PATERSON, BONOMO, 2005) são enzimas capazes de degradar antibacterianos que possuem o anel beta-lactâmico, como ceftazidina, cefepima. As metallo-beta-lactamases (MβL) são enzimas as quais a atividade depende de íons divalentes (usualmente zinco) como co-fator, e que degradam todos os antibacterianos beta-lactâmicos comercialmente disponíveis, com exceção do aztreonam, um monobactâmico (BUSH, 1998; WALSH et al., 2005). Já a resistência mediada pelo gene cromossômico AmpC confere a produção de outra beta-lactamase, a qual degrada antibacterianos beta-lactâmicos, com exceção de cefepima, cefpirona e os carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) (HANSON, 2003; REISBIG et al., 2003).

A atividade antibacteriana para fármacos, produtos naturais e sintéticos pode ser avaliada por diferentes metodologias. A metodologia mais empregada é a de Microdiluição em Caldo, recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos disponíveis comercialmente (CLSI, 2003), a qual é adaptada para o tipo de produto o qual se quer avaliar. A CIM é definida como a menor concentração do produto capaz de inibir a multiplicação bacteriana (ação bacteriostática). A partir da CIM, pode-se determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é a menor concentração capaz de matar a bactéria (ação bactericida). Geralmente, as concentrações testadas para produtos sintéticos puros ou fármacos variam em uma faixa de 0,25 a 512 µg/ml (CLSI, 2003).

2.5 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (TAS)

Artemia salina L. (Artemiidae) é um camarão invertebrado que vive em habitat aquático de ecossistemas de água salgada ou marinha. Ele pode ser usado no bioensaio laboratorial para determinar a toxicidade pela estimativa da Concentração Letal Média (LC₅₀) (LEWAN et al., 1992), a qual tem sido usada para avaliar a toxicidade de toxinas, extratos de plantas, efluentes industriais e domésticos, toxinas fúngicas e substâncias químicas (HARWIG, SCOTT, 1971; VANHAECKE et al., 1981; MEYER et al., 1982; HARTL, HUMPF, 2000; GUERRA, 2001). Existe uma correlação entre a toxicidade geral da *Artemia salina* e a citotoxicidade frente a linhagens de células humanas tumorais (MACLAUGHLIN, 1991). A avaliação da toxicidade dos triazenos pela metodologia que utiliza *Artemia salina* não tem sido reportada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, equipamentos e acessórios

Todos os reagentes e solventes utilizados nesta pesquisa foram de grau analítico e usados sem purificação prévia, e são comercialmente disponíveis.

3.1.1 Clivagem do DNA, mecanismo de clivagem e titulação espectrofotométrica UV-Vis

Reagentes: Ampicilina, brometo de etídio, caldo Luria Bertani (LB), ágar Luria Bertani (LB), piperazine ácido *N,N'*-bis(2-etanosulfônico) (Pipes), tris(hidroximetil)-aminometano.HCl (Tris.HCl), sal sódico de bromofenol, RNase, ácido bórico, glicerol, lisozima, metileno-bis-acrilamida, SDS foram obtidas do USB. Agarose foi obtida da Invitrogen. Cloreto de cálcio e ácido acético glacial foram obtidos da Chemco. Hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, uréia, metanol, etanol, isopropanol, isopentanol, D-glicose, acetato de sódio trihidratado, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Vetec. Sulfato de magnésio foi obtido da Nuclear. Tiouréia foi obtida da Merck. Água destilada foi purificada pela passagem através de um sistema de purificação Millipore e esterilizada por autoclavação. Reagentes para a análise de clivagem do DNA preparadas de acordo com técnicas de esterilidade padrões.

Equipamentos e acessórios: centrífuga Excelsior, centrífuga para microtubos *eppendorff*, pHmetro, estufas bacteriológicas, pipetas automáticas (0,1-10; 5-40; 40-200; 200-1000 µl), espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível UV-1650PC, forno microondas, autoclave, balança analítica, capela de fluxo laminar Labconco Class 2B, freezer -20 °C, geladeira, *Shaker* de incubação, pipetas, falcons, erlenmeyers, béquers, balões volumétricos, tubos de ensaio, microtubos *eppendorffs*, placas de Petri, provetas.

3.1.2 Atividade antibacteriana

Reagentes: caldo Mueller-Hinton, ágar Mueller-Hinton, NaCl, ágar MacConkey, glicerol, caldo tríptico de soja (TSB), NaCl, água destilada e água Milli-Q, ácido cítrico.

Equipamentos e acessórios: estufas bacteriológicas, pipetas automáticas de volume variável (0,1-10; 5-40; 40-200; 200-1000 µl), espectrofotômetro Baush & Lomb, autoclave, balança analítica, forno microondas, capela de fluxo laminar Labconco Class 2B, freezer -20 °C, geladeira, pipetas, erlenmeyes, béquers, balões volumétricos, tubos de ensaio, microtubos *ependorffs*, alça de platina, fio de platina, tubos de ensaio, algodão.

3.1.4 Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach.

Reagentes: bicarbonato de sódio, azida de sódio, cloreto de sódio, ácido cítrico, água destilada.

Instrumentação: incubador de cistos de *Artemia salina*, aerador de aquário, balança analítica, tubos de ensaio, pipeta de Pasteur, placas de Petri, pipetas automáticas, pipetas volumétricas, provetas.



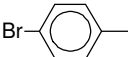
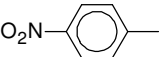
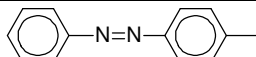

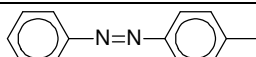
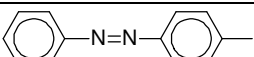


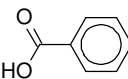
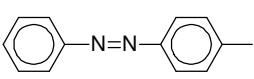
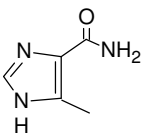
3.2 Compostos trizenos utilizados

Foram testados para atividades de clivagem do DNA, antibacteriana e toxicidade frente *Artemia salina* 6 compostos trizenos sintetizados no laboratório de Química Inorgânica pelos mestrandos e doutorandos orientados pelo Professor Doutor Manfredo Hörner do Programa de Pós Graduação em Química. Esses compostos foram caracterizados previamente aos estudos efetuados nesta

dissertação. Além desses, foi testado o medicamento antitumoral dacarbazina (Asercit[®]), por este ser um composto triazeno e não ter um mecanismo ainda totalmente esclarecido (DACARB, 2007). Este medicamento, testado para a atividade antibacteriana e toxicidade frente *Artemia salina*, foi industrializado pelo Laboratório Filaxis (Argentina), importado e distribuído no Brasil pelo Laboratório Ítaca. A Tabela 3 mostra as estruturas químicas dos compostos sintetizados e da dacarbazina.

Tabela 3 – Estruturas químicas dos compostos triazenos utilizados neste estudo de clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente *Artemia salina* e seus respectivos nomes químicos.

$$\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ N \\ \diagup \\ N \\ \diagdown \\ N \\ \diagup \\ R_2 \\ | \\ R \end{array}$$

| | Nome Químico | R | R ₁ | R ₂ |
|-----------|---|-----------------|--|---|
| T1 | 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-N-hidróxido | OH |  |  |
| T2 | 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  |
| T3 | 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  |
| T4 | 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno | H |  |  |
| T5 | 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno | H |  |  |
| T6 | 1-(4-carbóxiifenil)-(3-azofenil)-triazeno | H |  |  |
| | Dacarbazina – Asercit [®] (DTIC, 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida) | CH ₃ |  | CH ₃ |

A partir daqui, os compostos triazenos sintetizados são referidos como **T1**, **T2**, **T3**, **T4**, **T5** e **T6** devido a mais fácil designação do que seus nomes químicos completos. O medicamento Asercit[®] é comercializado na forma de pó (200 mg de dacarbazina) em frasco-ampola contendo os excipientes ácido cítrico (200 mg) e manitol (100 mg).

3.3 *Screening* de clivagem do DNA plasmidial pelos triazenos T1 a T6

O ensaio *screening* para verificar a clivagem dos ácidos nucléicos foi desenvolvido com plasmídios pBSKII e pUC18. Primeiramente, foi feita a transformação das bactérias (inserção do plasmídio) para posterior extração desse DNA. Esses plasmídios foram inseridos nas células bacterianas de *E. coli* cepa DH5 α pelo método de cloreto de cálcio gelado. Após a transformação, a bactéria foi cultivada em ágar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 μ g/ml). Sendo que os plasmídios conferem resistência a ampicilina, somente as bactérias contendo o plasmídio crescem neste meio.

Para extração do DNA, as bactérias foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 μ g/ml). O DNA superenovelado (pBSKII e pUC18) foi extraído de acordo com procedimentos padrões (AUSUBEL et al., 1995), pela técnica de lise alcalina. O DNA extraído foi analisado quanto à pureza através de leituras espectrofotométricas UV-Vis a 260 e 280 nm, sendo que uma razão de absorvância entre esses comprimentos de onda de 1,9 a 2,0 indica que o DNA está suficientemente livre de proteínas (AUSUBEL et al., 1995). A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de extinção molar de 50 μ g/ml (1 A_{260}) (AUSUBEL et al., 1995).

Para o ensaio *screening* de clivagem, em um volume final de 20 μ l, os seguintes reagentes foram adicionados em microtubos *ependorffs*: 1 μ g de DNA plasmidial (pBSKII ou pUC18), e diferentes concentrações finais dos compostos testados **T1** ao **T6** (3,75; 1,875; 1,25; 0,75 and 0,375 mM), a pH 6,0 (200 mM tampão Pipes), 7,0, 7,5 ou 8,0 (200 mM tampão Tris.HCl). As soluções foram incubadas nas estufas a 37 e 50 $^{\circ}$ C por 24 horas, e, se necessário, os microtubos foram armazenados a -20 $^{\circ}$ C até a análise por eletroforese em gel de agarose. Os triazenos foram dissolvidos em etanol:água 1:1.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, com aplicação de uma voltagem de 50-70 V por 2-3 horas, utilizando tampão de corrida TBE 0,5X (TBE 10X: 0,89 M Tris.HCl pH 8,0, 0,89 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) (AUSUBEL et al., 1995). 4 μ l de solução *loading buffer* (tampão de leitura), composto de Tris.HCl 50 mM, glicerol 50 % e azul de bromofenol 0,01 %, foram

adicionados a cada microtubo previamente a eletroforese. Neste tampão, o Tris.HCl tem a função de tamponamento, o glicerol ajuda a dar a densidade para que a amostra seja aplicada ao gel e o azul de bromofenol permite a visualização da corrida a olho nu pela cor azul. O DNA foi visualizado por adição de brometo de etídio (10 mg/ml) ao gel de agarose (2 µg/ml) (AUSUBEL et al., 1995). As bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador UV a 312 nm, fotografadas usando uma máquina fotográfica digital e quantificadas usando o programa de computador Scion Image Beta 4.03 (Scion Corp.).

A clivagem do DNA é verificada por relaxamento do DNA superenovelado (forma I) dos plasmídios para as formas circular aberta (forma II) e linear (forma III). Quando o plasmídio circular aberto é submetido à eletroforese, a migração mais rápida pode ser observada da forma superenovelada. Se uma fita do DNA fita dupla é clivada, o superenovelamento se desfaz relaxando para a forma circular aberta, de mobilidade eletroforética mais lenta. Se ambas as fitas são clivadas, a forma linear é gerada, e esta, tem migração eletroforética intermediária, ou seja, entre as formas superenovelada e circular aberta (Figura 3, na revisão bibliográfica) (MACÍAS et al., 2005). Para reações envolvendo o DNA superenovelado, foi usado um fator de correção de 1,42 para calcular a quantidade total, devido a capacidade de intercalação do brometo de etídio ser menor nesta forma de plasmídio (HEGG, BURSTYN, 1996). As quantidades relativas das diversas formas de DNA (I, II e III) foram determinadas por divisão da intensidade fluorescente de uma banda em particular pela soma total das intensidades das bandas de cada linha. A porcentagem total de clivagem foi calculada com sendo [% de aumento forma II + 2 (% de aumento da forma III)] sabendo-se que há ao menos dois eventos de clivagem para passar da forma I para a forma III do DNA plasmidial (SCHNAITH et al., 1994; BLACKBURN, GAIT, 1996; HEGG, BURSTYN, 1996), quando esta forma aparece.

Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.4 Mecanismo de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno T1

Para verificar o mecanismo de clivagem pelo triazeno **T1**, foram usados seqüestradores de radicais livres (SCHNAITH et al., 1994; FREY et al., 1996; HEGG,

BURSTYN, 1996; REN et al., 2000; ROSSI et al., 2002; HÖRNER, 2003; SCARPELLINI et al., 2003; DAS et al., 2005) (tiouréia 40 mM, glicerol 0,1 e 1 % e dimetilsulfóxido 40 mM) na condição do ensaio *screening* a qual houve maior clivagem (Tris.HCl pH 8,0, 50 °C), no entanto, não foram utilizados os dois plasmídios, mas somente pUC18. Além do mais, somente a maior concentração do triazeno **T1** (3,75 mM) foi usada, devido a reação de clivagem ser mais eficiente e permitir melhor visualização da interferência dos seqüestradores de radicais livres. Reações em atmosfera de argônio também foram realizadas com o propósito de verificar a clivagem na ausência de oxigênio atmosférico. Para este ensaio, brevemente após a adição de **T1**, argônio foi instilado aos microtubos *ependorffs*, os quais foram selados e incubados a 50 °C, de acordo com metodologia descrita (HORN JR. et al., 2005).

Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.5 Titulação espectrofotométrica UV/Vis DNA-triazeno T1

As medidas espectrofotométricas foram realizadas a temperatura ambiente (22 ± 1 °C) em 30 mM tampão Pipes (pH 6,5) e 30 mM tampão Tris.HCl (pH 7,0 e 8,0). Os espectros UV-Vis foram medidos em um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1650PC na faixa de comprimento de onda 190-590 nm.

3.6 Atividade antibacteriana dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit®)

3.6.1 Bactérias utilizadas

As bactérias utilizadas foram cepas *American Type Culture Collection (ATCC)* e cepas provenientes de isolados clínicos do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Entre as bactérias provenientes do HUSM, estão aquelas com mecanismos de resistência diversos, incluindo as multirresistentes sem um determinado

mecanismo. Esses mecanismos de resistência são:

- bactérias que possuem *ESBL*
- bactérias que possuem *MβL*
- bactérias que possuem resistência mediada pelo gene cromossômico *AmpC*,

As bactérias usadas para análise antibacteriana dos triazenos **T1** a **T6** e da dacarbazina estão listadas nas Tabela 4 e 5. O perfil de resistência foi determinado pela mestranda Cláudia de Mello Bertoncheli em sua pesquisa de mestrado.

Tabela 4 – Bactérias gram-positivas utilizadas na análise antibacteriana dos compostos triazenos **T1** a **T6** e da dacarbazina (*Asercit*[®]) e suas características.

| Bactérias Gram-Positivas | Característica |
|---|------------------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Isolado clínico |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Isolado de hemocultura |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Isolado de hemocultura |
| <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> | Isolado clínico |
| <i>Micrococcus</i> sp. | Isolado clínico |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | Isolado clínico |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (β-hemolítico) | Isolado clínico |
| <i>Oerskovia</i> sp. | Isolado clínico |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Isolado clínico |
| <i>Rhodococcus</i> sp. | Isolado clínico |
| <i>Bacillus cereus</i> | Isolado de endocardite |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Isolado clínico |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Isolado clínico |
| <i>Corynebacterium</i> sp. | Isolado clínico |
| | ATCC |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 14579 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 15313 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | ATCC 7468 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC 12228 |

Tabela 5 – Bactérias gram-negativas utilizadas na análise antibacteriana dos compostos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit[®]) e suas características.

| Bactérias Gram-Negativas | Característica |
|--------------------------------|--|
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Isolado clínico |
| <i>Shigella flexneri</i> | Isolado clínico |
| <i>Salmonella</i> sp. | Isolado clínico |
| <i>Serratia marcescens</i> | Isolado clínico |
| <i>Escherichia coli</i> (EPEC) | Isolado clínico |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Isolado clínico |
| <i>Salmonella typhi</i> | Isolado clínico |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | M-R sensível somente ao Imipenem |
| <i>Raulstonia pickettii</i> | Isolado clínico |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Isolado clínico |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Isolado clínico |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> | Isolado clínico |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | M-R sensível somente ao Imipenem (cepa 84) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ESBL (cepa 23) |
| <i>Escherichia coli</i> | ESBL (cepa 32) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | ESBL (cepa 14) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | ESBL (cepa 75) |
| <i>Proteus mirabilis</i> | ESBL (cepa 8) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | MβL (cepa 13) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | MβL (cepa 15) |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | MβL (cepa 21) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | MβL (cepa 11) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | MβL (cepa 14) |
| <i>Serratia marcescens</i> | AmpC |
| <i>Citrobacter freundii</i> | AmpC (cepa 7) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | AmpC (cepa 8) |
| | ATCC |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | ATCC 10708 |

M-R: multirresistente. EPEC: *E. coli* enteropatogênica clássica.

3.6.2 Microdiluição em Caldo

Para avaliação da atividade antibacteriana, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (2003), antigo *National Committee for Clinical, Laboratory Standards (NCCLS)*.

Os ensaios foram realizados em triplicata com séries de diluições de cada composto em placas estéreis com 96 poços. Foi empregado controle positivo de crescimento para cada bactéria (inóculo, caldo Mueller-Hinton), controle negativo (caldo Mueller-Hinton, composto) para descartar alguma possível contaminação nos compostos e controle do solvente, para avaliar a atividade do etanol sobre as bactérias.

Os triazenos **T1** a **T6** foram inicialmente solubilizados em etanol, e adicionadas aos poços de modo que ficassem diluídas a dez diferentes concentrações na razão de 2 (128 a 0,25 µg/ml). A dacarbazina foi dissolvida em água estéril de modo que as concentrações testadas fossem as mesmas dos triazenos **T1** a **T6**. Essas concentrações são igualmente as preconizadas pelo CLSI para alguns medicamentos antibacterianos.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de bactérias ativadas, as quais foram repicadas em ágar Mueller-Hinton com 18-24 horas de antecedência, em solução salina e ajustado com uso de espectrofotômetro para a escala 0,5 de MacFarland, a qual corresponde a 1×10^8 UFC/ml (a leitura do inóculo foi ajustada para 0,08 a 0,1 de absorbância no comprimento de onda 625 nm contra o branco). Após a aplicação do composto, a suspensão bacteriana foi inoculada nas nos poços da placa de modo que a concentração bacteriana final fosse de 5×10^5 UFC/ml, como preconiza o CLSI (2003).

As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18-24 horas. Após este período, a leitura das CIMs foi feita utilizando-se como revelador o corante enzimático cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio diluído a 2 % em água e autoclavado. Este corante é incolor e se torna avermelhado em meios reduzidos, como aqueles em que houve a multiplicação bacteriana, ou seja, a CIM foi visualizada como sendo inibição do crescimento em 80 % ou mais (CLSI, 2003), comparado visualmente com a cor avermelhada do controle positivo.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da CIM. Para isto foram realizados repiques a partir dos poços onde houve inibição para placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton. A ausência de crescimento bacteriano indicou que o composto foi bactericida na concentração testada.

3.7 Toxicidade dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (TAS)

A metodologia empregada foi uma adaptação da metodologia de Vanhaecke et al. (1981), a qual serve para avaliar a toxicidade de extratos de plantas, substâncias químicas e efluentes. Para determinar a toxicidade dos compostos triazenos **T1** a **T6** e da dacarbazina frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach., 50 mg de cistos de *A. salina* foram incubados em uma câmara de incubação com água contendo NaCl (60 g/l), a temperaturas entre 24 e 30 °C (MEYER et al., 1982). O pH foi ajustado para aproximadamente 9 pela adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, 1,0 g/l), para evitar morte das larvas de *A. salina* por decréscimo no pH durante a incubação (LEWAN et al., 1992). Após 24 horas, as larvas fototrópicas foram separadas e contadas usando uma pipeta de Pasteur. Para os compostos testados, foram usadas cinco concentrações (em triplicata) para determinar a relação dose-resposta, e grupos controles foram ajustados com os solventes usados para as diluições. As concentrações finais testadas foram 50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 µg/ml. Soluções dos triazenos **T1** a **T6** e da dacarbazina foram preparadas em etanol e água, respectivamente. Além disso, foram realizados controles com ácido cítrico e manitol, excipientes da dacarbazina. Todos os tubos com amostras contiveram 10 larvas, incluindo os dos grupos controle, e foram ajustados para o volume total de 5 ml com a mesma solução de incubação. Após 24 horas, as larvas vivas e mortas foram contadas e a concentração letal média (CL₅₀) foi estimada usando o método estatístico dos Probitos (FINNEY, 1971) utilizando um programa de computador.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* de clivagem do DNA plasmidial pelos triazenos T1 a T6

A atividade de clivagem pelos compostos 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**), 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**T2**), 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**T3**), 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno (**T4**), 1,3-bis-(2-bromofenil) (**T5**) e 1-(4-carbóxi-fenil)-3-(4-azofenil)triazeno (**T6**) sobre os DNAs pUC18 e pBSKII foi estudada em diferentes condições: diferentes concentrações finais (3,75, 1,875, 1,25, 0,75 e 0,375 mM), diferentes pHs (6,5, 200 mM tampão PIPES; 7,0, 7,5 e 8,0, 200 mM tampão Tris.HCl), nas temperaturas de 37 e 50 °C por 24 horas de incubação.

Os compostos triazenos **T2** a **T6**, não apresentaram atividade de clivagem nas condições testadas. O triazeno **T1** foi o único capaz de clivar o DNA plasmidial. A Figura 16 mostra os resultados para clivagem nas diferentes condições. **T1** clivou eficientemente o DNA superenovelado (forma I) para o DNA circular aberto (forma II) a 50 °C, a pH 8,0 (Tris.HCl) com cerca de 50 %, como quantificado por densitometria das bandas após a eletroforese em gel de agarose. Assim, as reações para verificar o mecanismo foram desenvolvidas neste pH e temperatura. A passagem da forma II para a forma III não ocorreu significativamente. A reação de clivagem dos DNAs pelo triazeno **T1** na concentração de 3,75 mM foi de 23 e 24 % para pUC18 e pBSKII + Pipes pH 6,5, respectivamente, 31 e 30 % para pUC18 e pBSKII + Tris.HCl pH 7,0, respectivamente, 36 e 37 % para pUC18 e pBSKII + Tris.HCl pH 7,5, respectivamente, 50 e 46 % para pUC18 e pBSKII + Tris.HCl pH 8,0, respectivamente.

Um resumo da clivagem total na maior concentração testada (3,75 mM) é apresentado na Tabela 6. A porcentagem total de clivagem do DNA foi calculada após quantificação das bandas do DNA com a ajuda do programa Scion Image (Scion Corp.). Para o cálculo da porcentagem total de clivagem foi usada a equação $[(\% \text{ de aumento da forma II}) + 2 (\% \text{ de aumento da forma III})]$ (SHNAITH et al., 1994; BLACKBURN, GAIT, 1996; HEGG, BURSTYN, 1996).

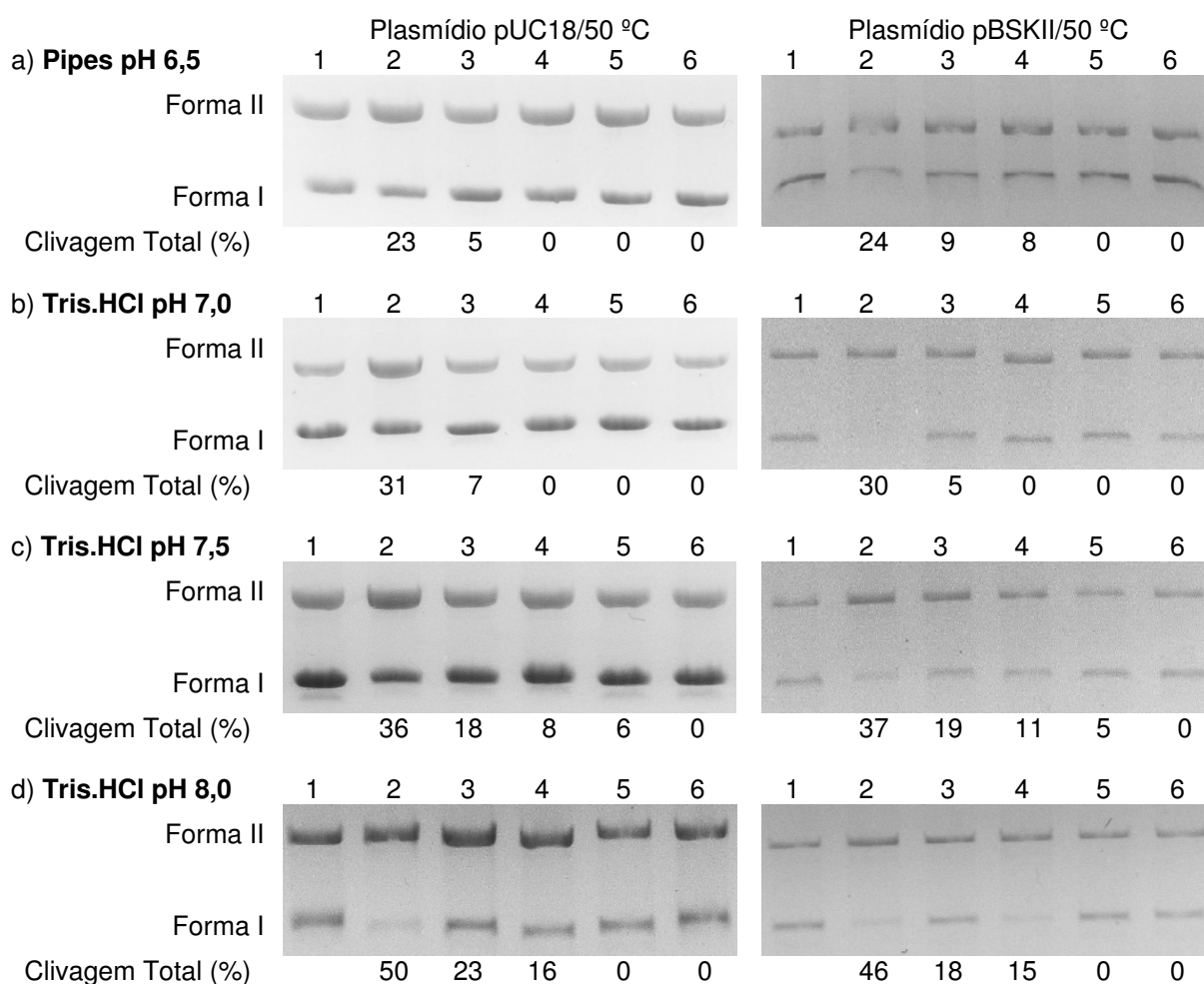


Figura 16 – Porcentagem de clivagem do DNA superenovelado (forma I) para circular aberto (forma II) pelo composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) em diferentes condições: a) Tampão Pipes 200 mM pH 6,5, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; b) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 7,0, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; c) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 7,5, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII; d) Tampão Tris.HCl 200 mM pH 8,0, à esquerda, pUC18, à direita, pBSKII. Em todos: linha 1, somente DNA; linha 2, DNA + 3,75 mM de **T1**; linha 3, DNA + 1,88 mM de **T1**; linha 4, DNA + 1,25 mM de **T1**; linha 5, DNA + 0,75 mM de **T1**; linha 6, DNA + 0,375 mM de **T1**; todas as reações foram realizadas a 50 °C/24 h.

Tabela 6 – Porcentagem de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno **T1** a 3,75 mM, nos diferentes pHs testados a 50 °C/24 h.

| Tampão | Plasmídeo pUC18 | Plasmídeo pBSKII |
|-----------------|-----------------|------------------|
| Pipes pH 6,5 | 23 % | 24 % |
| Tris.HCl pH 7,0 | 31 % | 30 % |
| Tris.HCl pH 7,5 | 36 % | 37 % |
| Tris.HCl pH 8,0 | 50 % | 46 % |

4.2 Mecanismo de clivagem do DNA plasmidial pelo triazeno T1

Alguns exemplos (BURR et al., 2003; HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006) de triazenos que possuem atividade de nuclease artificial através de mecanismos oxidativo ou hidrolítico são descritos na literatura. Em vista disso, para revelar a natureza das espécies reativas envolvidas na clivagem do DNA, as reações de clivagem foram realizadas na presença de conhecidos seqüestradores de radicais hidroxil (HO[•]) glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tiouréia (Figura 17).

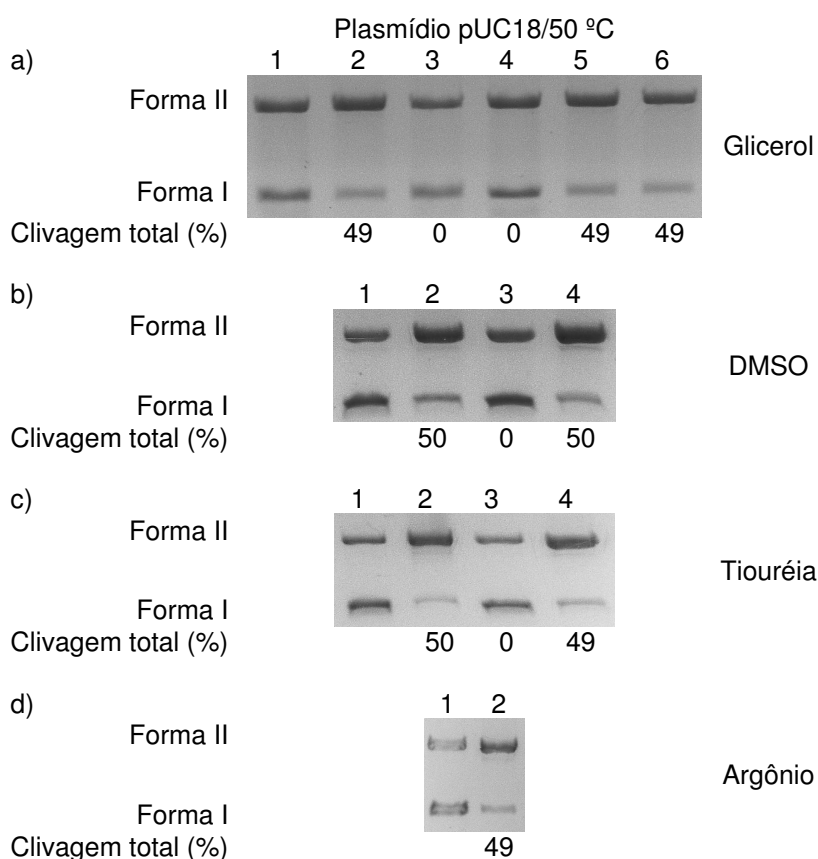


Figura 17 – Atividade de clivagem do DNA plasmidial pelo composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) sob diferentes condições para verificar o mecanismo. a) Linha 1, somente plasmídeo pUC 18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1**; linhas 3-4, plasmídeo pUC18 + glicerol 0,1 e 1,0 %, respectivamente; linhas 5-6, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1** + glicerol 0,1 e 1,0 %, respectivamente. b) Linha 1, somente plasmídeo pUC18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1**; linha 3, plasmídeo pUC18 + DMSO 40 mM; linha 4, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1** + DMSO 40 mM. c) Linha 1, somente plasmídeo pUC18; linha 2, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1**; linha 3, plasmídeo pUC18 + tiouréia 40 mM; linha 4, plasmídeo pUC18 + 3,75 mM de **T1** + tiouréia 40 mM. d) Linha 1, plasmídeo pUC18 + argônio; linha 2, plasmídeo pUC 18 + argônio + 3,75 mM de **T1**. Todas as reações foram incubadas a pH 8,0 (Tris.HCl 200 mM) a 50 °C/24 h.

Como pode-se observar, os seqüestradores não inibiram as reações de clivagem. Isto sugere que radicais HO[•] difusíveis não estão envolvidos nesta reação. Também foram desenvolvidas reações de clivagem em atmosfera de argônio para eliminar a presença de ar atmosférico. A clivagem do DNA pUC18 pelo composto **T1** em atmosfera de argônio não foi diminuída indicando que o ar atmosférico não é um fator essencial para a clivagem do DNA por este composto. Em conclusão, os resultados apresentados indicam que a reação ocorre provavelmente por um mecanismo hidrolítico, assim como outros compostos triazenos citados na literatura (HÖRNER, 2003).

Outros triazenos citados também foram capazes de clivar eficientemente o DNA: 1,3-bis-(4-carbóxfenil)-triazeno (**1**) (HÖRNER, 2003); 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno (**2**) (HÖRNER, 2003); 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido (**3**) (HÖRNER, 2003); 1-(4-etóxfenil)-3-(4-carbóxfenil)triazeno (**9**) (PARAGINSKI et al., 2006). Na Tabela 7 pode-se visualizar uma comparação entre os triazenos **T1**, **1**, **2** e **3** que foram analisados de forma semelhante.

Tabela 7 – Comparação da atividade dos triazenos que clivam o DNA.

| Composto | % de clivagem a pH 8,0 | Inibição da clivagem | | | | Religação com T ₄ -DNA ligase |
|-----------|------------------------|----------------------|------|----------|---------|--|
| | | Glicerol | DMSO | Tiouréia | Argônio | |
| T1 | 50 (3,75 mM) | - | - | - | - | NE |
| 1 | 90 (1,88 mM) | - | - | 10 % | - | NR |
| 2 | 70 (1,88 mM) | - | - | - | - | NR |
| 3 | 65,7 (3,75 mM) | - | - | - | - | NR |

T1: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido; **1**: 1,3-bis-(4-carbóxfenil)-triazeno; **2**: 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno; **3**: 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido. NE: ensaio não efetuado. NR: não houve religação. Observação: O composto (**2**) foi dissolvido em água e etanol, sendo que a clivagem ocorreu somente com o composto dissolvido em água.

Na Tabela 7 podemos verificar que o composto **1**, entre os quatro citados, foi o que apresentou maior % de clivagem (90 %). Além disso, todos foram mais ativos em pH 8,0 (tampão Tris.HCl/50 °C/24 h), e os seqüestradores de radicais livres testados (glicerol, DMSO e tiouréia) não inibiram a clivagem com exceção da inibição de 10 % pela tiouréia, efetuada pelo composto **2**. A utilização da atmosfera de argônio (anaerobiose) não inibiu a clivagem em nenhum dos compostos, indicando que a presença de oxigênio não é necessária. Teste de religação dos

DNAs clivados pelos compostos **1**, **2** e **3** com a enzima T₄-DNA ligase foram efetuados e mostraram que os fragmentos não foram religados, indicando provavelmente que eles não são capazes de regeneração catalítica, possivelmente permanecendo covalentemente ligados aos terminais 5'-OPO₃ ou 3'-OH do DNA (HÖRNER, 2003).

Outro composto triazeno publicado em 2003, análogo ao berenil constitui o N-(3-hidroxipropil)-1,3-bis-(4-amidinofenil)triazeno (**8**), já citado na revisão. Ele foi capaz de clivar o DNA plasmidial pBR322 na presença de luz por 5 minutos a 4 °C (mecanismo oxidativo). A clivagem foi atribuída a um subproduto da fotólise de **8**, o 4-amidinobenzenodiazônio **8a** (Figura 14). O composto **8**, em estudos de footprinting e de ligação, mostrou forte preferência por sítios ricos em bases A-T, assim como o berenil.

Outros compostos triazenos encontrados na literatura que não foram aptos de clivar o DNA (Tabela 1, na introdução) são representados por: 1,3-bis-(4-etiloxicarbanilfenil)triazeno (**4**) (HÖRNER, 2003); 1-(4-etiloxicarbanilfenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**5**) (HÖRNER, 2003); 1-(4-amidofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**6**) (HÖRNER, 2003); 1,3-bis-(4-amidofenil)triazeno (**7**) (HÖRNER, 2003); 1,3-bis-(2-trifluorometilfenil)triazeno (**10**) (PARAGINSKI et al., 2006); 1,3-bis-(4-acetiloxima)triazeno (**11**) (PARAGINSKI et al., 2006); 1-(4-nitrofenil)-3-(4-carbóxifenil)triazeno (**12**) (PARAGINSKI et al., 2006); 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno (**14**) (HÖRNER et al., 2005). Apesar destes compostos não apresentarem atividade de nuclease, esses resultados são importantes, pois nos permitem fazer uma comparação estrutural com aqueles que clivaram o DNA. O composto 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno (**13**) (PARAGINSKI et al., 2006) da Tabela 1 (na revisão bibliográfica) é o mesmo **T4** desse estudo, assim como o 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil) (**14**) (HÖRNER et al., 2005) é o mesmo **T2**, e haviam sido publicados, juntamente com outros triazenos, pelo nosso grupo de pesquisa.

Sreedhara & Cowan (2001) afirmam que a conversão do DNA superenovelado para forma linear é usualmente atribuída a clivagens fita dupla específicas, que não ocorrem ao acaso. Assim, esta eficiente clivagem ocorre entre 12 a 16 pares de base do segmento do DNA fita dupla. Portanto, uma molécula que cliva a fita dupla do DNA deve cortá-lo pelo menos duas vezes para transformação da FI em FIII. Os compostos **1**, **3**, **8** e **9** constituem exemplos de clivadores específicos que foram aptos de formar a FIII. Esta clivagem do DNA fita dupla é

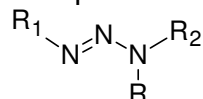
consideravelmente importante, uma vez que são mais significantes para a morte celular do que as quebras de fitas simples (DETMER III et al., 1996; DETMER III et al., 1997), devido a dificuldade de reparo desse DNA. Por isso, aqueles compostos que clivam a fita dupla possuem maior importância do que aqueles que clivam a fita simples, seja para sua utilização como nucleases sintéticas, como uma droga ou para estudos de mecanismos de reparo do DNA.



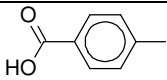
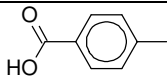
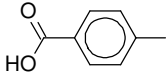
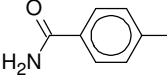
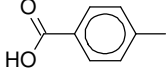

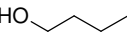
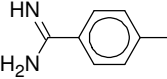
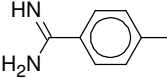
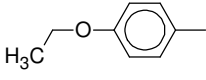
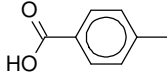
4.2.1 Análise estrutura-atividade para a clivagem do DNA

O triazeno **1** foi mais ativo que o **2** quanto à clivagem dos DNAs testados (90 e 70 %, respectivamente, de clivagem a 1,88 mM). Isto nos permite supor, analisando a relação estrutura-atividade, que a presença de um grupamento 4-carbóxfenil, ligado ao núcleo fundamental triazeno é responsável pela atividade de clivagem do DNA enquanto o 4-amidofenil não possui atividade. Isto é visualizado, sabendo-se que o **1** possui dois grupamentos 4-carbóxfenil e o **2** possui apenas um, além do grupamento 4-amidofenil. Isto é melhor comprovado pelo fato do composto **7** não apresentar clivagem do DNA, sendo que este possui dois grupamentos 4-amidofenil nas extremidades do triazeno. O composto **3** que apresenta um grupamento 4-carbóxfenil, uma fenila e um óxido (o qual reverte para hidroxila em solução aquosa), foi menos ativo (65,7 % de clivagem a 3,75 mM), que os compostos **1** e **2**. Portanto, a presença da fenila e do óxido, no N3 do triazeno diminuem a atividade de clivagem. O composto **9** foi outro composto que apresentou atividade de clivagem, sendo que este apresenta, além do grupamento 4-carbóxfenil, um grupamento 4-etóxfenil. Na Tabela 8 pode-se visualizar as estruturas desses compostos. Esses quatro compostos parecem ter um mecanismo hidrolítico para a clivagem do DNA (HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006), já o composto **8** parece ter um mecanismo oxidativo, devido possuir pouca atividade quando as reações são realizadas na ausência de luz. Porém, quando este sofre fotólise, gerando o fotoproduto **8a**, a clivagem do DNA é muito bem evidenciada, gerando inclusive a FIII do DNA (BURR et al., 2003). Além do mais, a reação de clivagem do DNA feita por **8a** é aumentada quando o ensaio é realizado na presença de luz, diferentemente de quando é realizado na ausência dela (BURR et al., 2003). Além do mais, pode-se concluir que somente a presença da hidroxila, além de dois

grupamentos fenila ligados ao triazeno, é suficiente para que ocorra a clivagem do DNA plasmidial como o acontece com o **T1**.

Tabela 8 – Estruturas químicas dos compostos triazenos aptos a clivar o DNA.

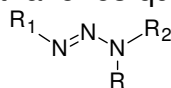


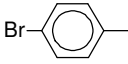
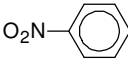
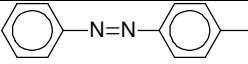
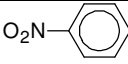
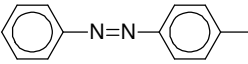
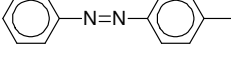
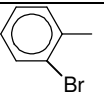
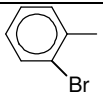
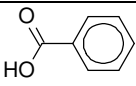
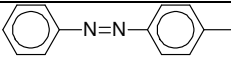
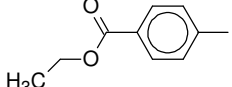
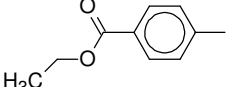
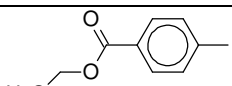
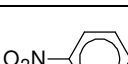
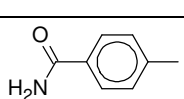
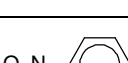
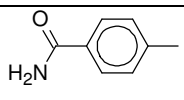
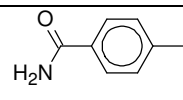
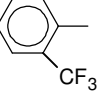
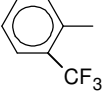
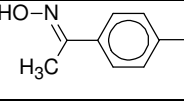
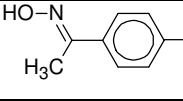
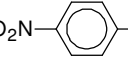
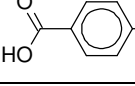
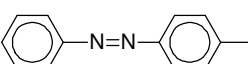
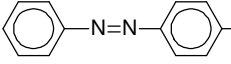
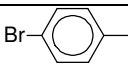
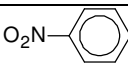
| | Nome Químico | R | R ₁ | R ₂ | Referência |
|-----------|--|---|---|---|---------------------------|
| T1 | 1,3-bis-(fenil)-triazeno-1- <i>N</i> -hidróxido | OH |  |  | - |
| 1 | 1,3-bis-(4-carbóxfenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 2 | 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 3 | 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido | ←O |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 8 | 3-hidroxiopropil-1,3-bis-(4-amidinofenil)-triazeno |  |  |  | (BURR et al., 2003) |
| 9 | 1-(4-etóxfenil)-3-(4-carbóxfenil)triazeno | H |  |  | (PARAGINSKI et al., 2006) |

Duas outras evidências importantes da análise de relação estrutura-atividade é que os triazenos que apresentam em suas extremidades um grupamento 4-nitrofenil ou 4-azofenil e um grupamento 4-carbóxfenil não mostram atividade de clivagem do DNA, como é o caso do composto **12** e do **T6**, respectivamente (Tabela 9). Já que compostos triazenos que apresentam o grupamento 4-carbóxfenil tiveram sucesso na clivagem de DNA, pode-se inferir que a presença de um grupamento 4-nitrofenil possa inibir a ligação inicial do composto triazeno ao DNA, conseqüentemente inibindo a clivagem.

Enfim, os grupamentos que parecem não ter importância para a clivagem do DNA fita dupla quando juntos, de acordo com as evidências dos testes já realizados, são os seguintes (Tabela 9): 4-bromofenil e 4-nitrofenil (**T2** e **14**), 4-azofenil e 4-nitrofenil (**T3**), 4-azofenil (**T4** e **13**), 2-bromofenil (**T5**), 4-carbóxfenil e 4-azofenil (**T6**), 4-etiloxicarbanilfenil (**4**), 4-etiloxicarbanilfenil e 4-nitrofenil (**5**), 4-amidofenil e 4-nitrofenil (**6**), 4-amidofenil (**7**), 2-trifluorometilfenil (**10**), 4-acetiloxima (**11**), 4-nitrofenil e 4-carbóxfenil (**12**).

Tabela 9 – Estruturas químicas dos triazenos que não são aptos de clivar o DNA.



| | Nome Químico | R | R ₁ | R ₂ | Referência |
|-----------|---|---|--|---|---------------------------|
| T2 | 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | - |
| T3 | 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | - |
| T4 | 1,3-bis-(azofenil)triazeno | H |  |  | - |
| T5 | 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno | H |  |  | - |
| T6 | 1-(4-carbóxifenil)-3-(4-azofenil)-triazeno | H |  |  | - |
| 4 | 1,3-bis-(4-etiloxicarbanilfenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 5 | 1-(4-etiloxicarbanilfenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 6 | 1-(4-amidofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 7 | 1,3-bis-(4-amidofenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 10 | 1,3-bis-(2-trifluorometilfenil)triazeno | H |  |  | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 11 | 1,3-bis-(4-acetiloxima)triazeno | H |  |  | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 12 | 1-(4-nitrofenil)-3-(4-carbóxifenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER, 2003) |
| 13 | 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno | H |  |  | (PARAGINSKI et al., 2006) |
| 14 | 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno | H |  |  | (HÖRNER et al., 2005) |

Observação: os compostos **T2** e **14**, assim como o **T4** e o **13**, são os mesmos.

Como podemos constatar, o composto **8**, publicado por Burr et al. (2003), induziu a modificação e a clivagem do DNA por uma mecanismo oxidativo (fotoclivagem). Assim, não se pode descartar a possibilidade de clivagem do DNA

por compostos triazenos por esse mecanismo. Além do mais, esses compostos são relativamente sensíveis a degradação fotolítica e catiônica H^+ (relativa a pH ácido) (NIFONTOV et al., 1994). Porém, a clivagem por mecanismo oxidativo não é atualmente de grande interesse dos pesquisadores.

4.3 Titulação espectrofotométrica UV/Visível DNA-triazeno T1

Espectrofotometria de absorção eletrônica é universalmente empregada para determinar as características de ligação de compostos com o DNA. Por isso, foi realizada a titulação espectrofotométrica do composto **T1** com quantidades crescentes de DNA plasmidial. O triazeno **T1** ($9,38 \mu\text{M}$) foi titulado com solução de DNA plasmidial fita dupla pUC18 a pHs 6,5 (35 mM tampão Pipes) 7,0 e 8,0 (35 mM tampões Tris.HCl). Os dados espectrais foram analisados dentro de uma faixa de comprimento de onda de 190 a 590 nm (Figuras 18 a 20).

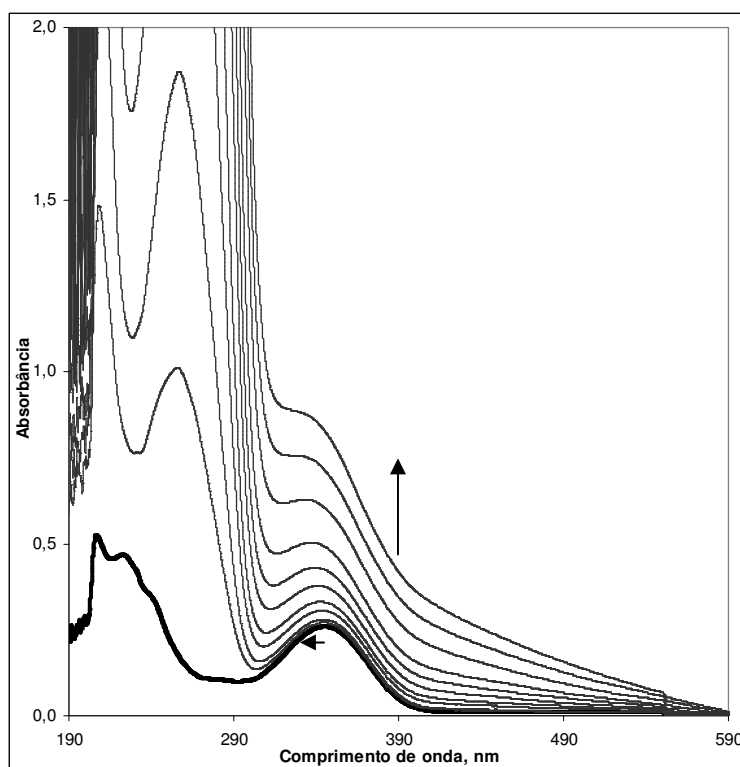


Figura 18 – Hiperromismo do composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) sob adições de DNA plasmidial fita dupla (pUC18) em pH 6,5 (tampão Pipes 35 mM). A absorbância foi monitorada como uma função do aumento da concentração do DNA. $9,38 \mu\text{M}$ de **T1** na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 240, 336,

480, 720, 960 e 1200 μM de nucleotídeos (linhas 2-11) resultou em um aumento da absorvância (hipercromismo): λ_{max} de **T1** sozinho, 344,9 nm; λ_{max} de **T1**-ligado ao DNA, 342,4 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\text{max}} = 2,5$ nm (linha 0-5).

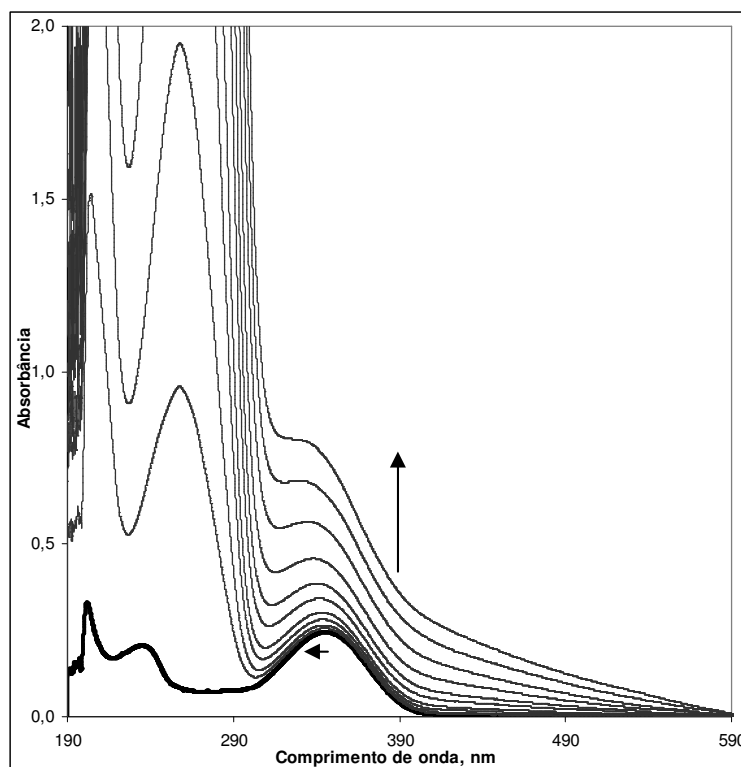


Figura 19 – Hipercromismo do composto 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) com a adição de Dna plasmidial fita dupla em pH 7,0 (tampão Tris.HCl 35 mM). A absorvância foi monitorada como uma função do aumento da concentração do DNA. 9,38 μM de **T1** na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 240, 336, 480, 720, 960 e 1200 μM de nucleotídeos (linhas 2-11) resultou em um aumento da absorvância (hipercromismo): λ_{max} de **T1** sozinho, 345,2 nm; λ_{max} de **T1**-ligado ao DNA, 343,0 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\text{max}} = 2,2$ nm (linha 0-5).

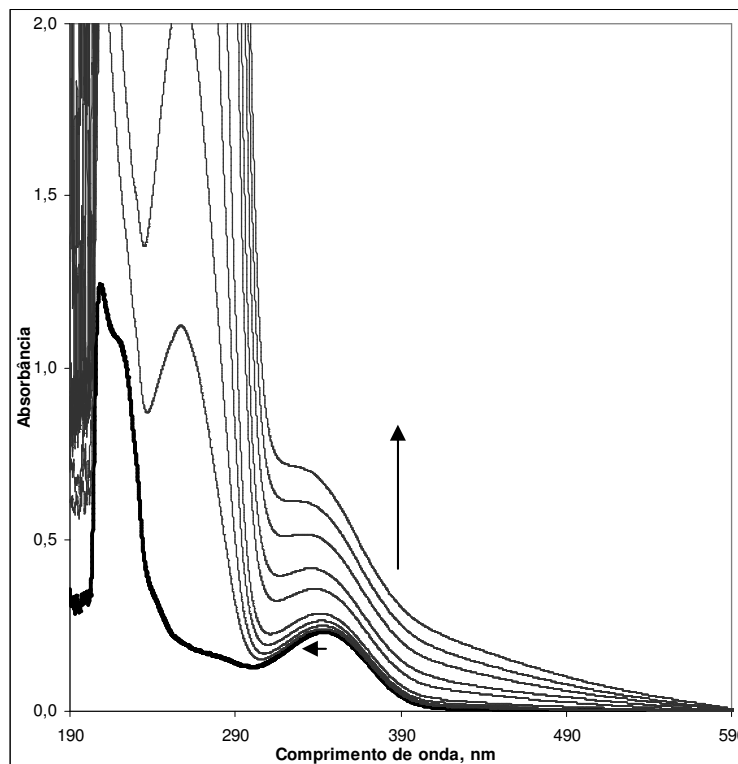


Figura 20 – Hiper Cromismo de 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (**T1**) com a adição de DNA plasmidial fita dupla (pUC18) em pH 8,0 (tampão Tris.HCl 35 mM). A absorbância foi monitorada como uma função do aumento da quantidade de DNA. 9,38 μM de **T1** na presença de 0 (linha espessa), 24, 48, 96, 144, 336, 480, 720, 960 e 1200 μM nucleotídeos (linhas 2-10) resultou em um aumento da absorbância (hipercromismo): λ_{max} de **T1** sozinho, 343,4 nm; λ_{max} de **T1**-ligado ao DNA, 341,0 nm (linha 5); $\Delta\lambda_{\text{max}} = 2,4$ nm (linha 0-5).

A ligação de moléculas que se intercalam ao DNA é classicamente caracterizada através de titulações espectrofotométricas de absorção no ultravioleta-visível, utilizando-se uma solução do composto e quantidades crescentes de DNA nesta solução. Para essas moléculas intercalantes, ocorre hipocromismo (diminuição do coeficiente de extinção molar do composto) e um batocromismo (desvio para o vermelho) (MAHADEVAN, PALANIANDAVAR, 1998; MUDASIR et al., 2007). A intercalação (LIU et al., 1999; LIU et al., 1999; ZHEN et al., 2000) causa esse hipocromismo devido a uma forte interação de empilhamento entre o grupo cromóforo aromático e os pares de bases do DNA. A magnitude deste hipocromismo e desvio para o vermelho depende comumente da força de interação intercalativa (LIU et al., 1999). Por outro lado, um hiper cromismo (aumento da absorvidade molar) e um hipsocromismo (desvio para o azul) pode indicar que o tipo de interação não seja por intercalação, mas por interação eletrostática de repulsão de ânions

(HÖRNER, 2003), assim como acontece com outros triazenos capazes de clivar o DNA plasmidial.

Os espectros (Figuras 18 a 20) mostram claramente que a adição de DNA pUC18 resultou em hipercromismo e pequeno desvio para o azul da banda do triazeno **T1**. Essas características espectrais são atribuídas ao modo de ligação que pode ser por interação eletrostática de repulsão de ânions e ligações de hidrogênio com o DNA, assim como os triazenos 1,3-bis-(4-carbóxfenil)-triazeno (**2**); 1-(4-carbóxfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno (**3**); 3-(4-carbóxfenil)-1-feniltriazeno-1-óxido (**4**) (HÖRNER, 2003). O hipercromismo pode ocorrer devido à interação de acoplamento dipolo-dipolo entre os anéis aromáticos fenil do triazeno **T1** e os sulcos do DNA, assim como ocorrem com outras moléculas que possuem anéis aromáticos, como a benzidina ($\text{NH}_2\text{-Ar-Ar-NH}_2$, onde Ar representa os anéis aromáticos serapados) (AMUTHA et al., 2001). Além do mais, o hipercromismo aumenta com a elevação do pH, o que pode ser verificado pelo aumento do valor da constante de ligação (K_b) (abaixo).

A constante de ligação intrínseca, K_b , pode ser determinada pelos dados das titulações espectrais e a seguinte equação (PYLE et al., 1989)

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_B - \epsilon_f)$$

onde ϵ_A , ϵ_f , e ϵ_B correspondem a $A_{\text{observada}}/[\mathbf{T1}]$, ao coeficiente de extinção molar do triazeno livre e ao coeficiente de extinção molar do triazeno na forma completamente ligada, respectivamente. Plotando $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$, K_b é dado pela razão da inclinação pelo coeficiente linear (intersecção com y).

Os valores de K_b (Tabela 10) são menores que aqueles observados para típicos intercalantes (brometo de etídio-DNA, $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ em tampão Tris.HCl 40 mM, pH 7.9, e $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ em tampão NaCl-25 mM Tris-HCl 40 mM; proflavina com DNA de *Escherichia coli*, 50% GC, $4.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ em Tris.HCl 0,1 M) com um modo de ligação ao DNA comprovado pela completa inserção das moléculas planares entre os pares de bases. Isto indica que a ligação da molécula de **T1** com o DNA possui uma afinidade menor que dos intercalantes clássicos.

Tabela 10 – Constantes de ligação intrínsecas (K_b) compostos-DNA à 25 °C.

| Composto (condições) | K_b (M^{-1}) |
|---|---|
| Brometo de Etídio (pH 7,9, Tris.HCl 40 mM) | 7×10^7 |
| Brometo de Etídio (NaCl 40 mM-Tris-HCl 25 mM) | $1,4 \times 10^6$ |
| 1 (pH 5,5, MÊS) | $1,7 \times 10^4$ |
| 1 (pH 6,7, Pipes) | $9,1 \times 10^3$ |
| 1 (pH 8,0, Tris. HCl) | $5,5 \times 10^3$ |
| T1 (pH 6,5, Pipes 35 mM) | $4,50 \times 10^1$ |
| T1 (pH 7,0, Tris.HCl 35 mM) | $1,00 \times 10^2$ |
| T1 18 (pH 8,0, Tris.HCl 35 mM) | $2,33 \times 10^2$ |

1: 1,3-bis-(4-carbóxfenil)triazeno; **T1**: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido.

A intercalação é um importante modo de interação com o DNA, pois causa um alongamento da estrutura dupla hélice (DOUTHART et al., 1973) e, também, pode torcer ou dobrar o DNA, desempilhando um ou mais pares de bases adjacentes juntamente com o alongamento e desenrolamento local do DNA (BISCHOFF, HOFFMANN, 2002). Essa ligação ao DNA fita dupla é capaz de inibir vários processos biologicamente importantes, como a síntese de DNA e a transcrição e tradução gênicas (BÜGS, CORNÉLIO, 2001; BISCHOFF, HOFFMANN, 2002). A intercalação de moléculas aromáticas planares no DNA e a inibição das DNA polimerases I e/ou II são consideradas importantes para a ação terapêutica de muitos agentes antitumorais (BAILLY, 2000; DEMEUNYNCK et al., 2002). A inibição da regulação do DNA representa uma importante consequência da modificação da estrutura do DNA devido a intercalação (BISCHOFF, HOFFMANN, 2002). Apesar das drogas intercalantes possuírem potenciais atividades farmacológicas como antiviral, antibiótica e imunomodulatória (MARX, 1987; WERNER et al., 1996; SNYDER, 1998), apenas um número limitado de intercalantes (tipo acridinas) são usadas como drogas antitumorais (DENNY, 1989; BAGULEY, 1991; MÜLLER et al., 1998).

Como pode ser observado, apesar dos valores de K_b serem baixos, eles aumentam com a elevação do pH. Valores altos de K_b estão associados à interação hidrofóbica de anéis aromáticos com as bases do DNA (intercalação) (MAHADEVAN, PALANIANDAVAR, 1998). Quando esses valores são baixos, isto

pode indicar que a interação de **T1** com o DNA possa ser por interação eletrostática de repulsão de ânions nos sulcos do DNA (MA et al., 2007) levando posteriormente a clivagem do DNA. Isto é suportado pelo fato de que **T1** pode formar ligações de hidrogênio através dos grupamentos NNN(OH). A pH 6,5 (Pipes 35 mM), o valor de K_b foi o mais baixo ($4,50 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$), exatamente quando a clivagem do DNA foi menor. Assim, acredita-se que os íons H^+ presentes no meio permitam que os grupamentos NNN(OH) do triazeno **T1** permaneçam. Porém, quando se aumenta o pH do meio contendo o composto e o DNA, o valor da K_b também aumenta ($1,00 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a Tris.HCl 35 mM pH 7,0 e $2,33 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a Tris.HCl 35 mM pH 8,0), indicando que a interação também aumenta, embora pouco, ao mesmo tempo em que a clivagem do DNA também aumenta. A pH 8,0, quando o meio contém OH^- em excesso, os grupamentos NNN(O^-) do triazeno **T1** fazem interação com os grupos OPO_3^- do DNA efetuando a repulsão eletrostática favorecendo o mecanismo hidrolítico.

Não podemos descartar que a interação dos anéis aromáticos seja importante, pois a maioria dos intercalantes do DNA são moléculas cromóforas aromáticas planares, geralmente tri ou tetracíclicas (ANTONINI et al., 1997), como os compostos brometo de etídio (brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridínio), laranja de acridina (cloreto de 3,6-bis-(dimetil)acridínio) e azul de metileno (cloreto de 3,7-bis-(dimetilamino)fenotrazin-5-io) que se ligam ao DNA e RNA de modo intercalativo deslizando entre as bases adjacentes e causando um alongamento da estrutura dupla hélice (DOUTHART et al., 1973).

O valor do K_b a pH 8,0 é cerca de 5 vezes maior que a pH 6,5, e ainda assim, cerca de 300.000 vezes menor que o do intercalante clássico brometo de etídio. Outra observação importante é que esses valores de K_b foram obtidos a partir da titulação espectrofotométrica a temperatura ambiente ($22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), ou seja, em uma temperatura na qual não ocorre clivagem do DNA pelo triazeno **T1**. Assim, os valores de K_b devem ser maiores a temperatura na qual ocorre a clivagem o DNA plasmidial ($50 \text{ }^\circ\text{C}$).

O hipsocromismo (desvio para o azul) foi de 2,5, 2,2 e 2,4 nm a pH 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente, quando comparado λ_{max} do triazeno **T1** na presença de 0 e 144 μM de pares de bases de DNA.

Estudos de titulação espectrofotométrica também foram realizados com os compostos **1** e **2** (HÖRNER, 2003). Os estudos com o composto **1** foram realizados

em pHs 5,5, 6,7 e 8,0 a fim de se verificar que tipo de interação com o DNA. Isso também permitiu calcular a K_b para **1**, nos pHs citados, as quais foram 5543 M^{-1} (pH 8,0), 9068 M^{-1} (pH 6,7) e 17204 M^{-1} (pH 5,5). Os estudos de titulação espectrofotométrica mostraram predomínio de hipercromismo com posterior hipsocromismo, concluindo que há interação com o DNA. Valores altos de K_b indicam que a interação do composto com o DNA seja por intercalação. No entanto, as K_b calculadas indicam que o triazeno **1** não interage com o DNA por intercalação, porém, os tipos de interação são: interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos do triazeno com as bases do DNA e a interação eletrostática de repulsão entre os grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) e os grupos OPO_3^- do esqueleto do DNA. Podemos concluir que o valor de K_b varia inversamente proporcional ao pH para essa molécula, ou seja, há diminuição de K_b com o aumento do pH, indicando aumento das cargas negativas, diminuição da interação hidrofóbica com o DNA e aumento da interação eletrostática de repulsão entre os íons carboxilato e os grupos fosfato do DNA, coerente com a maior clivagem no pH ajustado para 8,0. A titulação espectrofotométrica do triazeno **2** com sucessivas adições de pBSKII, mostrou hipercromismo e sua K_b calculada foi de 17047 M^{-1} .

Assim, pode-se afirmar que os triazenos, de modo geral, possuem um mecanismo de interação com o DNA diferente da intercalação, pois assim como o triazeno **T1** do estudo em questão, os triazenos **1** e **2** também elevam o seu coeficiente de extinção molar quando se adiciona DNA a solução (hipercromismo). O local de interação dos triazenos pode ser do lado externo dos sulcos do DNA, assim como o berenil atua. A interação eletrostática e/ou pontes de hidrogênio é sugerida como modo de ligação do berenil ao DNA, através de seus grupamentos amidino carregados positivamente (PORTUGAL, WARING, 1987). Porém, estudos posteriores são necessários para confirmar tipo de interação do triazeno **T1**.

4.4 Atividade antibacteriana dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit[®])

A atividade antibacteriana dos triazenos T1 a T6 foi avaliada pela metodologia de microdiluição em caldo com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados desta atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo as cepas padrões *American Type Culture Collection (ATCC)*, são mostrados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Os resultados obtidos para o triazeno T3 não são apresentados devido ao encaminhamento dos mesmos para o processo de patente da sua atividade antibacteriana.

Em geral, as triazenos possuem amplo espectro, ou seja, foram ativos tanto para bactérias gram-positivas como para bactérias gram-negativas. Os compostos mais ativos, de um modo geral, foram o 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido (T1), o 1-(4-carbóxfenil)-(3-azofenil)-triazeno (T6) e a dacarbazina (DTIC), sendo que o T1 foi ativo igualmente para bactérias gram-positivas e gram-negativas, os compostos T6 e DTIC foram ativos para todas as bactérias gram-positivas mas menos ativos para gram-negativas. Porém, clinicamente, a DTIC não é usada como medicamento antibacteriano. O composto 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno (T5) teve a atividade menos ampla para bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Controle com excipiente ácido cítrico da dacarbazina (Asercit[®]) foi feito para verificação se este possui atividade frente às seguintes bactérias: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ESBL 32, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella choleraeruis* ATCC 10708. No entanto, verificou-se que o ácido cítrico não possui atividade nas concentrações testadas para nenhuma das bactérias, ou seja, sua CIM é maior que 128 µg/ml.

Tabela 11 – Resultados da atividade antibacteriana para os triazenos avaliados frente à bactérias gram-positivas.

| Bactérias Gram-Positivas | CIM/CBM ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|---|------------------------------|-------|----|-------|-------|--------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | DTIC |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 32/128 | 64/- | | 128/- | -/- | 16/- | 16/128 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> (hemocultura) | 64/- | -/- | | -/- | -/- | 32/- | NT |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 64/- | -/- | | 128/- | -/- | 16/- | 64/128 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> | 64/- | -/- | | -/- | -/- | 32/- | 64/128 |
| <i>Micrococcus</i> sp. | 64/- | 128/- | | 64/- | -/- | 32/- | 128/128 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 32/128 | -/- | | 128/- | -/- | 64/- | 64/64 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (β -hemolítico) | -/- | -/- | | -/- | -/- | 32/- | 64/128 |
| <i>Oerskovia</i> sp. | 64/- | 128/- | | -/- | 128/- | 16/- | NT |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | -/- | -/- | | -/- | -/- | 32/- | NT |
| <i>Rhodococcus</i> sp. | 128/- | -/- | | -/- | -/- | 32/- | 64/- |
| <i>Bacillus cereus</i> (endocardite) | -/- | -/- | | -/- | -/- | 16/128 | 16/- |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 32/64 | -/- | | -/- | -/- | 64/- | 64/128 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 64/- | -/- | | 128/- | -/- | 64/- | NT |
| <i>Corynebacterium</i> sp. | 32/- | 128/- | | 64/- | 128/- | 64/- | NT |
| ATCC | | | | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 | -/- | 128/- | | 128/- | -/- | 16/128 | NT |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 128/- | -/- | | -/- | -/- | 64/- | 64/128 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 32/64 | -/- | | -/- | -/- | 64/- | NT |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468 | 64/- | -/- | | -/- | 64/- | 64/- | 128/128 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | 16/- | 64/- | | 128/- | -/- | 16/- | 16/128 |

T1: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido; **T2:** 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T3:** 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T4:** 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno; **T5:** 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno; **T6:** 1-(4-carbóxfenil)-(3-azofenil)-triazeno; DTIC: Dacarbazina. -: > 128 $\mu\text{g/ml}$. NT: não testado. Entre parênteses: número ou característica da cepa, local de isolamento ou tipo de resistência. Os resultados obtidos para o triazeno **T3** não são apresentados devido ao encaminhamento dos mesmos para a obtenção de patente sobre a sua atividade antibacteriana.

Tabela 12 – Resultados da atividade antibacteriana para os triazenos avaliados frente à bactérias gram-negativas.

| Bactérias Gram-Negativas | CIM/CBM ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|---|------------------------------|-------|----|-------|-------|-------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | DTIC |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 32/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Shigella flexneri</i> | 64/64 | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Salmonella</i> sp. | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Serratia marcescens</i> | -/- | 64/- | | 64/- | 64/- | -/- | -/- |
| <i>Escherichia coli</i> | -/- | 128/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 128/- | -/- | | 128/- | -/- | -/- | 32/128 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 128/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (M-R) | 128/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Raulstonia pickettii</i> | 32/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | 64/- |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 128/128 | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 128/- | -/- | | -/- | -/- | 128/- | NT |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 128/128 | -/- | | -/- | 128/- | 16/- | 16/- |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> (M-R 84) | 128/128 | -/- | | 128/- | -/- | -/- | 128/- |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ESBL 23) | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Escherichia coli</i> (ESBL 32) | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | 32/- |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> (ESBL 14) | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | -/- |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (ESBL 75) | 128/- | 128/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Proteus mirabilis</i> (ESBL) | 128/- | -/- | | -/- | -/- | 64/- | NT |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (M β L 13) | 128/- | 128/- | | 128/- | -/- | -/- | -/- |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (M β L 15) | 64/- | 128/- | | 64/- | 32/64 | -/- | NT |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (M β L 21) | 32/64 | 64/- | | 64/- | 128/- | 64/- | 128/128 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (M β L 11) | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (M β L 14) | 64/- | -/- | | 128/- | 128/- | -/- | NT |
| <i>Serratia marcescens</i> (AmpC) | 128/- | 128/- | | 128/- | -/- | -/- | -/- |
| <i>Citrobacter freundii</i> (AmpC 7) | 128/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | -/- |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (AmpC 8) | -/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | NT |
| ATCC | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | -/- | 128/- | | -/- | -/- | -/- | -/- |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 128/- | -/- | | -/- | -/- | -/- | 64/128 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 | -/- | -/- | | -/- | -/- | 128/- | 32/- |

T1: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido; **T2:** 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T3:** 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T4:** 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno; **T5:** 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno; **T6:** 1-(4-carbóxi-fenil)-(3-azofenil)-triazeno; DTIC: Dacarbazina. - : > 128 $\mu\text{g/ml}$. NT: não testado. Entre parênteses: número ou característica da cepa, local de isolamento ou tipo de resistência. M-R: multiresistente (no caso, sensível somente ao Imipenem); ESBL: cepa produtora de Beta-lactamase de espectro ampliado; M β L: cepa produtora de Metallo-beta-lactamase; AmpC: cepa com resistência mediada pelo gene AmpC. Os resultados obtidos para o triazeno **T3** não são apresentados devido ao encaminhamento dos mesmos para a obtenção de patente sobre a sua atividade antibacteriana.

As melhores CIM para o composto **T6** frente a bactérias gram-positivas foram de 16 µg/ml para as seguintes bactérias: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Oerskovia* sp. e *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228. A dacarbazina (DTIC) também teve CIM de 16 µg/ml para as seguintes bactérias: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* (isolado de uma endocardite) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228. A atividade bacteriostática e/ou bactericida do composto **T6** (16/128 µg/ml) e da DTIC (16/128 µg/ml) sobre o *B. cereus* é importante devido a esta bactéria gram-positiva formar esporos que são muito resistentes a ação de agentes bactericidas. O composto **T1** também teve CIM de 16 µg/ml para o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Para bactérias gram-negativas os compostos que tiveram atividade mais ampla foram o **T1** e a DTIC (a qual não foi testada para todas as bactérias). Apesar disso, a melhor CIM (16µ/ml) foi evidenciada pelo composto **T6** e pela DTIC para a bactéria *Acinetobacter lwoffii*.

A atividade bactericida, quando evidenciada para os triazenos testados, foi de 1 a 4 concentração(ões) maior(es) que as CIM. As melhores CBM foram de 64 µg/ml para os compostos **T1** (frente *Staphylococcus haemolyticus* e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Shigella flexneri* e *Acinetobacter baumannii* MβL21) e **T5** (frente a *Pseudomonas* sp. MβL15) e para a DTIC (frente a *Staphylococcus saprophyticus*). A dacarbazina foi bactericida para 10 das 12 cepas gram-positivas testadas e para 3 das 8 cepas gram-negativas das quais teve atividade bacteriostática. O composto **T1** foi bactericida para 4 das 15 cepas gram-positivas das quais teve atividade bacteriostática e 5 das 19 cepas gram-negativas das quais teve atividade bacteriostática. A atividade bactericida em medicamentos antibacterianos é de suma importância para aqueles pacientes que estão infectados e possuem uma imunidade deficiente, e também para alguns tipos de infecções graves (MURRAY et al., 2003).

Atividade antibacteriana de triazenos é relatada desde 1966 por Shealy et al.. Estes pesquisadores publicaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de triazenos contra fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* e bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei*. A atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de triazenoimidazóis também foi demonstrada e é citada em uma revisão (SHEALY, 1970). Mais recentemente, uma nova classe de triazenos, os hidroxitriazenos, mostraram possuir atividade

antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e contra fungos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, “*Sporotrichum schenckii*” (hoje *Sporothrix schenckii*), *Tricophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus* (GOSWAMI, PUROHIT, 2001). Além dessas, diariltriazenos substituídos, como os utilizados neste estudo, mostraram atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas e gram-negativas (MICHELOT et al., 2006). Os compostos 1-(4-etóxilfenil)-3-(4-carbóxilfenil)triazeno e 1,3-bis-(4-acetiloximafenil)triazeno inibiram a multiplicação de *Oerskovia* sp. e *Staphylococcus aureus* ATCC25923, respectivamente, enquanto que o composto 1,3-bis-(trifluorometilfenil)triazeno inibiu as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus* sp., *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Oerskovia* sp. (MICHELOT et al., 2006).

4.4.1. Relação estrutura-atividade antibacteriana

A partir dos resultados acima, podemos fazer uma comparação estrutural dos compostos indicando quais grupamentos podem aumentar ou inibir a esta atividade antibacteriana *in vitro*. O composto **T1** que possui um grupamento OH e duas fenilas foi um dos mais ativos. Na literatura, encontra-se que compostos triazenos que possuem a hidroxila (hidroxitriazenos) possuem atividade antibacteriana (GOSWAMI, PUROHIT, 2001). Entre estes compostos, os mais ativos são aqueles que possuem hidroxila, 2-carbóxilfenil e 2-toluil (2-metilfenil) ou 4-toluil (4-metilfenil) para bactérias, e 3-metil e 2,4,6-tribromofenil para fungos (Figura 21).

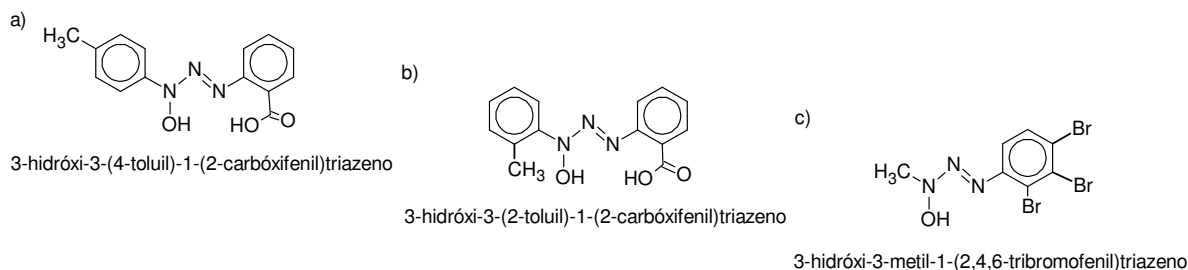


Figura 21: Estruturas químicas de alguns hidroxitriazenos que apresentam atividade antibacteriana e/ou antifúngica (GOSWAMI, PUROHIT, 2001).

Goswami & Purohit (2001) propuseram que a atividade desta classe de compostos possa ser atribuída a propriedade quelante destes com ingredientes da parede celular e impedir a sua síntese. Além do mais, estes autores encontraram atividade somente para bactérias gram-positivas, mas não para gram-negativas.

Além do grupamento hidroxila, outros grupamentos ligados ao triazeno parecem propiciar atividade antibacteriana: 4-carbóxfenil (composto **T6**), metil e imidazol-4-carboxamida (da DTIC). O grupamento 2-bromofenil não parece ser muito promissor em relação a atividade antibacteriana.

4.5 Toxicidade dos triazenos T1 a T6 e da dacarbazina (Asercit[®]) frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (TAS)

Os resultados da toxicidade dos triazenos **T1** a **T6** e da dacarbazina (Asercit[®]) frente à *Artemia salina* são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de CL₅₀ (µg/ml) para os triazenos **T1** a **T6** e para a dacarbazina frente *Artemia salina*.

| Triazeno | CL ₅₀ (µg/ml) | LI (µg/ml) | LS (µg/ml) |
|-------------|--------------------------|------------|------------|
| T1 | 0,081 | 0,073 | 0,089 |
| T2 | 5,935 | 3,912 | 9,741 |
| T3 | 3,431 | 2,308 | 5,630 |
| T4 | 0,216 | 0,191 | 0,245 |
| T5 | 0,076 | 0,065 | 0,087 |
| T6 | 0,077 | 0,070 | 0,084 |
| DTIC | 0,715 | 0,597 | 0,857 |

CL₅₀: concentração letal média; LI: limite inferior; LS: limite superior; **T1**: 1,3-bis-(fenil)triazeno-1-*N*-hidróxido; **T2**: 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T3**: 1-(4-azofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno; **T4**: 1,3-bis-(4-azofenil)triazeno; **T5**: 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno; **T6**: 1-(4-carbóxfenil)-(3-azofenil)-triazeno; **DTIC**: Dacarbazina. ($p < 0.05$)

A Concentração Letal média (CL₅₀) variou entre 0,076 e 5,935 µg/ml para os triazenos testados. Os valores calculados são extremamente baixos, portanto, os triazenos são considerados muito tóxicos. Os triazenos mais tóxicos para *Artemia*

salina foram **T1**, **T5** e **T6** com uma CL_{50} cerca de 10 vezes menor que a dacarbazina, sendo por isso, considerados cerca de 10 vezes mais tóxicos que a dacarbazina. Dados experimentais mostram que existe uma correlação entre a CL_{50} para *Artemia salina* e a Dose Efetiva média (DE_{50}) obtida para linhagens de células tumorais (MACLAUGHLIN, 1991). A CL_{50} para *A. salina* é cerca de 10 vezes maior que sua DE_{50} para células tumorais. Assim, pode-se supor que a dosagem dos triazenos mais tóxicos (**T1**, **T5** e **T6**) para a citotoxicidade é cerca de 10 vezes maior que a citotoxicidade da dacarbazina para linhagens de células tumorais.

Por essa atividade, pode-se também observar que os grupamentos mais tóxicos quando ligados ao núcleo triazeno são: hidroxila (**T1**), 2-bromofenil (**T5**) e 4-carbóxfenil (**T6**). O grupamento azofenil é menos tóxico, devido **T4** apresentar uma CL_{50} cerca de 3 vezes maior que do **T6**.

5 CONCLUSÕES

Os resultados mostram a ampla atividade biológica dos compostos triazenos avaliados.

O triazeno **T1** apresenta clivagem em torno de 50 % do DNA plasmidial (pBSKII e pUC18) na concentração de 3,75 mM, a 50 °C em pH 8,0.

O mecanismo de clivagem do DNA por **T1** parece ser hidrolítico, já que a presença de seqüestradores de radicais hidroxil (glicerol, DMSO e tiouréia) e atmosfera de argônio não interferiram na clivagem, indicando que a presença dos radicais hidroxil e do oxigênio atmosférico não são essenciais para a clivagem do DNA.

Os valores de K_b determinados para o triazeno **T1** são baixos indicando que a intercalação do composto **T1** ao DNA não ocorre. A interação pode ser do tipo eletrostática de repulsão de ânions favorecida a pH 8,0.

Os grupamentos que conferem melhor atividade de clivagem do DNA quando ligados ao triazeno são 4-carbóxfenil e a hidroxila (ou 1-óxido). E ainda, os grupamentos 4-nitrofenil e 4-azofenil parecem ser inibidores da clivagem do DNA.

A atividade antibacteriana mostra que todos os compostos são ativos. Os mais ativos são **T1**, **T6** e a dacarbazina. Os menores valores de CIM/CBM são 16/64 µg/ml. O composto **T1** e a dacarbazina são bastante ativos para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Já o composto **T6** é visivelmente mais ativo para bactérias gram-positivas.

Os grupamentos químicos que conferem melhor atividade antibacteriana são 4-carbóxfenil e 2-metilfenil ou 4-carbóxfenil e 4-metilfenil, e a hidroxila ligado ao triazeno, além dos grupamentos presentes na dacarbazina.

A atividade dos triazenos para *Artemia salina* mostra que todos eles são muito tóxicos, sendo de maior atividade os triazenos **T1**, **T5** e **T6**, ou seja, aqueles que possuem os grupamentos hidroxil, 4-carbóxfenil e 2-bromofenil ligados ao triazeno.

De modo geral, os grupamentos 4-carbóxfenil e hidroxil permitem maior atividade dos triazenos tanto para clivagem, atividade antibacteriana e tóxica para *Artemia salina*.

6 REFERÊNCIAS

- AMUTHA, R.; SUBRAMANIAN, V.; NAIR, B. U. Interaction of benzidine with DNA: experimental and modelling studies. **Chemical Physics Letters** v. 344, p. 40-48, 2001.
- ANTONINI, I. et al. 1-[(omega-aminoalkyl)amino]-4-[N-(omega-aminoalkyl)carbamoyl]-9-oxo-9, 10-dihydroacridines as intercalating cytotoxic agents: synthesis, DNA binding, and biological evaluation. **J. Med. Chem.** v. 40, p. 3749-3755, 1997.
- ARIYIBI, A.; ODUNUGA, O.; OLORUNSOGO, O. Concentration-dependant inhibition of sheep erythrocyte ghost plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by Berenil [1,3-bis(4'-amininophenyl)triazeno *in vitro*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** v. 24, p. 233-236, 2001.
- ARMITAGE, B. Photocleavage of nucleic acids. **Chem. Rev.** v. 98, p. 1171-1200, 1998.
- ARROWSMITH, J. et al. Antitumor imidazotetrazines. 41. Conjugation of the antitumor agents mitozolomide and temozolomide to peptides and lexitropsins bearing DNA major and minor groove-binding structural motifs. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 5458-5470, 2002.
- ATWELL, G. J.; CAIN, B. F.; DENNY, W. A. Potential Antitumor Agents. 22. Latentiated congeners of the 4'-(9-acridinylamino)methanesulfonanilides. **J. Med. Chem.** v. 20(4), p. 520-526, 1977.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3 Ed., John Wiley & Sons, 1995.
- BACHERIKOV, V. A. et al. Potent antitumor 9-anilinoacridines bearing an alkylating N-mustard residue on the anilino ring: synthesis and biological activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 13, p. 3993-4006, 2005.
- BAGULEY, B. C. DNA intercalating anti-tumour agents. **Anticancer Drug Des.** v. 6(1), p. 1-35, 1991.
- BAILLY, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. **Curr. Med. Chem.** v. 7, p. 39-58, 2000.
- BAILLY, C.; CHAIRES, J. B. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. **Bioconjugate Chemistry** v. 9(5), p. 513-538, 1998.
- BARALDI, P. G. et al. Design, synthesis, and biological activity of hybrid compounds between uramustine and DNA Minor Groove Binder Distamycin A. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 3630-3638, 2002.

BARCELO, F.; ORITZ-LOMBARDIA, M.; PORTUGAL, J. Heterogeneous DNA binding modes of berenil. **Biochimica et Biophysica Acta, Gene Structure and Expression** v. 1519, p. 175-184, 2001.

BATISTA, S. C. et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex. **Inorganic Chemistry Communications** v. 6, p. 1161-1165, 2003.

BISCHOFF, G.; HOFFMANN, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. **Current Medicinal Chemistry** v. 9, p. 321-348, 2002.

BLACKBURN, G. M.; GAIT, M. J. **Nucleic acids in chemistry and biology**. 2, Oxford, USA, Oxford University Press, 1996, 470 p.

BRANUM, M. E. et al. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37°C. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, p. 1898-1904, 2001.

BREIHAUPT, H.; DAMMANN, A.; AIGNER, K. Pharmacokinetics of dacarbazine (DTIC) and its metabolite 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) following different dose schedules. **Cancer Chemoter. Pharmacol.** v. 9, p. 103-109, 1982.

BÜGS, M. R.; CORNÉLIO, M. L. Analysis of the ethidium bromide bound to DNA by photoacoustic and FTIR spectroscopy. **Photochemistry and Photobiology** v. 74(4), p. 512-520, 2001.

BURR, S. J.; MSELATI, A.; THOMAS, E. W. Photochemical DNA cleavage by a berenil analog. **Tetrahedron Letters** v. 44, p. 7307-7309, 2003.

BUSH, K. Metallo-β-lactamases: a class apart. **Clin. Infect. Dis.** v. 27(Suppl. 1), p. S48-S53, 1998.

CALDWELL, J.; KOLLMAN, P. A molecular mechanical study of netropsin-DNA interactions. **Biopolymers** v. 25(2), p. 249-266, 1986.

CARVALHO, E. et al. Triazene drug metabolites. Part 17: synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumor triazenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 8, p. 1719-1725, 2000.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. GOODMAN, L. S. G., A. Rio de Janeiro, McGraw Hill, 1995, 903-949.

CHARLES, K.; POVIRK, L. F. Action of bleomycin on structural mimics of intermediates in DNA double-strand cleavage. **Chem. Res. Toxicol.** v. 11, p. 1580-1585, 1998.

CLSI (2003). M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved standard. Wayne, Pa. USA, Clinical and Laboratory Standards Institute - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology** v. 5, p. 634-642, 2001.

DACARB: pó liofilizado injetável: cartucho contendo 1 frasco-ampola nas apresentações de 100 e 200 mg. Eurofarma Laboratórios Ltda, 2007. Responsável técnico Jairo A. Utimi. Bula de remédio. Disponível em: http://www.eurofarma.com.br/produtos/lista_todos.asp?pldLinha=2. Acesso em 29 de novembro de 2007.

DAGG, C. P. et al. Effects of certain triazenes on chick embryos and on tumors explanted to the chorioallantois. **Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.** v. 90, p. 489-495, 1955.

DAI, W.-M. et al. Bifunctional 2-naphthyl propargylic sulfones exhibiting high DNA intercalating and alkylating activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 9, p. 2789-2794, 1999.

DAS, S. et al. A reusable zigzag copper(II) coordination polymer with bio-essential constituents as a facile DNA scission agent. **Inorganica Chimica Acta** v. 358, p. 3236-3240, 2005.

DECK, K. M.; TSENG, T. A.; BURSTYN, J. N. Triisopropyltriazacyclononane Copper(II): An Efficient Phosphodiester Hydrolysis Catalyst and DNA Cleavage Agent. **Inorganic Chemistry** v. 41, p. 669-677, 2002.

DEMEUNYNCK, M.; BAILLY, C.; WILSON, W. D. **DNA and RNA binders, from small molecules to drugs**. Wiley-VCH, 2003, 732 p.

DEMEUNYNCK, M.; BAILLY, C.; WILSON, W. D. **R.N.A. Binders**. Weinheim, Wiley-VCH, 2002, 518 p.

DENNY, W. A. DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design. **Anticancer Drug Des.** v. 4(4), p. 241-263, 1989.

DETMER III, C. A.; PAMATONG, F. V.; BOCARSLY, J. R. Molecular recognition effects in metal complex mediated double-stranded cleavage of DNA: reactivity and binding studies with model substrates. **Inorganic Chemistry** v. 36, p. 3676-3682, 1997.

DETMER III, C. A.; PAMATONG, F. V.; BOCARSLY, J. R. Nonrandom double stranded of DNA by a monofunctional metal complex: mechanistic studies. **Inorganic Chemistry** v. 35, p. 6292-6298, 1996.

DOLLERY, C. Dacarbazine. **Therapeutic Drugs**. DOLLERY, C. London, UK, Churchill Livingstone, 1991, D1-D3.

DOUTHART, R. J. et al. Binding of ethidium bromide to double-stranded ribonucleic acid. **Biochemistry** v. 12(2), p. 214-220, 1973.

EARL, R. A.; TOWNSEND, L. B. Synthesis and antileukemic activities of furanyl, pyranil, and ribosyl derivatives of 4-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5-carboxamide and 3-(3,3-dimethyl-1-triazeno)pyrazole. **J. Med. Chem.** v. 22(11), p. 1422-1425, 1979.

ELMROTH, K. et al. Cleavage of cellular DNA by calicheamicin g-1. **DNA Repair** v. 2, p. 363-374, 2003.

FARRELL, N. et al. Rhodium carboxylate complexes of diphenyltriazene and berenil, a substituted triazene and DNA-binding ligand, crystal and molecular structure of tetrakis (m-acetato)bis(diphenyltriazene)dirhodium(II). **Inorganic Chemistry** v. 26, p. 1426-1429, 1987.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3 Ed., Cambridge University Press, 1971, 350 p.

FREY, S. T. et al. A new trinuclear copper complex and its reactions with plasmid DNA. **Inorganica Chimica Acta** v. 242, p. 329-338, 1996.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research** v. 6, p. 2585-2597, 2000.

FU, P. K. L.; BRADLEY, M. P.; TURRO, C. DNA cleavage by photogenerated $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})$. **Inorganic Chemistry** v. 40, p. 2476-2477, 2001.

GEIERSTANGER, B. H.; WEMMER, D. E. Complexes of the minor groove of DNA. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 24, p. 463-493, 1995.

GERULATH, A. H.; LOO, T. L. Mechanism of action of 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide in mammalian cells in culture. **Biochem. Pharmacol.** v. 21(17), p. 2335-2345, 1972.

GIRALDI, T.; CONNORS, T. A.; CARTEI, G. **Triazenes – chemical, biological, and clinical aspects**. New York, Plenum Press, 1990, 227 p.

GIRALDI, T. et al. Preparation and antitumor activity of 1-aryl-3,3-dimethyltriazene derivatives. **J. Med. Chem.** v. 20(6), p. 850-853, 1977.

GONZALEZ, V. M. et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol. Pharmacol.** v. 59(4), p. 657-663, 2001.

GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D. N. Synthesis and antimicrobial activities of some hydroxytriazenes: a new class of biologically active compounds. **Analytical Sciences** v. 17 Supplement, p. 1789-1791, 2001.

GOURDIE, T. A. et al. DNA-Directed Alkylating Agents. 1. Structure-Activity Relationships for Acridine-Linked Aniline Mustards: Consequences of Varying the Reactivity of the Mustard. **J. Med. Chem.** v. 33, p. 1177-1186, 1990.

GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere** v. 44, p. 1737-1747, 2001.

GUPTA, S. P. Quantitative structure-activity relationship studies on anticancer drugs. **Chem. Rev.** v. 94(6), p. 1507-1551, 1994.

HAGERMAN, P. J. Evidence for the existence of stable curvature of DNA in solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 81(15), p. 4632-4636, 1984.

HAHN, F. E. **Antibiotics III**. CORCORAN. New York, J. W. & Hahan, F. E., Springer, 1975, 79-100.

HANSCH, C.; HATHEWAY, G. J.; QUINN, F. R. Antitumor 1-(X-aryl)-3,3-dialkyltriazenes. 2. On the role of correlation analysis in decision making in drug modification. Toxicity Quantitative structure-activity relationships of 1-(X-phenyl)-3,3-dialkyltriazenes in Mice. **J. Med. Chem.** v. 21(6), p. 574-577, 1978.

HANSCH, C.; VENGER, B. H.; PANTHANANICKAL, A. Mutagenicity of substituted (*o*-phenylenediamine)platinum dichloride in the Ames test. A quantitative structure-activity analysis. **J. Med. Chem.** v. 23, p. 459-461, 1980.

HANSON, N. D. AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 52, p. 2-4, 2003.

HARTL, M.; HUMPF, H.-U. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Food and Chemical Toxicology** v. 38, p. 1097-1102, 2000.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for a fungal toxins. **Applied Microbiology** v. 21(6), p. 1011-1016, 1971.

HASHIMOTO, S.; WANG, B.; HECHT, S. M. Kinetics of DNA cleavage by Fe(II).bleomycins. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, p. 7437-7438, 2001.

HATHEWAY, G. J. et al. Antitumor 1(X-aryl)-3,3-dialkyltriazenes. 1. Quantitative structure-activity relationships vs. L1210 Leukemia in Mice. **J. Med. Chem.** v. 21(6), p. 563-574, 1978.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Copper(II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. **Inorganic Chemistry** v. 35, p. 7474-7481, 1996.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews** v. 173, p. 133-165, 1998.

HORN JR., A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models

or purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta** v. 358, p. 339-351, 2005.

HÖRNER, R. **Estudo de compostos capazes de clivar o DNA**. 2003. 203f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

HÖRNER, R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e da clivagem do DNA pelo composto 1-(4-bromofenil)-3-(4-nitrofenil)triazeno. **Anais da 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** v., p., 2005.

JEAN-CLAUDE, B. J. et al. Cytokinetics of a novel 1,2,3-triazene-containing heterocycle, 8-nitro-3-methyl-benzo-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one (NIME), in the human epithelial ovarian cancer cell line OVCAR-3. **Biochemical Pharmacology** v. 57, p. 753-762, 1999.

JEAN-CLAUDE, B. J. et al. Comparative studies between the effects of mitozolomide and two tetrazepinones PYRCL and QUINCL on NIH:OVCAR3 cells. **Cancer Chemoter. Pharmacol.** v. 42, p. 59-67, 1998.

JULLIARD, M.; VERNIN, G. Biological properties of antitumor triazenes. **Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.** v. 20(2), p. 287-296, 1981.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin manganese(II) complexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 55, p. 149-152, 2007a.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin zinc(II) complex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 17, p. 1197-1199, 2007b.

KOLAR, G. F. Carcinogenicity of cytostatic triazenes. **IARC – Scientific Publications** v. 78, p. 111-126, 1986.

KOPKA, M. L. et al. Binding of an antitumor drug to DNA, netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G. **J. Mol. Biol.** v. 183(4), p. 553-563, 1985a.

KOPKA, M. L. et al. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. **Proc. Nat Acad. Sci. USA** v. 82(5), p. 1376-1380, 1985b.

LALEZARI, I.; AFGHAHI, F. Synthesis and evaluation of antitumor activity of 1-[N,N-bis(2-chloroethyl)sulfamoylphenyl]3,3-dialkyltriazenes. **J. Pharm. Sci.** v. 64(4), p. 698-699, 1975.

LEGHA, S. S. Current therapy for malignant melanoma. **Semin. Oncol.** v. 16, p. 34-44, 1989.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine** v. 10, p. S122-S129, 2004.

- LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals** v. 20, p. 297-301, 1992.
- LIN, A. J.; LOO, T. L. Synthesis and antitumor activity of halogen-substituted 4-(3,3-dimethyl-1-triazeno)quinolines. **J. Med. Chem.** v. 21(3), p. 268-272, 1978.
- LIN, Y.-T.; LOO, T. L.; VADLAMUDI, S. Preparation and antitumor activity of derivatives of 1-phenyl-3,3-dimethyltriazene. **J. Med. Chem.** v. 15(2), p. 201-203, 1972.
- LIU, C. et al. DNA hydrolytic cleavage by the diiron (III) complex $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\text{m-O})(\text{m-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$: comparison with other binuclear transition metal complexes. **Inorganic Chemistry** v. 47, p. 913-922, 2002.
- LIU, C. et al. DNA damage by copper (II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 7, p. 233-240, 1999.
- LIU, J.-G. et al. Polypyridyl ruthenium (II) complexes containing intramolecular hydrogen-bond ligand: synthesis, characterization and DNA binding properties. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 76(3), p. 265-271, 1999.
- LOMBARDI, P.; CRISANTI, A. Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. **Pharmacol. Ther.** v. 76(1-3), p. 125-133, 1997.
- LÖNN, U.; LÖHN, S. Prevention of dacarbazine damage of human neoplastic cell DNA by aphidilolin. **Cancer Research** v. 47, p. 26-30, 1987.
- LUCE, J. K. et al. Clinical trials with the antitumor agent 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide (NSC-45388). **Cancer Chemotherapy Reports Part 1** v. 54(2), p. 119-124, 1970.
- MA, D.-L. et al. DNA binding and cytotoxicity of Ruthenium(II) and Rhenium(I) complexes of 2-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridil)-1,3,5-triazine. **Inorganic Chemistry** v. 46, p. 740-749, 2007.
- MACÍAS, B. et al. Cu(II) complexes with a sulfonamide derived from benzoguanamine. Oxidative cleavage of DNA in the presence of H_2O_2 and ascorbate. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 99, p. 1441-1448, 2005.
- MACLAUGHLIN, J. L. **Methods in Plant Biochemistry**. London, Academic Press, 1991, p. 1.
- MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltametric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry** v. 37, p. 693-700, 1998.
- MARCHESI, F. et al. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. **Pharmacological research** v. 56, p. 257-287, 2007.

MARKY, L. A.; BRESLAUER, K. Origins of netropsin binding affinity and specificity: correlations of thermodynamic and structural data. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** v. 84, p. 4359-4363, 1987.

MARX, K. A. Structure and Dynamics of Biopolymers. **NATO ASI Series E-133**. NICOLINI, C., Martinus Nijhoff, 1987, 137-168.

MCCAUNAUGHIE, A. W.; JENKINS, T. C. Novel acridine-triazenes as prototype combilexins: synthesis, DNA binding, and biological activity. **J. Med. Chem.** v. 38, p. 3488, 1995.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica** v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHELOT, T. M. et al. (2006). Determinação da atividade antibacteriana de compostos triazenos. 33° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 6° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica. Curitiba, Brasil: 79B-79B.

MIDDLETON, M. R.; MARGISON, G. P. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of DNA-repair pathway. **Lancet Oncol.** v. 4, p. 37-44, 2003.

MIZUTANI, H. et al. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.** v. 277(34), p. 30684-30689, 2002.

MONTGOMERY, J. A. The design of chemotherapeutic agents. **Acc. Chem. Res.** v. 19(10), p. 293-300, 1986.

MORENO, R. G. M. et al. Lesões em DNA induzidas pela autoxidação de S(IV) na presença de íons metálicos de transição. **Química Nova** v. 29(5), p. 1086-1093, 2006.

MUDASIR et al. Base-specific and enantioselective studies for the DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and dipyrrol[3,2-a:2',3'-c]phenazine. **Spectrochimica Acta Part A** v. 66, p. 163-170, 2007.

MUKHOPADYAY, R.; MADHUBALA, R. Antileishmanial activity of berenil and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) and its correlation with S-adenosylmethionine decarboxylase and polyamines. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 27(1), p. 55-59, 1995.

MÜLLER, I.; NIETHAMMER, D.; BRUCHELT, G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity. **Int. J. Mol. Med.** v. 1(2), p. 491-494, 1998.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8, Washington, ASM Press, American Society for Microbiology, 2003, p. Pages.

NEVES, A. et al. Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications** v. 4, p. 388-391, 2001.

- NIFONTOV, V. I.; BERSKAYA, N. P.; SHTOKAREVA, E. A. The reactivity and mechanism of action of triazenes. **Pharmaceutical Chemistry Journal** v. 28(10), p. 687-706, 1994.
- NINABER, A.; GOODFELLOW, J. M. DNA conformation and dynamics. **Radiat. Environ. Biophys.** v. 38(1), p. 23-29, 1999.
- PAN, C. Q.; LAZARUS, R. A. Engineering hyperactive variants of human deoxyribonuclease I by altering its functional mechanism. **Biochemistry** v. 36, p. 6624-6632, 1997.
- PARAGINSKI, G. L. et al. Avaliação da Atividade de Clivagem do DNA Plasmidial por Cinco Compostos Triazenos Inéditos. In: 33º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS E 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** v. 38, p. 91B, 2006.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews** v. 18(4), p. 657-686, 2005.
- PEISACH, J. Dioxygen activation of iron bleomycin and the cleavage of DNA. **International Congress Series** v. 1233, p. 511-517, 2002.
- PICCIONI, D. et al. Cisplatin increases sensitivity of human leukemic blasts to triazene compounds. **Journal of Chemotherapy** v. 7, p. 224-228, 1995.
- PILCH, D. S. et al. Berenil [1,3-bis-(4-amidinophenyl)triazene] binding to DNA duplexes and a RNA duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. **Biochemistry** v. 34, p. 9962-9976, 1995.
- PORTUGAL, J. Berenil acts as a poison of topoisomerase II. **FEBS Letters** v. 334, p. 136-138, 1994.
- PORTUGAL, J.; WARING, M. J. Comparison of binding sites in DNA for berenil, netropsin and distamycin: a footprinting study. **Eur. J. Biochem.** v. 167, p. 281-289, 1987.
- PREUSSMANN, R.; HODENBERG, A.; HENGY, H. Mechanism of carcinogenesis with 1-aryl-3,3-dialkyltriazenes. Enzymatic dealkylation by rat liver microsomal fraction in vitro. **Biochem. Pharmacol.** v. 18, p. 1-13, 1969.
- PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clin. Microbiol. Infect.** v. 10((Suppl. 4)), p. 18-22, 2004.
- PYLE, A. M. et al. Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium (II): Factors Governing Binding to DNA. **J. Am. Chem. Soc.** v. 111, p. 3051-3058, 1989.
- REDDY, B. S. P.; SONDHI, S. M.; LOWN, J. W. Synthetic DNA minor groove-binding drugs. **Pharmacology & Therapeutics** v. 84, p. 1-111, 1999.

REISBIG, M. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 51, p. 1141-1151, 2003.

REN, R. et al. Simple copper (II)-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. **Inorganic Chemistry** v. 39, p. 5454-5463, 2000.

RONDESTVEDT JR., C. S.; DAVIS, S. J. 1-aryl-3,3-dialkyltriazenes as tumor inhibitors. **J. Org. Chem.** v. 22(2), p. 200-203, 1957.

ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. **Pharmacological Reviews** v. 56(1), p. 53-102, 2004.

ROS, T. D. et al. DNA-photocleavage agents. **Current Pharmaceutical Design** v. 7, p. 1781-1821, 2001.

ROSSI, L. M. et al. Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II), complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta** v. 337, p. 366-370, 2002.

SANDERSON, B. J. S.; SHIELD, A. L. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. **Mutation Research** v. 355, p. 41-57, 1996.

SAPSE, A.-M.; LOWN, J. W. Theoretical studies employing an ab initio and molecular modeling combination method on the DNA binding of bis-benzimidazoles designed for bioreductive activation. **J. Biomol. Struct. Dynam.** v. 16(2), p. 253-263, 1998.

SAUNDERS, P. H.; CHAO, L. Y. Fate of the ring moiety of 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide in mammalian cells. **Cancer Research** v. 34, p. 2464-2469, 1974.

SCARPELLINI, M. et al. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxy copper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry** v. 42, p. 8353-8365, 2003.

SCHNAITH, L. M. T.; HANSON, R. S.; QUE, L. Double-stranded cleavage of pBR322 by a diiron complex via a "hydrolytic" mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 91, p. 569-573, 1994.

SHEALY, F. Y. Synthesis and biological activity of 5-aminoimidazoles and 5-triazenoimidazoles. **J. Pharm. Sci.** v. 59(11), p. 1533-58, 1970.

SHEALY, F. Y.; KRAUTH, C. A. Imidazoles. II. 5(or-4)-(monosubstituted triazeno)imidazole-4(or-5)-carboxamides. **J. Med. Chem.** v. 9, p. 34-38, 1966.

SHEALY, F. Y. et al. Imidazoles V. 5(or 4)-(3-alkyl-3-methyl)-1-triazeno]imidazole-4(or 5)-carboxamides. **J. Pharm. Sci.** v. 57, p. 1562-1568, 1968a.

SHEALY, F. Y. et al. Synthesis and properties of the antileukemic agent 5(or 4)-[3,3-bis(2-chloroethyl-1-triazeno)imidazole-4(or 5)-carboxamide. **J. Pharm. Sci.** v. 57(1), p. 83-86, 1968b.

SHEALY, F. Y. et al. A new antifungal and antibacterial agent, methyl 5(or 4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4(or 5)-carboxylate. **J. Pharm. Sci.** v. 15, p. 147-148, 1966.

SHEALY, F. Y.; MONTGOMERY, J. A.; LASTER, W. R. Antitumor activity of triazenoimidazoles. **Biochem. Pharmacol.** v. 11, p. 674, 1962.

SHEALY, F. Y.; O'DELL, C. A. Imidazole and pyrazole bis(2-fluoroethyl)triazenes. **J. Pharm. Sci.** v. 59(9), p. 1358-1360, 1970.

SHEALY, F. Y.; O'DELL, C. A. Synthesis, antileukemic activity, and stability of 3-(substituted-triazeno)pyrazole-4-carboxylic acid esters and 3-(substituted-triazeno)pyrazole-4-carboxamides. **J. Pharm. Sci.** v. 60(4), p. 554-560, 1971.

SHEALY, F. Y.; O'DELL, C. A. Triazeno-u-triazole-4-carboxamides. Synthesis and antitumor evaluation. **J. Med. Chem.** v. 9, p. 733-77, 1966.

SIGMAN, D. S. Chemical nucleases. **Biochemistry** v. 29, p. 9097-9105, 1990.

SIGMAN, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. **Acc. Chem. Res.** v. 19, p. 180-186, 1986.

SKIBBA, J. L. et al. Metabolism of 4(5)-(3,3-dimethyl)-1-triazeno]imidazole-5(4)-carboxamide to 4(5)-amino-imidazole-5(4)-carboxamide in man. **Biochem. Pharmacol.** v. 19, p. 2043-2051, 1970.

SNYDER, R. D. A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. **Mutation Research** v. 411(3), p. 235-248, 1998.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal Biological Inorganic Chemistry** v. 6, p. 337-347, 2001.

STARCEVIC, K. et al. Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding and antitumor evaluation of novel cyano- and amidino-substituted derivatives of naphthofurans, naphtho-thiophenes, thieno-benzofurans, benzo-dithiophenes and their acyclic precursors. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 41, p. 925-939, 2006.

STUBBE, J. et al. Bleomycins: a structural model for specificity, binding, and double strand cleavage. **Acc. Chem. Res.** v. 29, p. 322-330, 1996.

SUH, D.; POVIRK, L. F. Mapping of the cleavage-associated bleomycin binding site on DNA with a new method based on site-specific blockage of the minor groove with N₂-isobutyrylguanine. **Biochemistry** v. 36(14), p. 4248-4257, 1997.

TENTORI, L. et al. Triazene compounds induce apoptosis in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient leukemia cell lines. **Leukemia** v. 9, p. 1888-1895, 1995.

THOMAS, A. M.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Different modes of DNA cleavage activity of dihydroxo-bridged dicopper(II) complexes having phenanthroline bases. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 98, p. 1087-1094, 2004.

TSANG, L. L. H. et al. Comparison of the cytotoxicity in vitro temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. **Cancer Chemoter. Pharmacol.** v. 27, p. 342-346, 1991.

VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 5, p. 382-387, 1981.

VAUGHAN, K. et al. Studies of the mode of action of antitumor triazenes and triazines. **J. Med. Chem.** v. 27, p. 357-363, 1984.

VENGER, B. H. et al. Ames test of 1-(X-phenyl)-3,3-dialkyltriazenes. A quantitative structure-activity study. **J. Med. Chem.** v. 22(5), p. 473-476, 1979.

WALSH, T. R. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews** v. 18(2), p. 306-325, 2005.

WERNER, M. H.; GRONENBORN, A. M.; CLORE, G. M. Intercalation, DNA kinking, and the control of transcription. **Science** v. 271, p. 778, 1996.

WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science** v. 235, p. 1173-1178, 1987.

WILMAN, D. E. V. et al. Tumor inhibitory triazenes. 3. Dealkylation within an homologous series and its relation to antitumor activity. **J. Med. Chem.** v. 27, p. 870-874, 1984.

WILMAN, D. E. V.; GODDARD, P. M. Tumor inhibitory triazenes. 2. Variation of antitumor activity within an homologous series. **J. Med. Chem.** v. 23, p. 1052-1054, 1980.

ZHEN, Q.-X. et al. Synthesis, characterization and DNA binding of ruthenium (II) complexes containing the atp ligand. **Journal of Inorganic Chemistry** v. 78, p. 293-298, 2000.

ZIMMER, C.; WÄHNERT, U. Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** v. 47(1), p. 31-112, 1986.