

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

Angelita Bottega

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE TRIAZENOS,
SERTRALINA E METILDOPA COMO ALTERNATIVAS NO
REAPROVEITAMENTO DE MEDICAMENTOS**

Santa Maria, RS
2021

Angelita Bottega

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE TRIAZENOS,
SERTRALINA E METILDOPA COMO ALTERNATIVAS NO
REAPROVEITAMENTO DE MEDICAMENTOS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

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

Santa Maria, RS
2021

BOTTEGA, ANGELITA
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA in vitro DE
TRIAZENOS, SERTRALINA E METILDOPA COMO ALTERNATIVAS NO
REAPROVEITAMENTO DE MEDICAMENTOS / ANGELITA BOTTEGA.-
2021.
129 p.; 30 cm

Orientadora: ROSMARI HÖRNER
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

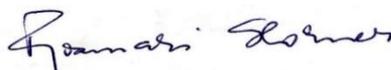
1. Triazenos 2. Clivagem do DNA 3. Citotoxicidade 4.
Reaproveitamento de medicamentos 5. Sertralina I. HÖRNER,
ROSMARI II. Título.

Angelita Bottega

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE TRIAZENOS,
SERTRALINA E METILDOPA COMO ALTERNATIVAS NO
REAPROVEITAMENTO DE MEDICAMENTOS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 19 de Abril de 2021:



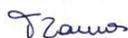
**Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**



Amanda de Souza Motta, Dr^a. (UFRGS)



Aline Joana R. Wohlmutth Alves dos Santos, Dr^a. (UFPEL)



Daniela Fernandes Ramos, Dr^a. (FURG)



Luciana Maria Fontanari Krause, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS

2021

DEDICATÓRIA

*A minha família, meus pais Nilton Antonio e Neusa de Fátima Bottega e meu Irmão Joselino.
Dedico também ao meu namorado Tiago da Rosa de Araújo pelo amor, incentivo e apoio a
mim dedicados nesse longo período de caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus por tudo, pela proteção, pelas graças alcançadas e, principalmente, pela força nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, **Nilton Antônio Bottega e Neusa de Fátima Bottega**, e ao meu irmão **Joselino Bottega**, a minha profunda gratidão pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, conselhos, apoio e carinho em todas as etapas de minha formação tanto pessoal como profissional.

Ao meu namorado **Tiago da Rosa de Araújo**, agradeço imensamente pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão. Vivenciamos inúmeras experiências nessa longa jornada de estudos e dedicação, sendo meu companheiro desde o início da graduação até a conclusão do doutorado, sempre me incentivando a não desistir de meus objetivos e a acreditar nos meus sonhos.

A todos os meus colegas de laboratório pela parceria e amizade, em especial a colega Marissa Bolson Serafim, por estar sempre presente me auxiliando em todas as técnicas, pela troca de conhecimentos e apoio constante. Meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora professora **Dr^a. Rosmari Hörner**, agradeço imensamente pela oportunidade, por toda a ajuda, apoio, incentivo e carinho a mim dedicados. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pela compreensão que tivestes para comigo nesses oito anos de convivência. Muito obrigada por tudo!

À professora Dr^a. Luciana Maria Fontanari Krause, que atuava junto a Universidade Franciscana (UFN), e ao seu orientado Altevir Rossato Viana, agradeço pelo tempo dedicado em prol deste trabalho, pela ajuda na realização dos experimentos e pelos conhecimentos transmitidos!

Ao Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da UFSM, em especial a pessoa do professor **Dr. Manfredo Hörner**, agradeço pela cedência dos compostos triazenos para realização de meus experimentos e pelo apoio e incentivo para realização desse estudo.

À todos os professores e funcionários do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, muito obrigada por tudo!

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído, meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar).

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE TRIAZENOS, SERTRALINA E METILDOPA COMO ALTERNATIVAS NO REAPROVEITAMENTO DE MEDICAMENTOS

AUTORA: Angelita Bottega

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

Atualmente, inúmeros esforços para descobrir terapias antineoplásicas e antimicrobianas eficazes, seletivas e inovadoras têm conduzido à síntese e investigação da atividade biológica de diferentes moléculas. Os Triazenos (TZCs) têm se firmado como uma classe promissora para a descoberta de fármacos pela ampla versatilidade farmacológica demonstrada. Outra abordagem é o reaproveitamento de medicamentos, ou seja, investigar novos usos para fármacos já aprovados clinicamente no tratamento de outras doenças. Essa prática tem provado ser uma boa alternativa, uma vez que reduz riscos, tempo e custos associados ao processo de desenvolvimento clínico, pela disponibilidade de dados farmacocinéticos e toxicológicos já conhecidos. Nosso grupo de pesquisa tem avaliado o potencial farmacológico de uma série de compostos triazenos e de diferentes medicamentos utilizados na prática clínica, como alternativas no redirecionamento. Reportamos a avaliação da atividade biológica *in vitro* de três moléculas triazenos *N*-óxidos: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido) e **M3** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II): **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e seus respectivos precursores, **P1** (4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina), bem como dos medicamentos candidatos ao redirecionamento, sertralina e metildopa. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método da microdiluição em caldo, através da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), frente a cepas da coleção *American Type Culture Collection* e isolados clínicos multirresistentes (MDR). A citotoxicidade foi investigada utilizando-se culturas de linhagens celulares (tumoriais: melanoma murino - B16F10, hepatocarcinoma humano - HepG2, glioblastoma multiforme - U87MG e T98G; não neoplásica: 292T - fibroblasto de rim embrionário) por meio do ensaio colorimétrico com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A atividade de nuclease química foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. Os compostos avaliados apresentaram atividade citotóxica variável. O complexo **C3** apresentou maior efeito citotóxico frente às linhagens HepG2 (IC₅₀ = 2.672 μM) e B16F10 (IC₅₀=3.950 μM), sendo mais ativo que os quimioterápicos padrões tosilato de sorafenibe (nexavar® - Bayer) (IC₅₀ = 7.133 μM) e temozolomida(temodal® - Schering-Plough) (IC₅₀ = 8.402 μM), respectivamente. Nas linhagens do glioblastoma multiforme, as moléculas *N*-óxidos livres foram mais citotóxicas frente a U87MG, sendo **M1** (IC₅₀ = 1.488 μM) com maior atividade, o qual foi aproximadamente três vezes mais ativo que quimioterápico padrão temozolomida (IC₅₀ = 4.369 μM). Frente a T98G, os complexos triazenidos *N*-óxidos apresentaram maior efeito citotóxico, destacando-se a atividade do complexo **C2** (IC₅₀ = 9.211 μM), cujos valores foram próximos ao apresentado pelo padrão temozolomida (IC₅₀ = 7.326 μM). Os TZCs apresentaram atividade antibacteriana, sendo mais ativos frente à Gram positivos. Estes, não apresentaram atividade de nuclease, pois não foram aptos a clivar o DNA plasmidial. Entre os medicamentos, sertralina apresentou maior atividade antibacteriana que metildopa, tanto frente cepas Gram positivas como Gram negativas. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos de ação envolvidos para tornar seu uso seguro no tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana. Ocorreram eventos sinérgicos (FICI <0,5) entre sertralina e metildopa e em suas associações com sulfametoxazol/trimetoprima. Metildopa possui atividade de nuclease química, pois foi apto a clivar o DNA plasmidial, por provável mecanismo de ação hidrolítico, similar ao promovido pelas nucleases naturais. Concluímos que os TZCs ensaiados, **M1** e **C3**, bem como os medicamentos redirecionados sertralina e metildopa demonstram uma alternativa para a concepção de novos medicamentos com propriedades antitumoral e antibacteriana.

Palavras-chave: Triazenos. Clivagem do DNA. Citotoxicidade. Reaproveitamento de medicamentos. Sertralina. Metildopa.

ABSTRACT

EVALUATION OF *in vitro* BIOLOGICAL ACTIVITY OF TRIAZENES, SERTRALIN AND METHILDOPA AS ALTERNATIVES IN DRUGS REPURPOSING

AUTHOR: Angelita Bottega
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

Currently, countless efforts to discover effective, selective and innovative antineoplastic and antimicrobial therapies have led to the synthesis and investigation of the biological activity of different molecules. Triazenes (TZCs) have established themselves as a promising class for drug discovery due to the wide pharmacological versatility demonstrated. Another approach is the reuse of medications, that is, investigating new uses for drugs already clinically approved in the treatment of other diseases. This practice has proven to be a good alternative, since it reduces risks, time and costs associated with the clinical development process, due to the availability of known pharmacokinetic and toxicological data. Our research group has evaluated the pharmacological potential of a series of triazene compounds and different drugs used in clinical practice, as alternatives in redirecting. We report the *in vitro* biological activity evaluation of three *N*-*óxide* triazene molecules: **M1** (3- (4-chlorophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxide*), **M2** (3- (4-bromophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxido*) and **M3** (3- (4-iodophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxide*), three *N*-*óxide* triazene complexes of Cu(II): **C1** ({Bis [3- (4-chlorophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxido*- κ 2N1, O4] copper (II)}), **C2** ({Bis [3- (4-bromophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxido*- κ 2N1,O4]copper(II)}) and **C3** ({Bis [3- (4-iodophenyl) -1-phenyltriazene *N1*-*óxido*- κ 2N1, O4]copper (II)}) and their respective precursors, **P1** (4-Chlorophenyl-amine), **P2** (4-Bromophenyl-amine) and **P3** (4-Iodophenyl-amine), as well as the candidate drugs for redirection, sertraline and methyldopa. The antibacterial activity was determined by the broth microdilution method, through the evaluation of minimal inhibitory concentration (MIC), against strains of the American Type Culture Collection and multidrug-resistant clinical isolates (MDR). Cytotoxicity was investigated using cell line cultures (tumor: murine melanoma - B16F10, human hepatocarcinoma - HepG2, glioblastoma multiforme - U87MG and T98G; normal: 292T - embryonic kidney fibroblast) using the colorimetric assay with the bromide reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (MTT). The chemical nuclease activity was verified using the agarose gel electrophoresis technique. The tested compounds showed variable cytotoxic activity. The **C3** complex showed a greater cytotoxic effect compared to the HepG2 (IC₅₀ = 2.672 μ M) and B16F10 (IC₅₀ = 3.950 μ M) lines, being more active than the standard sorafenib tosylate (nexavar® - Bayer) (IC₅₀ = 7,133 μ M) and temozolomide (temodal® - Schering-Plow) (IC₅₀ = 8,402 μ M), respectively. In the strains of glioblastoma multiforme, the free *N*-*óxide* molecules were more cytotoxic compared to U87MG, with **M1** (IC₅₀ = 1.488 μ M) with greater activity, which was approximately three times more active than standard temozolomide chemotherapy (IC₅₀ = 4.369 μ M). In relation to T98G, the *N*-*óxide* triazene complexes showed a greater cytotoxic effect, highlighting the activity of the **C2** complex (IC₅₀ = 9.211 μ M), whose values were close to that presented by the temozolomide standard (IC₅₀ = 7.326 μ M). The TZCs showed antibacterial activity, being more active compared to Gram positive. These did not show nuclease activity, as they were not able to cleave plasmid DNA. Among the drugs, sertraline showed greater antibacterial activity than methyldopa, both against Gram positive and Gram negative strains. However, additional studies are needed to evaluate the mechanisms of action involved to make its use safe in the treatment of infectious diseases of bacterial origin. Synergistic events (FICI <0.5) occurred between sertraline and methyldopa and in their associations with sulfamethoxazole/ trimethoprim. Methyldopa has chemical nuclease activity because it was able to cleave plasmid DNA, by a probable mechanism of hydrolytic action, similar to that promoted by natural nucleases. We conclude that the tested TZCs, **M1** and **C3**, as well as the redirected drugs sertraline and methyldopa demonstrate an alternative for the design of new drugs with antitumor and antibacterial properties.

Keywords: Triazenes. DNA cleavage. Cytotoxicity. Drug repositioning. Sertraline. Methyldopa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Número de óbitos por câncer no mundo no ano de 2018.....	22
Figura 2 - Regra do ABCDE de identificação do câncer de pele melanoma.....	25
Figura 3 - Esquema representativo de um triazeno clássico R' e R'' = alquil ou aril.....	28
Figura 4 - Estrutura genérica da molécula 3-(4-halofenil)-1-feniltriazeno <i>N</i> ₁ -óxido(X= halogênio).....	30
Figura 5 - Estrutura química dos triazenos <i>N</i> -óxidos livres (M1, M2, M3).....	31
Figura 6 - Estrutura química dos complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1, C2, C3)	32
Figura 7 - Estrutura química dos precursores (P1, P2, P3).....	33
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a clivagem do DNA plasmidial pela transformação da forma superenovelada (forma I) nas formas circular aberta (forma II) e linear (forma III).....	35
Figura 9 - Estrutura química do medicamento sertralina.....	38
Figura 10 - Estrutura química do medicamento metildopa.....	39

MANUSCRITO 1

Fig. 1 - Molecular structure of the drugs sertraline a , methyl dopa b and sulfamethoxazole/trimethoprim c	57
Fig. 2 - Comparison of sertraline and methyl dopa in association with sulfamethoxazole / trimethoprim (SUT) against ATCC strains of: A: <i>S. aureus</i> ATCC 25923 and B: <i>S. aureus</i> ATCC 29213. SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim, SER: sertraline, MET: methyl dopa, SER+SUT: combination of sertraline and sulfamethoxazole/trimethoprim, MET+SUT: combination of methyl dopa and sulfamethoxazole/trimethoprim.....	62
Fig. 3 - (A, B, C): Association of sertraline with sulfamethoxazole/trimethoprim in <i>S. aureus</i> (MDR) from: A: <i>E. faecalis</i> – 3, B: <i>E. faecium</i> – 5 and C: <i>S. aureus</i> – 9. Fig. 3 (D, E) – Association of methyl dopa with sulfamethoxazole/trimethoprim in the ATCC strain of <i>M. luteus</i> ATCC 7468 and in the isolate of <i>A. baumannii</i> - 2. SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim, SER: sertraline, MET: methyl dopa, SER+SUT: combination of sertraline and sulfamethoxazole/trimethoprim, MET+SUT: combination of methyl dopa and sulfamethoxazole/trimethoprim.....	63

Fig. 4 - Cleavage DNA activity of methyl dopa under different conditions: pH 7.4 and 8.0; temperature 37 ° C and 50 ° C per 24h. a) plasmid pUC18. In all: lane 1, only DNA + buffer; lane 2, DNA + buffer + stock solution (3,75 mM); lane 3, DNA + buffer + stock solution 1:2 (1,875 mM); lane 4, DNA + buffer + stock solution 1:10 (0,375 mM).....64

MANUSCRITO 2

Figura 1 - Estrutura química das moléculas avaliadas.....87

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 - Selection of studies already reported with the antidepressant drug sertraline, as potential therapeutic options in the treatment of neoplastic, antibacterial, antifungal and parasitic diseases.....	45
---	----

MANUSCRITO 1

Table 1 - Characteristics of the isolates used in this study.....	67
Table 2- Minimal inhibitory concentration (MIC) of sertraline, methyl dopa and sulfamethoxazole/trimethoprim, in isolation and in combination, against standard reference bacterial strains and clinical isolates.....	68
Table 3 -Minimal bactericidal concentration (MBC) of sertraline, methyl dopa and sulfamethoxazole/trimethoprim, isolated and in association, against standard reference bacterial strains and clinical isolates.....	69
Table 4 -Minimal inhibitory concentration (MIC) minimum bactericidal concentration (MBC) and determination of tolerability level (MBC/MIC) of sertraline and methyl dopa against ATCC standard strains and clinical isolates.....	70

MANUSCRITO 2

Tabela 1 - Atividade citotóxica (IC ₅₀ µM) dos compostos triazenos <i>N</i> -óxidos livres (M1, M2, M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1, C2, C3) e seus respectivos precursores (P1, P2, P3), incubadas por 24 horas com as linhagens celulares tumorais (HepG2 e B16F10) e não neoplásica (293T).....	89
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos MDR avaliados no estudo.....	90
Tabela 3 - Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de compostos triazenos <i>N</i> -óxidos (M1, M2, M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1, C2, C3) e seus respectivos precursores (P1, P2, P3), frente á cepas bacterianas padrão ATCC e isolados clínicos Gram positivos.....	91
Tabela 4 - Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de compostos triazenos <i>N</i> -óxidos (M1, M2, M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1, C2, C3) e seus respectivos precursores (P1, P2, P3), frente á cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos Gram negativos.....	92

MANUSCRITO 3

Tabela 1 - Valores de IC ₅₀ (μM) dos compostos triazenos <i>N</i> -óxidos livres (M1 , M2 , M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C , C2 , C3) e seus respectivos precursores (P1 , P2 , P3) frente a linhagens celulares do glioblastoma multiforme.....	106
Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos MDR avaliados no estudo.....	107
Tabela 3 - Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> das moléculas <i>N</i> -óxidos livres (M1 , M2 , M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1 , C2 , C3) e precursores (P1 , P2 , P3), frente a bactérias ATCC e isolados clínicos Gram positivos.....	108
Tabela 4 - Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> das moléculas <i>N</i> -óxidos livres (M1 , M2 , M3), complexos triazenidos <i>N</i> -óxidos de Cu(II) (C1 , C2 , C3) e precursores (P1 , P2 , P3), frente a bactérias ATCC e isolados clínicos Gram negativos.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

293 T - Fibroblasto de rim humano embrionário
A. baumannii - *Acinetobacter baumannii*
ATCC - *American Type Culture Collection*
B16F10 - Melanoma Murino
CBM - Concentração bactericida mínima
CHC- Hepatocarcinoma
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
DNA - Ácido desoxirribonucléico
E. faecalis - *Enterococcus faecalis*
E.coli - *Escherichia coli*
FICI - Índice de Concentração Inibitória Fracionária
g - gramas
GN - Gram negativa
GP - Gram positiva
HepG2 - Hepatocarcinoma humano
HUSM - Hospital Universitário de Santa Maria
K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*
M. luteus - *Micrococcus luteus*
MDR - Microrganismos multirresistentes
min - minutos
P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*
s - segundos
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
S. epidermidis - *Staphylococcus epidermidis*
S. haemolyticus - *Staphylococcus haemolyticus*
SRF - Sorafenibe
T98G - Glioblastoma multiforme resistente
TMZ - Temozolamida
TSA - Agar Triptona de Soja
TSB - Caldo Soja Trypticaseína
TZCs - Triazenos
U87 MG - Glioblastoma multiforme sensível
UFMS - Universidade Federal de Santa Maria
NITriCo - Núcleo de Investigação de triazenos e Compexos
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
M1 - 3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido
M2 - 3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido
M3 - 3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido
C1 - Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1, O^4$]cobre(II)
C2 - Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1, O^4$]cobre(II)
C3 - Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1, O^4$]cobre(II)
P1 - 4-Clorofenil-amina
P2 - 4-Bromofeni-amina
P3 - 4-Iodofenil-amina

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	16
2 INTRODUÇÃO	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1 CÂNCER: CARACTERÍSTICAS GERAIS E TERAPÊUTICA	21
4.1.1 Glioblastoma Multiforme	23
4.1.2 Melanoma Maligno	24
4.1.3 Hepatocarcinoma - CHC	26
4.2 INFECÇÕES BACTERIANAS: RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	27
4.3 TRIAZENOS (TZCs) - COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO	28
4.3.1 Complexos de Cobre(II)	29
4.3.2 Derivados de óxido de triazeno	29
4.4 . ATIVIDADE DE NUCLEASE QUÍMICA	34
4.4.1 Clivagem do DNA plasmidial	34
4.5 REDIRECIONAMENTO DE MEDICAMENTOS	36
4.5.1 Sertralina	37
4.5.2 Metildopa	39
5. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	40
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO	40
5.2 MANUSCRITO 1	52
5.3 MANUSCRITO 2	76
5.4 MANUSCRITO 3	96
6 DISCUSSÃO	112
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	120

1 APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO** e nos **MANUSCRITOS** e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários breves e gerais sobre os principais resultados contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** apresentadas no final desta tese, referem-se às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA e DISCUSSÃO**, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo e dos manuscritos, estão mencionadas nos mesmos.

2 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento considerável das doenças neoplásicas e infecciosas. Esse fenômeno, aliado à escassez de novos agentes terapêuticos e ao rápido aparecimento de resistência aos medicamentos disponíveis para o tratamento dessas doenças, tem se tornado um evidente problema de saúde pública mundial (BRAY et al., 2018; LE et al., 2019; WHO, 2020; WILLYARD, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que, as neoplasias estão entre as quatro principais causas de morte no mundo, sendo responsável por, 9,6 milhões de óbitos em 2018 (BRAY et al., 2018; WHO, 2020). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*, 2020), divulgou no documento Globocan – 2020, novas estimativas sobre a carga global de câncer, indicando que aumentou para 19,3 milhões o número de casos dessas doenças, com um total de 10 milhões de mortes associadas em 2020. A agência fez também um alerta de que, se nada for feito para reverter essa situação, as incidências vão atingir 28,4 milhões de novos casos até 2040, um aumento de 47% em relação a 2020, com as taxas de mortalidade podendo atingir 16,3 milhões de pessoas (SUNG et al., 2021, IARC, 2020).

Dentre os diferentes tipos de cânceres, destacamos o glioblastoma multiforme, melanoma maligno e hepatocarcinoma, que embora sejam tumores de baixa incidência, vem colaborando com as taxas de mortalidade no mundo (IARC, 2020; TAN et al., 2020). Diferentes protocolos têm melhorado a sobrevida dos pacientes com essas malignidades, entretanto ainda são múltiplos os desafios a serem superados. O baixo número de casos, o difícil controle e a alta mortalidade relacionada a essas doenças, inviabilizam grandes estudos, pois o risco de não construírem dados suficientes para ganhar a aprovação de novos agentes terapêuticos acabam desencorajando a indústria a desenvolver medicamentos específicos, uma vez que estas necessitam de um número considerável de pacientes para provar a significância estatística dos benefícios da droga a ser estudada, antes da sua aprovação (CAPUCHA, 2010; PUCCI et al., 2019).

Outro fator preocupante é o rápido aparecimento e disseminação de bactérias multirresistentes (MDR), devido principalmente, ao uso generalizado e, muitas vezes, inadequado dos medicamentos antibacterianos (HOLMES et al., 2016; CASSINI et al., 2019). Embora alguns fármacos inovadores estejam em desenvolvimento, grande parte dos medicamentos lançados na última década, são derivados de classes terapêuticas já utilizadas, e

dessa forma, sujeitos aos mesmos mecanismos de resistência, o que tem levado a predições de um retorno a era pré-antibiótica (LE et al., 2019; LIU; BANAEI; REN, 2017).

Diante desta realidade, a comunidade científica tem buscado desenvolver e estudar propriedades farmacológicas de novas moléculas, a fim de superar tais desafios. Os triazenos (TZCs), que contituem uma classe de compostos químicos nitrogenados formados por três átomos de nitrogênio interligados em sequência (-N=NN), têm se destacado, pelo fato de já terem sido comprovadas suas diversificadas atividades biológicas como, antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química, documentadas em diferentes estudos (BONMASSAR et al., 2013; CIMBORA-ZOVKO et al., 2011; DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; PARAGINSKI et al., 2014; TIZOTTI et al., 2016).

Desde a descoberta dos efeitos antiproliferativos da cisplatina, há mais de 50 anos (ROSENBERG; VAN CAMP; KRIGAS, 1965), um vasto número de complexos metálicos têm sido desenvolvidos e investigados quanto ao seu potencial biológico (MJOS; ORVIG, 2014). Dentre esses, destacam-se os que apresentam cobre(II) na estrutura, devido a sua ampla versatilidade farmacológica, como antitumoral, antibacteriana e de clivagem hidrolítica e oxidativa do DNA superenovelado (GAMA et al., 2011; SANTINI et al., 2014).

Outra abordagem alternativa para o tratamento das doenças neoplásicas e infecciosas, pode surgir a partir do reposicionamento e/ou redirecionamento de fármacos, ou seja, investigar novos usos para drogas que já foram aprovadas clinicamente no tratamento de outras doenças (SERAFIN; HORNER, 2018; GELOSA et al., 2020; RASTELLI et al., 2020). Essa prática tem provado ser uma boa alternativa, uma vez que medicamentos reposicionados têm a vantagem de reduzir custos e o tempo de introdução no mercado quando comparados a produtos tradicionais, devido à disponibilidade de dados farmacocinéticos, toxicológicos e de segurança, que permitem uma redução nas falhas associadas ao desenvolvimento clínico (BROWN; PATEL et al., 2017; FOLETTO et al., 2021; ROSA et al., 2021).

Além disso, outro fator importante no redirecionamento é a possibilidade da ocorrência de combinação sinérgica entre diferentes medicamentos, as quais podem melhorar a eficácia da droga, diminuir a toxicidade e fornecer um espectro de atividade mais amplo do que a dos regimes monoterapêuticos (GELOSA et al., 2020; RANGEL et al., 2015; ZHENG; SUN; SIMEONOV et al., 2018). Diferentes estudos têm relatado atividade antineoplásica e antimicrobiana de um grande número de compostos utilizados no tratamento de condições patológicas não infecciosas, incluindo psicotrópicos como a sertralina e cardiovasculares como a metildopa (CHAN et al., 2017; FOLETTO et al., 2021; ROSA et al., 2021; SERAFIN et al., 2018; YOUNIS; THANGAMANI; SELLEM et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica *in vitro* de três compostos triazenos *N-óxidos* livres (M1, M2, M3), três complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) (C1, C2, C3), seus respectivos precursores (P1, P2, P3) e dos medicamentos, sertralina e metildopa, como alternativas no reaproveitamento de medicamentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de três compostos triazenos *N-óxidos* livres, três complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II), e seus respectivos precursores, bem como de medicamentos antineoplásicos (controle positivo), através de ensaio colorimétrico MTT, frente á linhagens celulares (tumerais: melanoma murino - B16F10, hepatocarcinoma humano – HepG2, glioblastoma multiforme - U87MG e T98G; não neoplásica: 292T - fibroblasto de rim embrionário) afim de definir sua atividade antitumoral e seletividade;
- Determinar a atividade antibacteriana de três compostos triazenos *N-óxidos* livres, três complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) e seus precursores, frente às cepas bacterianas padrão da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR por intermédio da concentração inibitória mínima, pelo método da microdiluição em caldo;
- Investigar a atividade de nuclease química de três compostos triazenos *N-óxidos* livres, três complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) e seus respectivos precursores, frente ao DNA plasmidial (pUC18) por intermédio de reações em diferentes, concentrações (3,75; 1,875 e 0, 375mM), pHs (7,4 e 8,0) e temperaturas (37° e 50° C);
- Investigar a atividade de nuclease química dos medicamentos sertralina e metildopa, frente ao DNA plasmidial (pUC18) por intermédio de reações em diferentes, concentrações (3,75; 1,875 e 0, 375mM), pHs (7,4 e 8,0) e temperaturas (37° e 50° C);

- Sugerir possíveis mecanismos envolvidos na clivagem do DNA plasmidial dupla fita, realizando reações na presença de sequestradores de radicais livres;
- Determinar a atividade antibacteriana dos medicamentos sertralina e metildopa, frente às cepas bacterianas padrão da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR, por intermédio da concentração inibitória mínima, pelo método da microdiluição em caldo;
- Avaliar atividade antibacteriana sinérgica entre os medicamentos sertralina e metildopa, e suas associações com o antibacteriano sulfametoxazol/trimetoprima, através da determinação do índice de concentração inibitória fracionada (FICI).
- Avaliar o nível de tolerância dos medicamentos sertralina e metildopa, associados ao antibiótico sulfametoxazol/trimetoprima, frente a cepas bacterianas padrão da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR.
- Apresentar o reposicionamento de fármacos, abordando as principais vantagens e usos deste processo, destacando o potencial demonstrado pela sertralina, frente a determinadas tipos de câncer e linhagens celulares tumorais, bem como sua atividade frente diferentes microrganismos, destacando especialmente frente a gêneros e espécies bacterianas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CÂNCER: CARACTERÍSTICAS GERAIS E TERAPÊUTICA

O câncer é definido como um conjunto distinto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células neoplásicas. Um dos fatores agravantes no câncer é a metástase, ou seja, a disseminação de células malignas do tumor primário para outros órgãos e tecidos, a qual é responsável por mais de 90% dos casos de mortes relacionados (INCA, 2020; SUNG et al., 2021). O câncer é uma doença de causa multifatorial, podendo ter origem na combinação de vários fatores, os quais podem ser intrínsecos (mutações hereditárias, condições imunológicas, entre outros) e/ou externos/adquiridos (tabagismo, alcoolismo, obesidade, radiação, poluentes ambientais, entre outros) (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021).

Diferentes abordagens terapêuticas têm sido empregadas no tratamento do câncer, como a quimioterapia, remoção cirúrgica, radioterapia, imunoterapia, entre outras (RAO; LAIN; THOMPSON, 2013). A quimioterapia é uma das mais utilizadas; trata-se de uma abordagem sistêmica que recorre a agentes químicos citotóxicos capazes de interagir com as células neoplásicas, erradicando ou controlando o crescimento do câncer. Porém, a maioria dos antineoplásicos convencionais atua de forma não específica, lesando tanto células cancerosas quanto normais e, conseqüentemente, ocasionando efeitos adversos. Além disso, muitos agentes citotóxicos são altamente mutagênicos, o que pode conduzir a um risco maior do paciente vir a desenvolver tumores secundários (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021).

Apesar dos avanços na compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer, a resistência aos fármacos antitumorais ainda é a principal causa de recidivas durante o tratamento antineoplásico. Na maioria das vezes, o rápido aparecimento de resistência torna necessária a utilização de altas doses de quimioterapia e combinações de agentes citotóxicos, levando a um aumento dos efeitos adversos. Além disso, as células neoplásicas são capazes de desenvolver resistência simultânea a diferentes agentes, bem como, às novas terapias direcionadas (INCA, 2020; TAN et al., 2020).

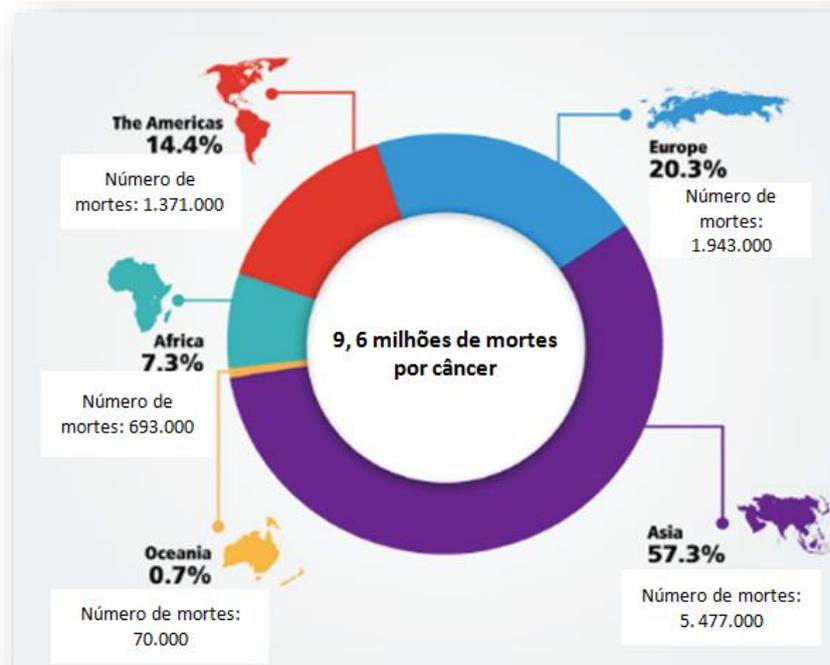
Em dezembro de 2019, um conjunto de casos de pneumonia causada por um coronavírus recém identificado foi anunciado em Wuhan, na China. Esse coronavírus foi inicialmente nomeado como novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV) pela OMS. Rapidamente, instalou-se uma epidemia de infecção aguda do trato respiratório pelo mundo, sendo a enfermidade denominada como doença pelo coronavírus 2019 (*coronavirus disease*

2019 - Covid-19), e o novo coronavírus como o vírus da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – Sars-CoV-2*), pela OMS, que há considerou pandemia, em março de 2020 (FERREIRA et al., 2020; GUAN et al., 2020; HU et al., 2021).

A Covid-19 se espalha principalmente pelo trato respiratório, através de gotículas e secreções respiratórias, sendo altamente transmissível entre seres humanos. Os fatores de risco para evolução com quadro clínico grave e morte por essa infecção incluem idade avançada e presença de comorbidades, como diabetes, doenças cardiovasculares além de baixa imunidade, característica comum em pacientes com câncer. Assim, a disseminação epidêmica do Sars-CoV-2 traz grandes desafios para a prática clínica na área da oncologia, uma vez que, pacientes com essas doenças, possuem risco maior de sofrerem de complicações graves se forem contaminadas pelo coronavírus (HANNA et al., 2020; LIANG et al., 2020).

Frente a essa realidade, e às elevadas taxas de mortalidade ocasionadas pelo câncer, se faz necessário o desenvolvimento constante de estudos que possam otimizar os resultados da terapia antineoplásica (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021). Na figura 1 são apresentados os números de óbitos por câncer no mundo registrados em 2018.

Figura 1: Número de óbitos por câncer no mundo no ano de 2018.



Fonte: Adaptado da *International Agency for Research on Cancer – IARC*, 2018.

4.1.1 Glioblastoma Multiforme

Os tumores que acometem o sistema nervoso central (SNC) representam 3,5% das doenças neoplásicas, porém estão entre os mais complicados devido ao prognóstico geralmente desfavorável e as baixas taxas de sobrevida (INCA, 2020; TAN et al., 2020). Aproximadamente 50% dos tumores cerebrais originam-se de células nervosas denominadas células gliais. Tumores que se originam a partir dessas células, são denominados gliomas. Existem diferentes tipos de gliomas, o mais comum desenvolve-se a partir de células gliais chamadas astrócitos. Tumores dessa natureza são denominados como astrocitomas, destacando-se entre estes, o glioblastoma multiforme (GBM) (BRAY et al., 2018; MENEGASSO et al., 2020; SOUSA; CRISTOFARO; SERAFIN et al., 2015).

O GBM é classificado de acordo com seu grau de malignidade como de I a IV, sendo o grau IV, o mais agressivo e com pior prognóstico ao paciente. Apesar de ser relativamente raro, tumores dessa natureza contribuem de forma significativa, para a mortalidade no mundo. Podem se manifestar em qualquer idade, mas é mais frequente em adultos com idade mediana de 64 anos, afetando mais homens que mulheres. A maioria dos sintomas desse transtorno inclui pressão intracraniana, cefaléia e déficits neurológicos focais e progressivos (BRANDSHAW et al., 2016; BRAY et al., 2018; DI CARLO et al., 2017; TAN et al., 2020).

O GBM é altamente resistente aos tratamentos anticâncer disponíveis, o que torna crucial encontrar novas estratégias terapêuticas destinadas a melhorar o mau prognóstico dos pacientes que sofrem desta doença (LEE, 2016; TAN et al., 2020). Tradicionalmente, as opções terapêuticas nesses pacientes consistem em extirpação cirúrgica do tecido tumoral seguida de radioterapia e altas doses de quimioterapia com o agente alquilante de DNA temozolamida, considerado padrão-ouro para o tratamento desse tipo de câncer. No entanto, o prognóstico ainda permanece desfavorável, e a taxa de sobrevida média, varia em torno de 6 a 14 meses após o diagnóstico, o que torna esses tumores, um problema de saúde pública (MENEGASSO et al., 2020; PEDRETTI et al., 2019; SKAGA et al., 2019; SOUSA et al., 2015; TAN et al., 2020).

4.1.2 Melanoma Maligno

O melanoma maligno é a forma mais grave de câncer de pele, sendo a causa mais frequente de morte entre as doenças que atingem esse órgão. A Sociedade Americana de Câncer previu que em 2040, os casos de melanoma chegarão a quase meio milhão (466.914 casos), um aumento de 62%. As mortes aumentarão 20%, passando de 60.712 casos ocorridos em 2018 para 72.886 casos em 2025 (IARC, 2020).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o melanoma corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Embora represente 4,6% das neoplasias malignas da pele, é o tipo mais grave, devido à alta possibilidade de provocar metástases para outros órgãos. Em 2018 foram registrados 6.260 novos casos da doença, que atingiu 2.920 homens e 3.340 mulheres, sendo que o Instituto prevê que ocorra um aumento de 8.4 mil novos casos de melanoma maligno para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2020).

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em sua fase inicial. Geralmente, os primeiros sinais ocorrem com o surgimento de uma alteração pigmentada na pele ou modificações de tamanho, forma ou cor de uma pinta ou mancha pré-existente (INCA, 2018). Um dos métodos padrão de diagnóstico e tratamento do melanoma é representado pela ressecção cirúrgica, devido à fácil acessibilidade, principalmente em pacientes com estágio inicial da doença. Entretanto, no melanoma *in situ*, o procedimento cirúrgico não é suficiente, pois geralmente há recorrência local e metástases, que se desenvolvem na maioria dos pacientes após período variável de tempo (MOTOFEI, 2019).

Diferentes métodos têm sido testados e utilizados, com objetivo de melhorar o difícil manejo terapêutico de pacientes com melanoma maligno. Dentre esses, encontra-se, a quimioterapia (dacarbazina, temozolomida), eletroquimioterapia (combinando bleomicina e cisplatina com pulsos elétricos de alta intensidade), bioquimioterapia (a combinação de quimioterapia e imunoterapia), terapia fotodinâmica e radioterapia (KOZOVSKA; GABRISOVA; KUCEROVA et al., 2016; MOTOFEI, 2019). Esses tratamentos estão melhorando a sobrevida e reduzindo as taxas de mortalidade, entretanto, se faz necessário o desenvolvimento de novas opções de tratamento que possibilitem a cura de pacientes com essa doença.

O melanoma, muitas vezes é descoberto acidentalmente pelos próprios pacientes ou seus familiares, através de autoexame da pele. Esse, demonstra a importância de se estar atento a alguma mudança que pode ocorrer na pele, e da sensibilização de pessoas de maior

risco, como as de pele clara e/ou com história pessoal ou familiar deste câncer. Isso possibilita que, com a identificação de lesões suspeitas, o diagnóstico desse câncer possa ser realizado precocemente por um profissional de saúde especializado (INCA, 2020; PURIM et al., 2020).

A Sociedade Brasileira de Dermatologia (2019) e a *American Cancer Society* (2019) defendem a regra do ABCDE, um guia para a identificação de sinais sugestivos do melanoma, baseado na observação das características de nevos (pintas): assimetria, bordas, cor, diâmetro e evolução (Figura 2). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC/OMS), entretanto, em uma publicação de 2006, chamou a atenção para as limitações dessa regra quando aplicada em lesões pequenas, pois pequenos melanomas podem não apresentar características tão claras. Da mesma forma, nevos melanocíticos benignos podem ter características atípicas, reduzindo a sensibilidade da regra do ABCDE.

Figura 2 - Regra do ABCDE de identificação do câncer de pele melanoma.



Fonte: Adaptado do boletim ano 7, nº 3, referente ao monitoramento das ações de controle do câncer de pele, Inca (2016).

4.1.3 Hepatocarcinoma - CHC

O hepatocarcinoma (CHC) ou carcinoma hepatocelular, é uma neoplasia epitelial maligna primária do fígado, ocasionada por uma multiplicação excessiva das células hepáticas na tentativa de reparar lesões no órgão. Devido a essa multiplicação excessiva, podem ocorrer erros durante a multiplicação celular, levando ao surgimento do tumor. Esse é o 6º tipo mais comum de câncer no mundo e um dos mais letais. A incidência global anual estimada é de 500.000 a 1.000.000 de casos, levando a mais de 700.000 mortes por ano (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021). No Brasil, é encontrado em 4,6 casos a cada 100.000 pessoas, sendo que em 2019, o número de mortes atribuíveis, foi de 10.902 casos (6.317 homens e 4.584 mulheres) (INCA, 2021).

Este é o tipo mais comum de ser observado dentre as neoplasias hepáticas, representando cerca de 85% de todos os casos no mundo (CHAGAS et al., 2020). É extremamente agressivo, porém silencioso, sendo frequentemente diagnosticado em estágios mais avançados, quando os sintomas começam a surgir, decorrentes da perda da função do fígado e também das lesões hepáticas pré-existentes, com altas taxas de mortalidade. Desenvolve-se tipicamente em pacientes cirróticos, porém, cerca de 20% dos casos se manifesta em pacientes sem a doença (GADDIKERI et al., 2014). Os picos de incidência ocorrem geralmente, na segunda e na sétima décadas de vida acometendo duas vezes mais homens do que mulheres, sendo a quinta causa mais frequente de neoplasias em homens e a sétima em mulheres (CHAGAS et al., 2020; GAO, 2015; MORIGUCHI; UMEMURA; ITOH et al., 2016).

As terapias para CHC dependem do estágio da doença. Nos estágios iniciais, a cirurgia representa o tratamento padrão com aumento da sobrevida em aproximadamente 5 anos em 70% dos pacientes tratados. Quando a cirurgia ou transplante de fígado não são aplicáveis, terapias loco-regionais (radiofrequência, ablação térmica e não térmica, e embolização transarterial) representam uma segunda linha de terapia, com taxas de sobrevida que variam de 3 a 5 anos (INCA, 2021; SALHAB; CANELO et al., 2011; SUNG et al., 2021). Já quando o tumor é diagnosticado em estágio avançado, as terapias sistêmicas aprovadas são representadas pelo sorafenibe e regorafenibe, tratamentos de primeira e segunda linha, respectivamente (KUDO et al., 2018).

4.2 INFECÇÕES BACTERIANAS: RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana frente aos antimicrobianos constitui preocupação crescente para a comunidade médica, uma vez que as opções terapêuticas, têm se tornado cada vez mais restritas. Essa pode ocorrer devido a múltiplos fatores, mas principalmente está associada ao uso irrestrito e indiscriminado desses agentes (CASSINI et al., 2019; HAGHIGHATPANAH et al., 2016; HSU, 2020; KARAM et al., 2016).

O fenômeno da resistência se caracteriza pela capacidade dos microrganismos resistirem à ação inibitória ou bactericida de uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Dentre os principais mecanismos de resistência relata-se: alteração da permeabilidade celular ao antimicrobiano; expulsão do antimicrobiano por bombas de efluxo; alteração do sítio de ação do antimicrobiano e inativação enzimática do agente antimicrobiano (ANVISA, 2020; ASTOLFI et al. 2017). Este se tornou um problema de grandes proporções, devido aos elevados índices de morbimortalidade associados. Antes do século XXI, ocorria predominantemente em ambientes hospitalares, mas com o passar dos anos, as infecções por bactérias resistentes passaram a ocorrer em diversos ambientes podendo atingir, inclusive, indivíduos hígidos (GOOL; FARIA, 2014; PAIM; LORENZINI, 2014).

Dessa forma, o fracasso em descobrir novas classes de antimicrobianos tem levado a previsões de uma catástrofe médica e um retorno à era pré-antibiótica. Embora novos fármacos estejam em desenvolvimento, não satisfazem adequadamente as crescentes necessidades terapêuticas (CARVALHO; FONTES, 2014; LIU; BANAEI; REN, 2017). Além disso, as infecções bacterianas tratadas sem sucesso ceifam pelo menos 700.000 vidas por ano em todo o mundo e estão projetadas para estar associadas à morte de 10 milhões de pessoas por ano até 2050, o que significa mais mortes do que as ocasionadas pelo câncer, com um custo previsto de US\$ 100 trilhões para a economia global (STRATHDEE et al., 2020).

Durante a atual pandemia do coronavírus (COVID-19), existem ameaças potenciais que podem impulsionar ainda mais esse fenômeno. Embora a Covid-19 seja uma doença viral não afetada por antibióticos, pacientes acabam recebendo esses medicamentos como forma profilática e terapêutica. O aumento no número de internações hospitalares acaba aumentando o risco de infecções associadas aos cuidados de saúde e a chance de transmissão de organismos multirresistentes, o que pode colocar as conquistas da medicina moderna em risco, uma vez que o fenômeno é mais rápido do que o desenvolvimento de novos fármacos (HSU, 2020; LUCIEN et al., 2021; PELFRENE et al., 2021).

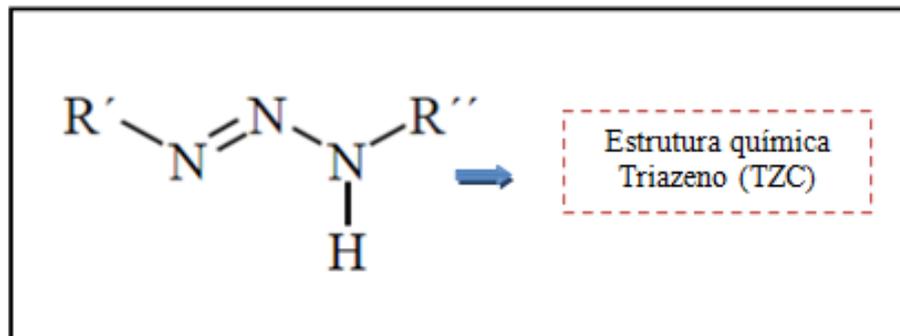
4.3 TRIAZENOS (TZCs) - COMPLEXOS DE METAIS DE TRANSIÇÃO

O estudo dos TZCs teve seu início em 1859, pelo químico industrial Johann Peter Griess, que sintetizou o primeiro triazeno, o TZC,1,3-*bis*(fenil)-triazeno (GRIESS, 1858). Desde então, a pesquisa e a síntese de compostos dessa natureza, vêm evoluindo e ganhando mais incentivo e destaque, principalmente a partir da aprovação do uso da Dacarbazina® (DTIC) e do Temozolomide® (TMZ). Esses quimioterápicos são utilizados no tratamento clínico de diferentes tumores, incluindo melanomas, linfomas, sarcomas, tumores cerebrais primários e metastáticos (BONMASSAR et al., 2013; CHABNER et al., 2012).

Pesquisas relataram que variações na estrutura química destes compostos, podem conferir diferentes propriedades aos derivados TZCs, tais como atividade antifúngica, antileucêmica e antibacteriana (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; MOHAMMADI, 2014; TIZOTTI et al., 2016).

Em relação à ação antibacteriana demonstrada pelos compostos TZCs, é proposto que a mesma ocorre devido à atividade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular das bactérias, inibindo etapas da síntese bacteriana, que conduzem à morte celular (HÖRNER et al., 2008; OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI et al., 2012; YEO et al., 2013). Ainda, visando aumentar a atividade biológica e estabilidade dos TZC nos medicamentos há um crescente interesse na associação destes compostos com metais, especialmente o cobre, além de interações intermoleculares com derivados aromáticos (KARAMI et al., 2017; MARTINS et al., 2017; SREEDHARA; COWAN, 2001). Na figura 3 é apresentada a estrutura química de um triazenos clássico.

Figura 3 - Esquema representativo de um triazeno clássico R' e R'' = alquil ou aril.



4.3.1 Complexos de Cobre (II)

Os compostos de coordenação apresentam um amplo campo de estudos dentro da química inorgânica, como por exemplo: atividade biológica, comportamento magnético, aplicação em medicamentos e como catalisadores. Dentre estes compostos, destaca-se o cobre (Cu) (SANTINI et al., 2014). Esse é um elemento importante para os sistemas biológicos e pode estar presente na forma oxidada Cu(II) ou reduzida Cu(I). Desempenha funções na fisiologia das células, sendo um componente catalítico para muitas enzimas (citocromo oxidase, tirosinase, superóxido dismutase, entre outras), além de apresentar funções na respiração mitocondrial e na absorção do ferro no organismo (LINDER et al., 2012; CANAKCI et al., 2018).

Devido a sua atividade bioessencial, biocompatibilidade e natureza oxidativa, complexos de Cu(II) têm atraído a atenção dos pesquisadores, que visam suas aplicações nas diferentes áreas da medicina (GAMA et al., 2011). Assim, estudos têm demonstrado que complexos de Cu(II), apresentam promissoras atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais, antibacterianas e de nuclease química, sugerindo que a funcionalização de compostos com este metal, poderá gerar novas moléculas bioativas (GAMA et al., 2011; LI et al., 2011; SANTINI et al., 2014).

4.3.2 Derivados de óxido de triazeno

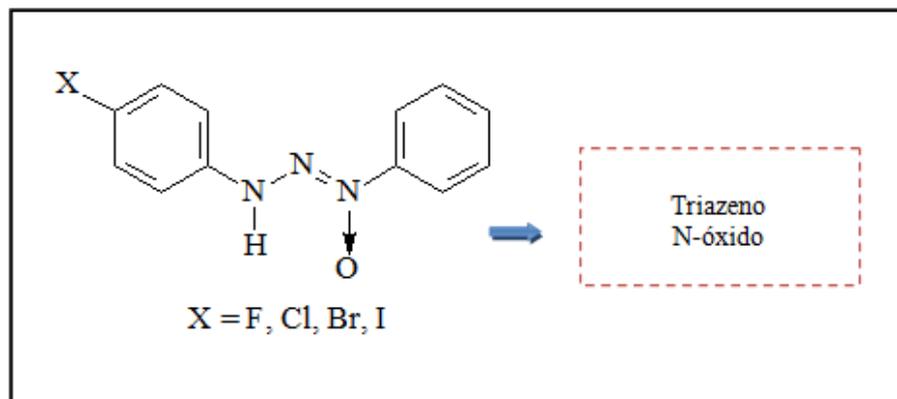
Os derivados de óxido de triazeno são uma classe importante de moléculas devido ao caráter de basicidade dos átomos coordenadores oxigênio e nitrogênio. Estas espécies têm diferentes aplicações na área da química e biologia, possibilitando o desenvolvimento de sensores, displays eletrônicos, e de medicamentos anticancerígenos (MARTINS et al., 2017).

Os compostos discutidos neste estudo pertencem à classe dos triazenos *NI-óxidos* que derivam dos triazenos clássicos, pela substituição do átomo H no fragmento –N(H) por uma função hidroxila (OH), resultando em um sistema tautômero de um *N-óxido/N-hidróxido* triazeno (MORAES, 2018).

Neste estudo a estrutura base de 1,3-bis(fenil) triazeno foi alterada pela substituição de 4-para-halofenil(*p-Cl*, *p-Br*, *p-I*), além da substituição de N(H) por N(OH) formando moléculas de hidroxitriazenos ou de seus tautômeros trizenos *N-óxidos* (MARTINS et al.,

2017; MORAES, 2018). Na figura 4, é apresentada a estrutura genérica da molécula 3-(4-halofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido (X = halogênio).

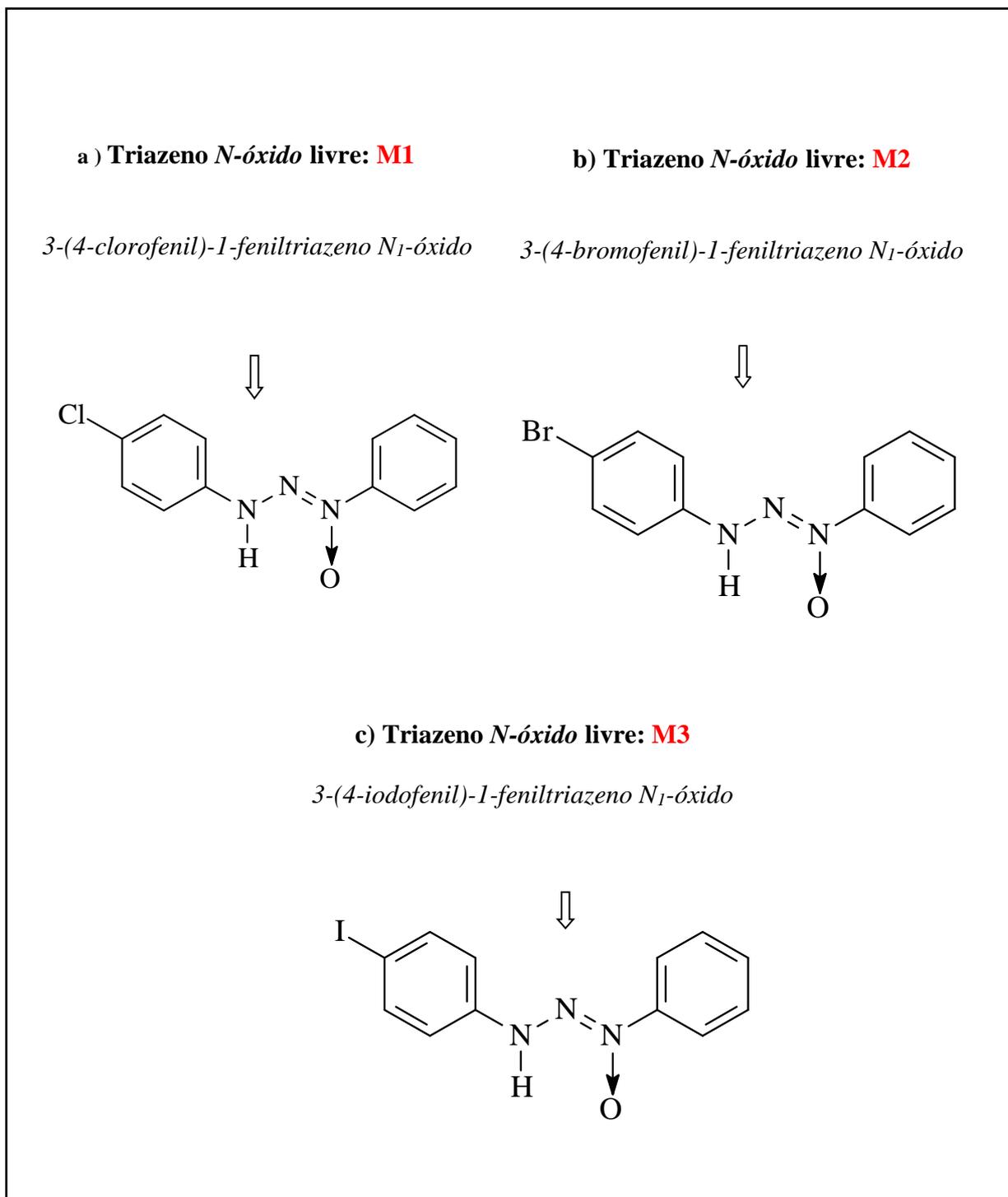
Figura 4 - Estrutura genérica da molécula 3-(4-halofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido (X = halogênio).



Fonte: Elaborada pela autora.

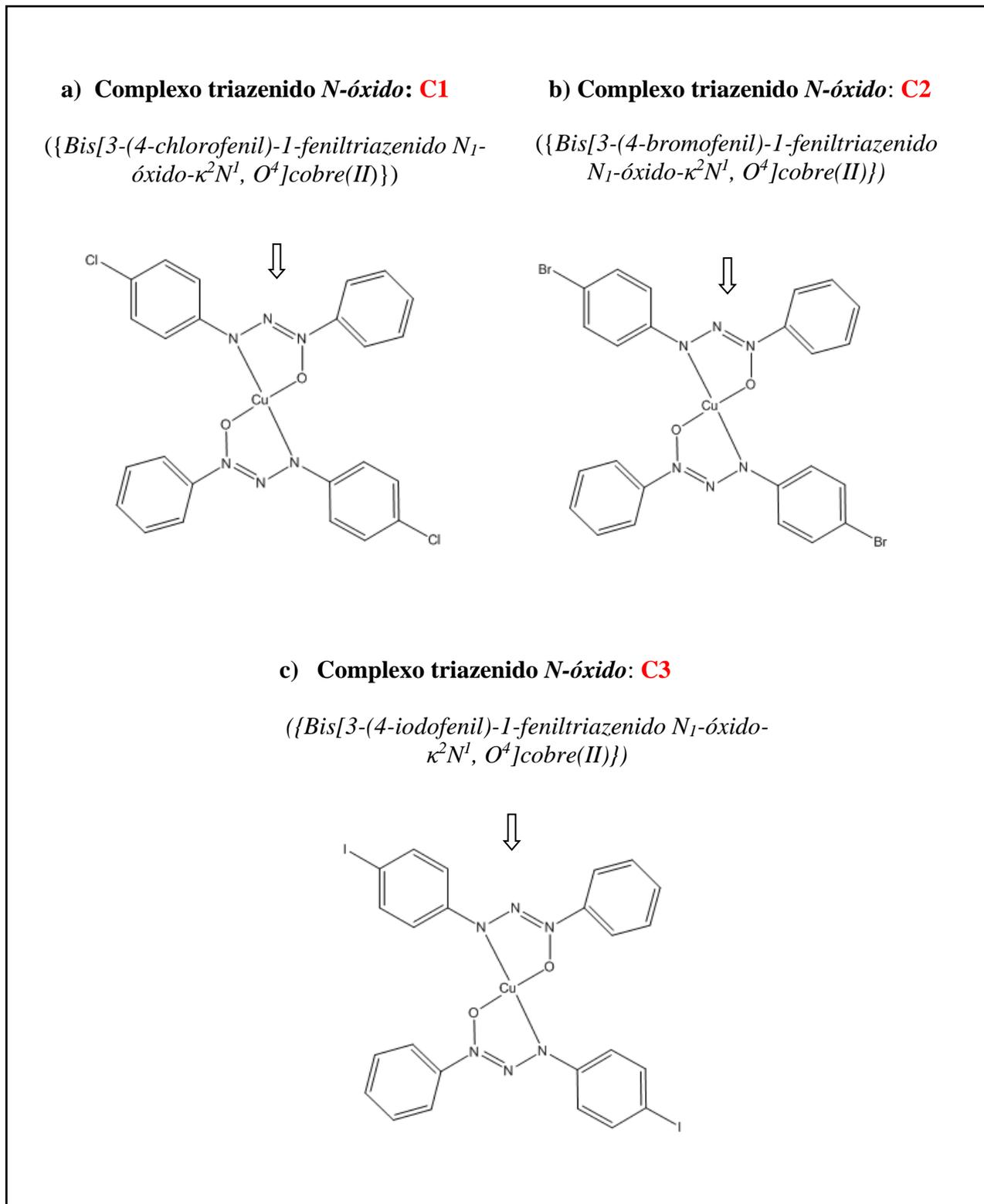
As moléculas N -óxidos avaliadas neste estudo, sendo: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), os complexos triazenidos N -óxidos de Cu (II), **C1** ({*Bis*[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1$, O^4]cobre(II)}), **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1$, O^4]cobre(II)}); **C3**{*Bis*[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1$, O^4]cobre(II)} e os precursores **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina), utilizados para a síntese do respectivo triazeno N_1 -óxido, foram cedidas para investigação de sua atividade biológica, pelo NITriCo - Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da UFSM, através de parceria interlaboratorial. Suas estruturas químicas são apresentadas nas figuras 5, 6 e 7.

A síntese e caracterização de **M1**, **M2** e **M3**, já foram elucidadas na publicação de Martins e colaboradores, no periódico *CrystEngComm* em novembro de 2017 (MARTINS et al., 2017). Já os complexos triazenidos N -óxidos **C1**, **C2** e **C3**, resultantes da coordenação das moléculas **M1**, **M2** e **M3** desprotonadas na forma dos respectivos ânions ligantes, foram caracterizadas e sintetizadas por MORAES, G. A. (2013). Os resultados desse estudo estão sendo organizados em forma de artigo pelo grupo NITriCo, e serão enviados para publicação em um periódico científico.

Figura 5 – Estrutura química dos compostos triazenos *N*-óxidos livres (M1, M2, M3).

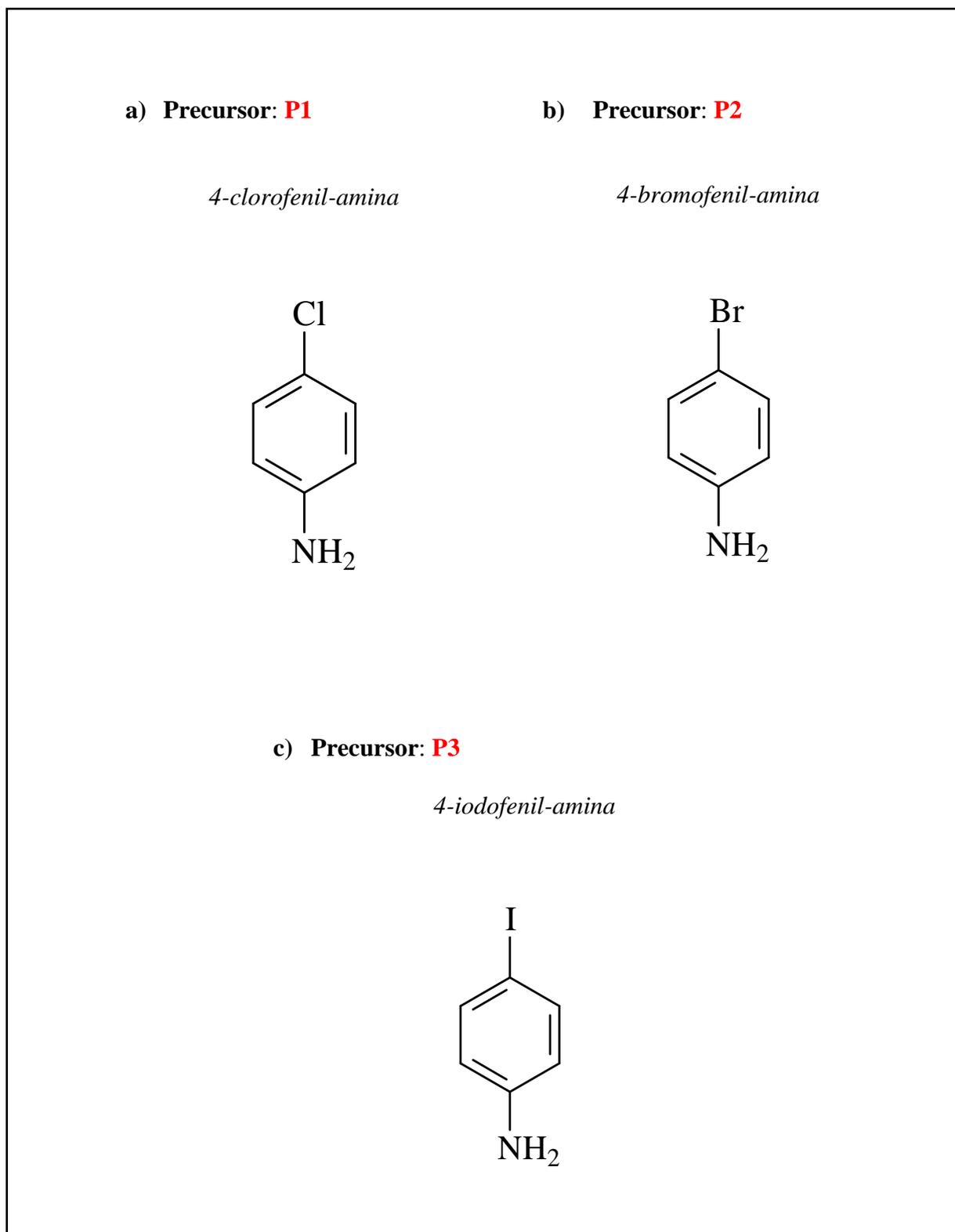
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 - Estrutura química dos complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Estrutura química dos precursores (P1, P2, P3).



4.4 ATIVIDADE DE NÚCLEASE QUÍMICA

4.4.1 Clivagem do DNA plasmidial

A clivagem do DNA (ácido desoxirribonucleico) é um processo vital para os sistemas vivos (GOWDA et al., 2014). Moléculas capazes de clivar o DNA têm grande valor nos campos da medicina, biologia molecular e engenharia genética pela capacidade de também atuarem como quimioterápicos (SILVA et al., 2011; GOWDA et al., 2014).

As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou cortar, a ligação fosfodiéster das moléculas de ácidos nucleicos (SILVA et al., 2011; JEKIMOVVS et al., 2014). As nucleases químicas mais eficientes apresentam íons de metais de transição em seus sítios ativos, sendo o fármaco bleomicina, um exemplo clássico de nuclease artificial. Esse medicamento é utilizado como agente antineoplásico, sendo que sua atividade citotóxica resulta de lesão oxidativa da timidilato desoxirribose e outros nucleosídeos, ocasionando cisão do DNA (GAMA et al., 2011).

Existem basicamente duas formas de clivagem do DNA, uma oxidativa e outra hidrolítica. A clivagem oxidativa pode ocorrer no carboidrato ou na base. Possui uma aplicação limitada, pois frequentemente gera radicais livres, os quais são indesejáveis ao organismo, pois apresentam um papel crítico em vários processos biológicos, incluindo mutagênese e carcinogênese (GAMA et al., 2011; GOWDA et al., 2014).

Esse mecanismo requer a adição de um agente externo como peróxido de hidrogênio ou luz para iniciar a clivagem. Além disso, não gera fragmentos com finais 3'-OH e 5'-PO₄ como os que são produzidos pelas nucleases naturais, dessa maneira, os ácidos nucleicos clivados por esses agentes oxidativos não podem ser religados enzimaticamente, tornando limitada sua utilização em toda a biologia molecular e biotecnologia (GOWDA et al., 2014).

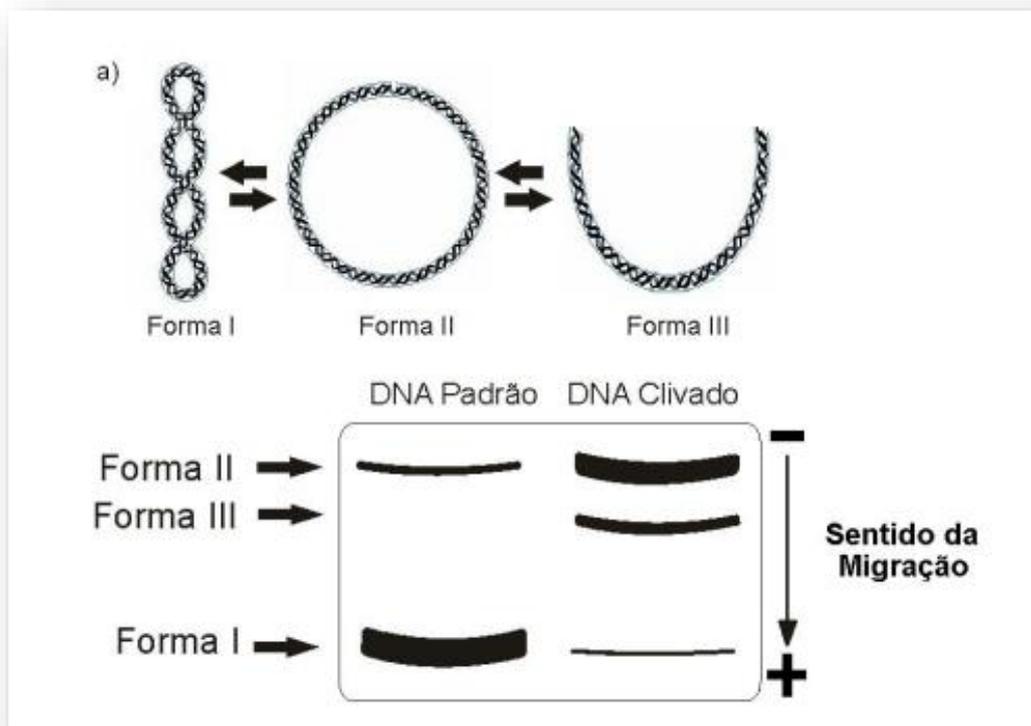
A clivagem hidrolítica ocorre no grupamento fosfato, gerando fragmentos 3'-OH e 5'-PO₄, os quais podem ser religados utilizando as enzimas T4-DNA ligase e ATP DNase (GAMA et al., 2011; SILVA et al., 2011). Apresenta vantagem, pois não produz radicais livres, o que leva a busca e preferência por moléculas que utilizem esse mecanismo de ação (GAMA et al., 2011; GOWDA et al., 2014).

Para a elucidação do mecanismo de clivagem de compostos aptos a clivar o DNA, podem ser realizadas reações na presença de sequestradores de radicais livres como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tiouréia. Essas moléculas são capazes de sequestrar radicais hidroxil (OH[•]) da solução e desse modo, pode-se definir se o mecanismo de clivagem é

oxidativo ou hidrolítico. Se a presença desses sequestradores inibir a clivagem, significa que as espécies reativas são essenciais para que a clivagem ocorra, sugerindo que o mecanismo é oxidativo e depende de radicais livres. Caso essa clivagem não seja inibida, o provável mecanismo é hidrolítico (GAMA et al., 2011; GOWDA et al., 2014; SILVA et al., 2011).

A clivagem do DNA plasmidial, nos mostra que o superenovelamento (forma I) da molécula de DNA tensionada pode sofrer um corte em uma das fitas, desenrolando a super-hélice e conseqüentemente, passando à forma circular aberta (forma II). Um segundo corte, agora na fita oposta, leva a abertura do DNA circular obtendo a forma linear do plasmídio (forma III). Estas três conformações de DNA plasmidial apresentam mobilidade diferente devido ao grau de compactação das moléculas, tornando possível a completa separação das fitas e quantificação das formas (OLIVEIRA, 2006). A figura 8 representa um modelo de eletroforese em gel de agarose, na qual são mostrandas as diferentes formas de DNA plasmidial.

Figura 8 - 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).



4.5 REDIRECIONAMENTOS DE MEDICAMENTOS

Os termos “*drug repositioning*” e “*drug repurposing*” foram descritos pela primeira vez por Ashburn e Thor em 2004. De acordo com esses pesquisadores, este é o processo de busca de novos usos para drogas já aprovadas clinicamente no tratamento de outras doenças (ASHBURN; THOR, 2004). Essa prática despertou a atenção e o interesse por parte da comunidade científica, sendo considerado um método atraente por apresentar vantagens em relação à busca tradicional de substâncias ativas, uma vez que reduz os riscos no processo de desenvolvimento devido à disponibilidade de dados farmacológicos e de segurança já conhecidos (BROWN; PATEL, 2017; LI et al., 2016; MEHNDIRATTA et al., 2016).

Enquanto a descoberta tradicional de medicamentos, desde a identificação do alvo até seu desenvolvimento e aprovação leva em torno de 10 a 17 anos, a aprovação de um medicamento já existente pode levar de 3 a 12 anos, o que fornece opções de tratamentos mais rápidas aos pacientes (BRAUN et al., 2010). Além disso, o custo para relançar o reposicionamento de um medicamento é razoável, e gira em torno de 40 a 80 milhões de dólares, enquanto que o lançamento de uma nova droga pode chegar à soma de 2 bilhões de dólares (PAPAPETROPOULOS; SZABO, 2018).

Outro fator importante relacionado ao redirecionamento é a possibilidade da ocorrência de combinações sinérgicas entre medicamentos, uma vez que as interações sinérgicas podem melhorar a eficácia da droga, diminuir a toxicidade e fornecer um espectro de atividade mais amplo do que a dos regimes monoterapêuticos (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2017). Braun e colaboradores (2010) relatam que as taxas de sucesso apresentadas por fármacos reposicionados chegam a ser até 30% mais altas quando comparadas com a de novos medicamentos lançados no mercado, o que levou a *Food and Drug Administration* (FDA) a aprovar essa prática (BRAUN et al., 2010).

Entretanto, embora as pesquisas científicas tenham progredido rapidamente no campo do redirecionamento de medicamentos, sua implementação ainda enfrenta obstáculos. Além dos obstáculos financeiros, estão os problemas regulatórios, os quais devem ser abordados para sua otimização, sendo necessária a criação de incentivos que possam estimular o envolvimento da indústria farmacêutica, favorecendo as opções para seu desenvolvimento comercial (VERBAANDERD et al., 2017).

Com a pandemia de Covid-19, ainda não foram estabelecidos tratamentos baseados em evidências científicas sólidas. Entretanto, cientistas do mundo todo, tem se mobilizado na

busca por novos tratamentos e o reposicionamento terapêutico de fármacos surgiu naturalmente como uma opção rápida e viável no atual cenário global (ZOST et al., 2020).

Diferentes estudos têm relatado atividade antineoplásica e antimicrobiana de um grande número de compostos utilizados no tratamento de condições patológicas não infecciosas (AYAZ et al., 2015; SAMANTA et al., 2012; CHAN et al., 2017 ; FOLETTO et al., 2019; ROSSATO et al., 2016; ROSA et al., 2019; SERAFIN et al., 2018). Destacamos os psicotrópicos como a sertralina e os anti-hipertensivos como a metildopa.

4.5.1 Sertralina

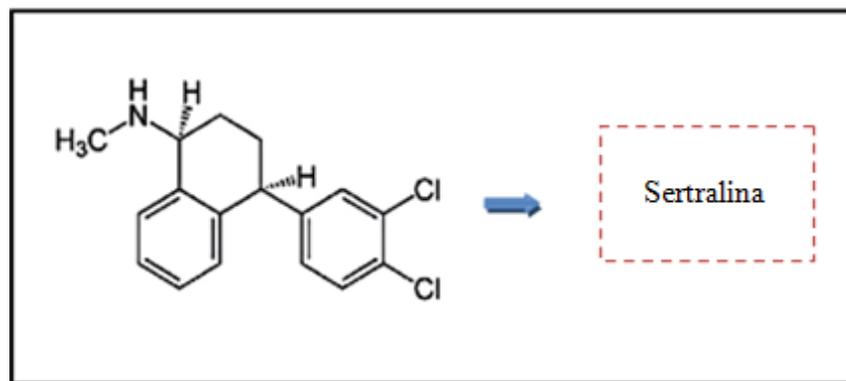
A sertralina é um inibidor da recaptação da serotonina (IRS), amplamente utilizada no tratamento da depressão e dos transtornos de ansiedade excessivos. Além disso, esse medicamento é geralmente o fármaco de escolha para tratar pacientes com câncer metastático, que geralmente desenvolvem quadros de ansiedade e depressão, devido a sua segurança e eficácia (KAST; HALATSC et al., 2012; TORTA et al., 2008).

Diferentes estudos relatam que a sertralina é capaz de induzir a citotoxicidade em linhagens celulares de câncer de próstata (HUANG et al., 2011) e câncer de boca (CHIEN et al., 2011). A mesma também inibiu a proliferação de uma linhagem de células do glioma (U87) em concentrações mais baixas que as apresentadas no estudo, pelo medicamento padrão temozolomide® (TZADOK et al., 2010). Além disso, Xia e colaboradores (2017) investigaram seus efeitos na leucemia mielóide aguda (LMA), relatando que esta induziu apoptose e autofagia não apenas nas linhagens celulares, mas também nas células primárias de pacientes portadores da doença avaliados no estudo. Esses resultados forneceram novas perspectivas para explorar estratégias alternativas para a terapia das leucemias.

A sertralina faz parte do protocolo para tratamento do glioblastoma recorrente desde 2013, juntamente com o temozolomida e outros seis fármacos (KAST; HALATSC et al., 2012). Embora a atividade antitumoral das drogas psicotrópicas tenha atraído atenção, não está completamente esclarecido como exercem suas funções. Estudos relatam que a sertralina pode se ligar diretamente na proteína tumoral controlada por translação (TCTP), envolvida na regulação de processos celulares fundamentais e superexpressa em diferentes tipos de tumores, sendo capaz de interromper sua interação com proteínas parceiras, diminuindo a concentração intracelular levando a uma redução do tumor (ACUNZO et al., 2014; TELERMAN; AMSON, 2009).

O mecanismo de ação antimicrobiano da sertralina também não está totalmente elucidado, entretanto, pesquisas relatam que compostos que possuem anéis de benzeno na estrutura, como esse medicamento, podem apresentar atividade antimicrobiana (SAMANTA et al., 2012). Munoz-Bellido, Munoz-Criado e Garcia-Rodríguez (2000), sugerem que a ação antibacteriana da sertralina pode ocorrer através da inibição das bombas de efluxo, uma vez que é consenso que este medicamento atua com este mecanismo em células humanas (MUNOZ-BELLIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2000). Já para Hadera e colaboradores (2018), tal atividade ocorre, devido a inibição da formação da parede celular e/ou pela inibição da divisão celular dos microrganismos. Na figura 9 é apresentada a estrutura química do medicamento sertralina.

Figura 9 - Estrutura química do medicamento sertralina.



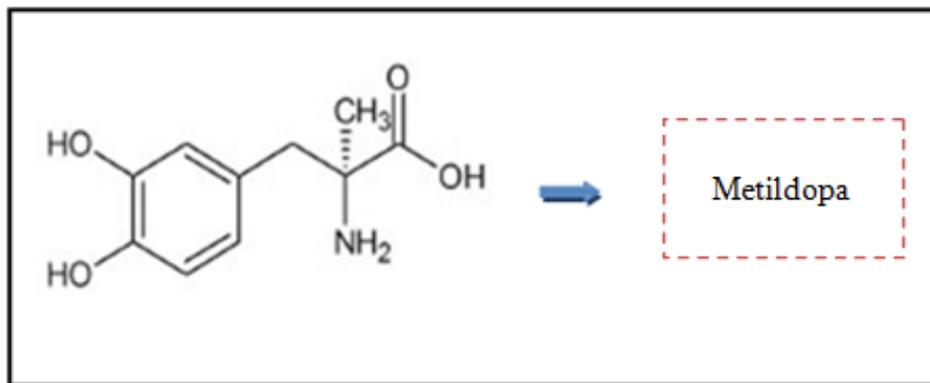
Fonte: Adaptado de Macedo et al., 2017.

4.5.2 Metildopa

A metildopa (α -metil-3,4-di-hidroxi-fenilalanina) é um fármaco anti-hipertensivo, amplamente utilizada no controle da hipertensão arterial moderada a grave. Atua como um agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos, inibindo a liberação de norepinefrina. Como resultado, ocorre menor ativação do sistema nervoso autônomo simpático, diminuição da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, redução da pressão arterial (BUENO; PEREIRA, 2015; HARDMAN; WEINBERG et al., 2012).

Estudo relata que a metildopa apresentou notável atividade antibacteriana em ensaio contra 405 cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo um variado número de gêneros, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) variando de 10-200 μ g/ mL. Além disso, o medicamento apresentou atividade antimicobacteriana contra micobactérias de diversas espécies (DASTIDAR et al., 1986). Na figura 10 é apresentado a estrutura química do medicamento metildopa.

Figura 10 - Estrutura química do medicamento metildopa



Fonte: Adaptado de Bueno e Pereira, 2015.

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado, “*Antimicrobial and antineoplastic properties of sertralina*” foi aceito no periódico “*American Journal of Therapeutics*” em maio de 2019. Este periódico é classificado de acordo com o qualis Capes biênio 2013-2016 como B2 para área da farmácia.

O mesmo foi publicado na edição Nov/Dez de 2020:

American Journal of Therapeutics. v. 27, n. 6, p.632-635.

Doi: 10.1097/MJT.0000000000001022.

View Letter

[Close](#)

Date: May 16, 2019
To: "ROSMARI HÖRNER" rosmari.ufsm@gmail.com
From: "American Journal of Therapeutics" PManu@nshs.edu
Subject: AJT Decision

May 16, 2019

RE: AJT-2019141R1, entitled "Antimicrobial and antineoplastic properties of sertraline"

Dear Dr HÖRNER,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in American Journal of Therapeutics. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

Thank you for submitting your interesting contribution to the journal.

With Kind Regards,

Dr. Peter Manu
Editor-in-Chief
American Journal of Therapeutics

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. [\(Remove my information/details\)](#). Please contact the publication office if you have any questions.

Antimicrobial and antineoplastic properties of sertralina

Angelita Bottega¹, Marissa Bolson Serafin², Taciéli Fagundes da Rosa³, Vitória S. Foletto⁴,
Catrine de Souza Machado⁵, Silvana Silveira Coelho⁶, Amanda Mainardi⁷, Rosmari Hörner⁸.

¹ Doutoranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: angelitabotega@yahoo.com.br

² Doutoranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: mbs_1304@hotmail.com

³ Mestranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: tacelifagundesdarosa@gmail.com

⁴ Mestranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: vitoria_sfoletto@yahoo.com.br

⁵ Mestranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: catrinesmachado@gmail.com

⁶ Mestranda, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: silvana.scoelho@hotmail.com

⁷ Acadêmica curso de farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: maainardiamanda@gmail.com

⁸ Doutora, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: rosmari.ufsm@gmail.com

Correspondence: Dra. Rosmari Hörner.

Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria - UFSM. Avenida Roraima, 1000 - Cidade Universitária, Camobi, CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS, Brazil. Phone: 55 3220-8751; Mobile: 55 99111-9691. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com.

Antimicrobial and antineoplastic properties of sertraline

Dear editor,

In recent decades, there has been a considerable increase in neoplastic, infectious, fungal and parasitic diseases. This phenomenon, coupled with the scarcity of new therapeutic agents and the rapid onset of resistance to available medicines, has become a clear public health problem worldwide¹⁻⁴.

Given this reality, an alternative approach to the treatment of these diseases can arise from the repositioning and / or redirection of drugs, that is, investigate new uses for drugs that have already been clinically approved in the treatment of other diseases⁵⁻⁷. This practice has proven to be a good alternative, since repositioned medicines have the advantage of reducing costs and time to market when compared to the development of a traditional product. This fact, due to the availability of pharmacokinetic, toxicological and safety data to the patient, allows a reduction in the failures associated with clinical development⁸⁻¹⁰.

Another important factor in redirection is the possibility of the occurrence of synergistic combination between different drugs. This practice has been encouraged, especially in the treatment of multiple drug resistant bacteria (MDR), since synergistic interactions can improve drug efficacy, decrease toxicity, cost and duration of patient treatment, as well as provide spectrum of activity more extensive than that of monotherapeutic regimens^{11,12}.

Different global studies have reported antineoplastic, antibacterial, antifungal and parasitic activity of a large number of compounds used in the treatment of non-infectious pathological conditions, including psychotropic, cardiovascular, local anesthetics, tranquilizers, antihistamines and anti-inflammatories¹³⁻¹⁹. Among psychotropic agents, sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) widely used in the treatment of

depression, has been highlighted due to its significant activities against different types of cancers, bacterial, fungal and parasitic genera^{13,20-30}.

In relation to antitumor activity, researchers have demonstrated that sertraline can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in several solid tumors, such as liver cancer, colorectal cancer, lymphoma, as well as in hematological malignancies such as acute myeloid leukemia^{25,31,32}. Although the antitumor activity of psychotropic drugs has attracted attention, it is not entirely clear how these compounds perform their functions. Studies have reported that sertraline can bind directly to the tumor-controlled translational protein (TCTP), involved in the regulation of fundamental cellular processes being over expressed in different types of tumors, and interrupt its interaction with partner proteins, decreasing intracellular concentration and, consequently, reducing the tumor^{33,34}.

The mechanism of antimicrobial action of sertraline is also not fully elucidated, however, studies report that compounds that have benzene rings in the structure, such as sertraline, may present antimicrobial activity¹³. Munoz-Bellido, Munoz-Criado and García-Rodríguez³⁵ suggest that the antibacterial action of sertraline can occur through the inhibition of efflux pumps, since it is a consensus that this drug works with this mechanism in human cells. The antifungal activity probably results from an interaction of sertraline with the fungal membrane transport system²⁶ and/or by the activity of extracellular phospholipase that reduces the virulence of the fungus^{36,37}.

In Table 1, we present a selection of studies performed with the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs) sertraline, as potential suggestions for repositioning for the treatment of neoplastic, microbial and parasitic diseases.

In view of the selection of the studies presented, we suggest that the redirection of sertraline is a promising therapeutic alternative for the treatment of neoplastic, microbial and

parasitic diseases. However, additional studies on the mechanisms of action involved in these activities are necessary to make their use safe in the treatment of these diseases.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment

This study was financed in part by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) – FinanceCode 001.

Antimicrobial and antineoplastic properties of sertralina

Table 1 - Selection of studies already reported with the antidepressant drug sertraline, as potential therapeutic options in the treatment of neoplastic, antibacterial, antifungal and parasitic diseases.

New indication	Strains tested	Type of study	References
Antineoplastic	<i>Human melanoma line A375</i> ²⁰ <i>U87 human glioblastoma cells</i> ²¹ <i>Myeloid leukemia cells</i> ²⁵ <i>Cells Lymphoma</i> ²⁵ <i>Cell HepG2 from human hepatocarcinoma</i> ³¹ <i>human colon carcinoma lines HT29 and LS1034</i> ³²	<i>In vitro</i> ^{20,21,25,31,32}	Reddy et al., 2008 ²⁰ Tzadok et al., 2010 ²¹ Xia et al., 2017 ²⁵ Chen et al., 2014 ³¹ Gil-Ad et al., 2008 ³²
Antibacterial	<i>Bacillus subtilis</i> ¹³ <i>Bacteroides fragilis</i> ³⁵ <i>Brucella spp.</i> ³⁵ <i>Campylobacter jejuni</i> ³⁵ <i>Citrobacter freundii</i> ³⁵ <i>Clostridium difficile</i> ^{35*} <i>Clostridium perfringens</i> ³⁵ <i>Corynebacterium urealyticum</i> ¹³ <i>Enterobacter cloacae</i> ^{13,35} <i>Enterococcus faecalis</i> ^{13,35} <i>Escherichia coli</i> ^{13,14,23} <i>Haemophilus influenzae</i> ³⁵ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹³ <i>Micrococcus luteus</i> ¹³ <i>Moraxella catarrhalis</i> ³⁵ <i>Morganella morganii</i> ³⁵ <i>Prevotella spp.</i> ³⁵ <i>Proteus mirabilis</i> ³⁵ <i>Proteus vulgaris</i> ³⁵ <i>Providencia spp.</i> ¹³ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{13,14} <i>Salmonella spp.</i> ^{13,35} <i>Shigella spp.</i> ¹³ <i>Staphylococcus aureus</i> ^{13,14} <i>Staphylococcus</i>	<i>In vitro</i> ^{13,14,23,35} <i>In vivo</i> ¹³ Standard strains ^{13,14} Clinical Isolates ^{23,35}	Amalesh et al., 2012 ¹³ Ayaz et al., 2015 ¹⁴ Li et al., 2017 ²³ Munoz-Bellido, Munoz-Criado e García-Rodríguez, 2000 ³⁵

epidermidis^{13,35}
*Streptococcus agalactiae*³⁵
*Streptococcus pneumoniae*³⁵
*Streptococcus pyogenes*³⁵
*Vibrio cholerae*¹³
*Vibrio parahaemolyticus*¹³

Antifungal

<i>Aspergillus niger</i> ¹⁴	<i>In vitro</i> ^{13,14, 22,24,27}	Amalesh et al., 2012 ¹³
<i>Aspergillus fumigatus</i> ¹⁴	<i>In vivo</i> ^{13,27}	Ayaz et al., 2015 ¹⁴
<i>Aspergillus flavus</i> ¹⁴	<i>Clinical Isolates</i> ³⁷	Rossato et al., 2016 ²²
<i>Candida albicans</i> ^{13,24}		Oliveira et al., 2018 ²⁴
<i>Candida tropicalis</i> ¹³		Rangel et al., 2015 ²⁷
<i>Candida parapsilosis</i> ²⁴		Cong et al., 2016 ³⁷
<i>Candida glabrata</i> ²⁴		
<i>Candida krusei</i> ²⁴		
<i>Citrobacter freundii</i> ¹³		
<i>Cryptococcus spp.</i> ²⁷		
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> ^{22,27}		
<i>Trichosporon asahii</i> ³⁷		

Antiparasitic

<i>Ancylostoma caninum</i> ²⁸	<i>In vitro</i> ^{26,28,29,30}	Palit et al., 2008 ²⁶
<i>Caenorhabditis elegans</i> ²⁸	<i>In vivo</i> ²⁶	Weeks et al., 2018 ²⁸
<i>Leishmania donovani</i> ^{26,30}	<i>In silico</i> ²⁹	Ferreira et al., 2018 ²⁹
<i>Trypanosoma brucei</i> <i>rhodesiense</i> ³⁰		Kaiser et al., 2015 ³⁰
<i>Trypanosoma cruzi</i> ^{29,30}		
<i>Trichuris muris</i> ²⁸		
<i>Schistosoma mansoni</i> ²⁸		
<i>Plasmodium falciparum</i> ³⁰		

* New classification of *Clostridium difficile*: *Clostridioides difficile*³⁸

REFERENCES

- [1] ECDC. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm: 2017.
- [2] Willyard C. 2017. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*.2017; 543:15. DOI: 10.1038/nature.2017.21550.
- [3] Wiederhold NP. 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. Infection and drug resistance. *Infect Drug Resist.* 2017; 10: 249-259.DOI: /10.2147/IDR.S124918.
- [4] WHO/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017.
- [5] Kim RS, Goossens N, Hoshida Y. Use of big data in drug development for precision medicine. *Expert review of precision medicine and drug development.* 2016;1(3):245-253. DOI:10.1080/23808993.2016.1174062.
- [6] Andersson JA, Fitts EC, Kirtley ML, et al. New Role for FDA-Approved Drugs in Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2016; 60(6):3717-3729. DOI:10.1128/AAC.00326-16.
- [7] Serafin MB, Horner R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *The Brazilian Journal of infectious diseases.* 2018; 22(3): 252-256. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.
- [8] Antczak C, Kloepfing C, Radu C, et al. Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: in vitro and in vivo antitumor activity of cardenolides. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2009; 50 (7):3065-3073.DOI:10.1167/iovs.08-3158.

- [9] Li YY, Jones SJ. Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Medicine*. 2012; 4(27):12-14. DOI:10.1186/gm326.
- [10] Mehndiratta MM, Wadhai SA, Tyagi BK, et al. Drug repositioning. *Int J Epilepsy*. 2016;3:91-4. DOI: 10.1016/j.ijep.2016.09.002.
- [11] Rangel VA, Bernstein LR, Mandujano TEA, et al. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:282. DOI:10.3389/fmicb.2015.00282.
- [12] Zheng W, Sun W, Simeonov A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology*. 2017;175(2):181-191. Doi:10.1111/bph.13895.
- [13] Samanta A, Deprasad C, Chandrima S, et al. Evaluation of in vivo and in vitro antimicrobial activities of a selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride. *Anti-Infective Agents*. 2012; 10(2):1-10. DOI: 10.2174/2211362611208020095.
- [14] Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. *Journal of Biological Research*. 2015; 22(1):4. DOI:10.1186/s40709-015-0028-1.
- [15] Chan EWL, Yee ZY, Raja I, et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017, 10:70-74. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.03.012.
- [16] Younis W, Thangamani S, Seleem MN. Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. *Current pharmaceutical design*. 2015;21(28):4106-4111. DOI: 10.2174/1381612821666150506154434.

- [17] Serafin MB, Bottega A, Foletto VS, et al. Synergistic effect of sertraline and disulfiram against multidrug resistant bacteria as a new alternative to drug repositioning. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 2018 (*in press*).
- [18] Rosa TF, Machado CS, Serafin MB, et al. Repositioning or redirection of antidepressant drugs in the treatment of bacterial and fungal infections. *American Journal of Therapeutics* (*in press*) 2019.
- [19] Folleto VS, Serafin MB, Rosa TF, et al. Fluoxetine and paroxetine: repositioning as a therapeutic alternative in the treatment of various diseases. *American Journal of Therapeutics* (*in press*) 2019.
- [20] Reddy KK, Lefkove B, Chen LB, et al. The antidepressant sertraline down regulates Akt and has activity against melanoma cells. *PigmentCell Melanoma Res.* 2008; 21:451–6. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2008.00481.x.
- [21] Tzadok S, Beery E, Israeli M, et al. In vitro novel combinations of psychotropics and anti-cancer modalities in U87 human glioblastoma cells. *Int J Oncol.* 2010;37:1043-51. DOI: 10.3892/ijo_00000756.
- [22] Rossato L, Loreto ER, Zanette RA. In vitro synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Folia Microbiol.* 2016; 61: 399–403. DOI:10.1007/s12223-016-0449-8.
- [23] Li L, Kromann S, Olsen JE, et al. Insight into synergetic mechanisms of tetracycline and the selective serotonin reuptake inhibitor, sertraline, in a tetracycline-resistant strain of *Escherichia coli*. *Jpn J Antibiot.* 2017; 70: 944–953. DOI: 10.1038/ja.2017.78.
- [24] Oliveira AS, Oliveira JM, Donders GGG, et al. Anti-*Candida* activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. *Med Microbiol Immunol.* 2018; 207: 195–200. DOI: 10.1007/s00430-018-0539-0.

- [25] Xia D, Zhang YT, Xu GP, et al. Sertraline exerts its antitumor functions through both apoptosis and autophagy pathways in acute myeloid leukemia cells, *Leukemia & Lymphoma*.2017; 58:1-10. DOI: 10.1080/10428194.2017.1287358.
- [26] Palit, P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmaniadonovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61(5): 1120-1124. DOI: 10.1093/jac/dkn046.
- [27] Treviño RDJ, Villanueva LH, Hernández RP, Martínez RMF,García JJ, et al. Activity of sertraline against *Cryptococcus neoformans*: In vitro and in vivo assays. *Med. Mycol.* 2016, 54, 280–286. DOI: 10.1093/mmy/myv109.
- [28] Weeks J, Roberts W, Leasure C, et al. Sertraline, Paroxetine, and Chlorpromazine Are Rapidly Acting Anthelmintic Drugs Capable of Clinical Repurposing..*ScientificReports*. 2018; 8:1-15. DOI:10.1038/s41598-017-18457-w.
- [29] Ferreira DD, Mesquita JT, Silva TAC, et al. Efficacy of sertraline against *Trypanosoma cruzi*: an in vitro and in silico study. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018; 24: 30.DOI:10.1186/s40409-018-0165-8.
- [30] Kaiser M, Mäser P, Tadoori LP, et al. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. 2015; *PLoS ONE*10(8):1-16.. DOI:10.1371/journal.pone.0135556.
- [31] Chen S, Xuan J, Wan L, et al. Sertraline, an antidepressant, induces apoptosis in hepatic cells through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol Sci.* 2014;137:404–415. DOI: 10.1093/toxsci/kft254.
- [32] Gil-Ad I, Zolokov A, Lomnitski L, et al. Evaluation of the potential anti-cancer activity of the antidepressant sertraline in human colon cancer cell lines and in colorectal cancer-xenografted mice. *Int J Oncol.* 2008;33:277–286.DOI:10.3892/ijo_00000007.

[33] Telerman A, Amson R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:206–216. DOI: 10.1038/nrc2589.

[34] Acunzo J, Baylot V, So A, et al. TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat Rev*. 2014;40: 760–769. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.02.007.

[35] Munoz-Belido JL, Munoz-Criado S, García-Rodríguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs Selective serotonin reuptake inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 14:177-180. DOI:10.1016/S0924-8579(99)00154-5.

[36] Rainey MM, Korostyshevsky D, Lee S, et al. The antidepressant sertraline targets intracellular vesiculogenic membranes in yeast. *Genetics*. 2010; 185:1221–1233. DOI: 10.1534/genetics.110.

[37] Cong L, Liao Y, Yang S, et al. In Vitro Antifungal Activity of Sertraline and Synergistic Effects in Combination with Antifungal Drugs against Planktonic Forms and Biofilms of Clinical *Trichosporon asahii* Isolates. 2016; *PLoS ONE* 11:1-12. DOI:10.1371/journal.

[38] Lawson PA, Citron DM, Kerin L. et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Proevot 1938. *Anaerobe*. 2016; 40:95-99. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008.

5.2 MANUSCRITO 1

O manuscrito 1 intitulado **“*In vitro* evaluation of the antibacterial activity of sertraline and methyldopa and their synergistic effects with sulfamethoxazole/trimethoprim as an alternative in drug repositioning”**, foi redigido de acordo com as normas do periódico *“Current Microbiology”* e encontra-se em processo de revisão junto ao mesmo.

Este periódico é classificado de acordo com o qualis Capes quadriênio **2013-2016** como **B2** para área da farmácia.

***In vitro* evaluation of the antibacterial activity of sertraline and methyldopa and their synergistic effects with sulfamethoxazole/trimethoprim as an alternative in drug repositioning**

Angelita Bottega ^{1,2}, Marissa B. Serafin ^{1,2}, Taciéli F. da Rosa ^{1,2}, Vitória S. Foletto ^{1,2}, Rosmari Hörner ^{1,2}.

✉ **Rosmari Hörner**

Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria - UFSM. Avenida Roraima, 1000 - Cidade Universitária, Camobi, CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS, Brazil. Phone: 55 55 3220-8751; Mobile: 55 99111-9691. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com.

Angelita Bottega: <https://orcid.org/0000-0002-7168-7247>
angelitabotega@yahoo.com.br

Marissa Bolson Serafin: <https://orcid.org/0000-0002-0044-6614>
mbs_1304@hotmail.com

Taciéli Fagundes da Rosa: <https://orcid.org/0000-0003-2711-4238>
tacielifagundesdariosa@gmail.com

Vitória Segabinazzi Foletto: <https://orcid.org/0000-0002-8496-9446>
vitoria_sfoletto@yahoo.com.br

¹ Laboratory of Bacteriology - LABAC, Federal University of Santa Maria - UFSM, Brazil

²Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria - UFSM, Brazil

Abstract

Drug redirection is a promising alternative for the treatment of bacterial infections. Thus, we evaluated the *in vitro* antibacterial activity of the antidepressant sertraline (SER) and antihypertensive, methyldopa (MET) and the effects of their associations with sulfamethoxazole/trimethoprim (SUT). Their synergistic activities, tolerance levels and cleavage mechanism of plasmid DNA were also evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method, at concentrations of 0.5-512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The level of tolerance when associated with the SUT was defined by statistical analysis. The cleavage study was performed by agarose gel electrophoresis. The tests were performed against seven standard strains of the *American Type Culture Collection* (ATCC) and ten multidrug-resistant clinical isolates (MDR). Sertraline showed greater antibacterial activity than methyldopa. Furthermore, it was bactericidal against most of the strains analyzed, where we highlight this effect against *Enterococcus faecalis* - 3 ($32\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). In the individual association of these drugs with SUT, there were 9 synergistic events with FICI <0.5 . The association of sertraline with methyldopa also resulted in synergism. In the cleavage assay, methyldopa cleaved the plasmid DNA pUC18 under specific conditions of pH, temperature and determined reaction times, not being inhibited by the presence of free radical scavengers, a characteristic that allows us to assess a probable hydrolytic mechanism. The results obtained in this study allow us to suggest sertraline, as a potential antibiotic in the repositioning of drugs. However, additional studies to evaluate the mechanism of action involved in this activity, as well as cytotoxicity are necessary to make its use safe.

Keywords: Drug repositioning. Bacterial Infections. Drug Synergism. Therapy.

INTRODUCTION

Bacterial resistance to antibiotics is increasing dramatically worldwide [1]. This phenomenon occurs naturally, resulting from the adaptation of the bacterial cell to exposure to antibiotics, but which has undergone an accelerated expansion due to the inappropriate use of these drugs [2, 3].

This fact is considered a global threat to public health, and there is the urge for the development of measures and actions to fight infections since we are now approaching a post-antibiotic era [4]. An alternative approach to this reality occurs with the repositioning and/or redirection of drugs, that is, the investigation of new uses to drugs that have been previously clinically approved for the treatment of other diseases [5, 6, 7].

Drug repositioning has proved a relevant alternative since repositioned drugs have the advantage of reducing costs and time of introduction in the market when compared to traditional products. This is due to the availability of pharmacokinetic, toxicological and safety data that allow to reduce inadequacies associated to clinical development [8, 9, 10, 11].

Different studies worldwide have reported the antimicrobial activity of a great number of compounds used to treat non-infectious pathological conditions, including psychotropics, local anaesthetics, tranquilizers, cardiovascular, anti-histaminic and anti-inflammatory compounds, the latter classified as non-antibiotics [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Another important factor in drug repositioning is the possibility of synergistic combinations between different drugs. This practice has been stimulated, especially in the treatment against multidrug resistant (MDR) bacteria, since synergistic interactions can improve drug efficacy and decrease toxicity, leading to the decrease of costs and length of treatment, in addition to providing a wider activity spectrum than monotherapeutic regimens [18, 19].

The present study evaluated the antibacterial activity of the two non-antibiotics sertraline and methyldopa, which are widely used in clinical practice to treat depression and hypertension, respectively, and the effects of their associations with sulfamethoxazole/trimethoprim (SUT). Antibacterial activity was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and fractional inhibitory concentration index (FICI). The level of tolerance and

significance were estimated through statistical analysis. In addition, the potential for cleavage of plasmid DNA pUC18 of both drugs was evaluated *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Selection of bacterial strains

The evaluation of antibacterial activity *in vitro* was performed against seventeen bacterial strains: seven reference standards from the *American Type Culture Collection* (ATCC) and ten multiresistant clinical isolates (MDR) representing ESKAPE, an acronym used to demarcate a group of pathogens composed by *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp.*, which have gained prominence for being frequently involved in hospital and community infections and for their high capacity to develop resistance to commercially available antimicrobials [20]. All strains were stored in TSB broth (Tryptic Soy Broth) containing 15% glycerol at - 20 °C.

The Gram-positive ATCC strains used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 7468; and the Gram-negative strains were *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

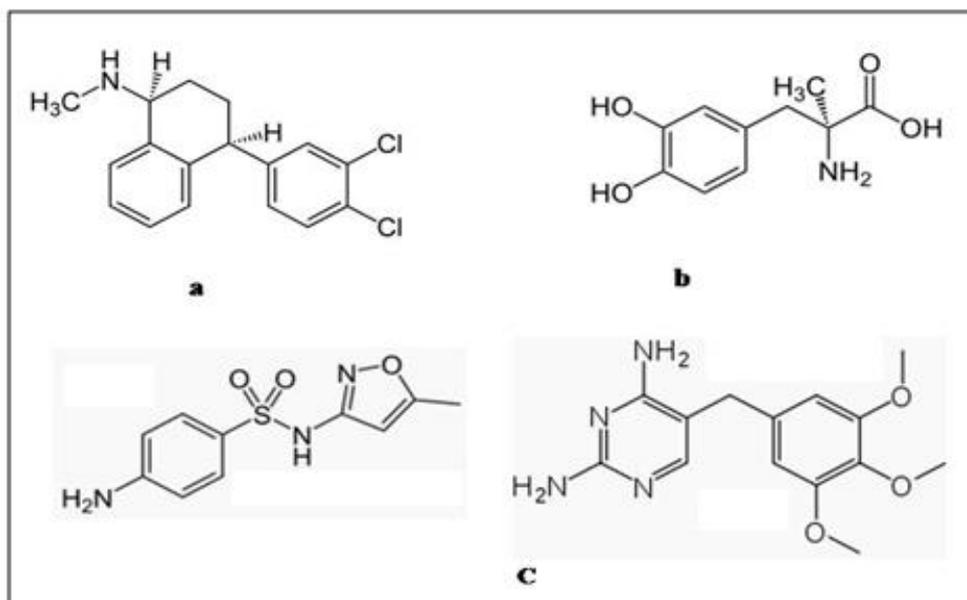
Among the ESKAPE isolates, *A. baumannii* (1-2), *E. faecalis* (3), *E. faecium* (4-5), *E. coli* (6), *K. pneumoniae* (7-8) were selected for the study and *S. aureus* (9-10). These were obtained from patients admitted to a university hospital from January to December 2019, which were identified through manual and automated phenotypic tests performed by the Vitek® 2 device (BioMérieux, MarcyI'Etoile, France) in the microbiology laboratory of that hospital. Their sensitivity and resistance profiles can be seen in **Table 1**.

The use of isolates for clinical research was approved by the Research and Ethics Committee under CAAE 38850614.4.0000.5346. Registration in the Brazilian National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge – referred to as “SisGen” was registered under number AE78E18 - Federal University of Santa Maria.

Drug Used

The drugs used in this study as candidates for redirection were sertraline (SER) (*Tokio Chemical Industry Co. Ltd*®, *Japan*), and methyldopa (MET) (*Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, São Paulo, SP, Brazil*). The interaction of these drugs with the antibiotic sulfamethoxazole/trimethoprim (SUT) (*Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*) was also evaluated, whose molecular structures are shown in **Fig. 1**, being tested against the bacterial strains described above. To obtain the stock solution of sertraline and methyldopa they were dissolved in absolute methanol (*Sigma-Aldrich Brasil Ltda*). SUT was diluted in absolute ethanol (*Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brazil*) as recommended by the manufacturers. The concentrations tested for the drugs were 0.5-512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Fig. 1 Molecular structure of the drugs sertraline **a**, methyldopa **b** and sulfamethoxazole / trimethoprim **c**



Source: Prepared by the author, 2020.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC was performed using the broth microdilution method, based on the M100-S26 document from the *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*, 2014 [21]. The bacterial inoculum was prepared in sterile saline, showing the concentration of bacterial suspension according to the 0,5McFarland scales, that is, $1,5 \times 10^8$ colony forming units /ml (CFU/ml). The drugs (0,5 to 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and bacterial inoculum (1×10^5 CFU/well) were incubated in 96-well microplates containing Mueller Hinton broth at 35 ± 2 °C for 24/48 hours. After incubation, the MIC was manually determined by visual reading as the lowest concentration at which there was no growth of microorganisms. All tests were performed in triplicate.

Determination of fractional inhibitory concentration index (FICI)

In order to standardize the interpretation of the interaction, that is, of the synergism between the drugs and sulfamethoxazole/trimethoprim, the sum of the fractional inhibitory concentration indexes (FICI) was calculated, whose interpretation was classified as "synergistic" ($\text{FIC} \leq 0,5$), "no interaction" ($\text{FIC} > 0,5$ and $\leq 4,0$) and "antagonistic" ($\text{FIC} > 4,0$) [22,23].

$$\text{FICI of agent A} = \text{CIM of agent A in combination} / \text{CIM of agent A alone}$$

$$\text{FICI of agent B} = \text{CIM of agent B in combination} / \text{CIM of agent B alone}$$

$$\Sigma\text{FICI} = \text{FICI of agent A} + \text{FICI of agent B}$$

Determination of minimum bactericidal concentration (MBC)

MBC analysis was performed according to the method described in document M26-A of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1999) [24]. Briefly, after the visual reading of the MIC, approximately 10 μL of the content of the wells where there was no visible bacterial growth and also of the last well used as a

positive control were removed with the help of a calibrated platinum loop. This volume was then sown in Petri dishes containing Muller-Hinton agar, which were incubated in a bacteriological oven at 35 ± 2 ° C for a period of 24/48 hours. After incubation, MBC was determined to be the lowest required concentration that was able to kill microorganisms.

Tolerance level

Tolerance levels of standard strains and clinical isolates against selected drugs were determined according to the standard method described by Das et al. (2016) [25], which relies on the use of the formula described below:

$$\text{Tolerance} = \text{MBC/MIC.}$$

Statistical analysis

Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's test using *GraphPad Prism 5* software (*GraphPad*, San Diego, CA). Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

DNA cleavage study

The plasmid DNA cleavage assays of the drugs were carried out in order to investigate their chemical nuclease activity. For the extraction of plasmid DNA pUC18 previously inserted into bacterial cells of *Escherichia coli* strain DH5 alpha, standard procedures were followed, using the alkaline lysis technique (“large-scale preparation of plasmid DNA”), described in the Ausubel protocol book et al. 2003 [26].

DNA cleavage was evaluated by converting the supercoiled pUC18 plasmid DNA (Form I) into circular (Form II) and open linear (Form III) DNA forms. This test was carried out in a final volume of 20 μL where 2 μg of plasmid DNA and different concentrations of the tested drugs (3.75, 1.875 and 0.375 mM) were present at pH 7.4 and pH 8.0 (200 mM Tris-HCl) incubated at 37 ° C and 50 ° C for 24 h. All

analyses were performed in duplicate. After the incubation period, loading buffer (4 μ L) was added, and electrophoresis was performed on an agarose gel (0.8%) with a voltage application of 50-70 V for a period of 2-3 hours, using TBE running buffer (Tris, Borate EDTA). The resulting gels were digitized using a photo-documentation system [26].

The compounds able to cleave double-stranded plasmid DNA were subsequently subjected to tests with free radical scavengers (0.4M thiourea, 10% and 1% glycerol solution and 0.4M dimethyl sulfoxide), to elucidate the probable cleavage mechanism. If the presence of these hijackers inhibited cleavage, probably reactive oxygen species are essential for this to occur, suggesting that the mechanism involved is oxidative and depends on free radicals. If there was no cleavage inhibition, a probable hydrolytic mechanism could be proposed [26].

RESULTS AND DISCUSSION

The antimicrobial effect of sertraline and methyldopa drugs is already well established in the literature [13, 14, 27, 28, 29]. Sertraline is widely used to treat depression and anxiety disorders. Several studies have already demonstrated the broad biological activity against different bacterial specimens, yeasts and fungi [13, 14, 27, 28].

The antihypertensive drug methyldopa showed notable antibacterial activity in an assay against 405 strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, against different genera, with MICs ranging from 10-200 μ g/mL. In addition, it showed notable antitubercular activity against mycobacteria of different species [30].

In our study, the MIC and FICI values obtained for both drugs are described in **Table 2**. Our results show that sertraline was particularly more active than methyldopa when its individual activity was tested against the standard Gram-positive and Gram-negative results analyzed, being more expressive against *E. faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218 and *M. luteus* ATCC 7468, all with MICs = 16 μ g.mL⁻¹. This activity was also observed in the MDR clinical isolates, of which we highlight *A baumannii* -1 (MIC = 16 μ g.mL⁻¹), *E. faecium* - 4 (MIC = 32 μ g.mL⁻¹), *E. faecium* - 5 (MIC = 32 μ g.mL⁻¹) and *K. pneumoniae* - 8 (MIC = 32 μ g.mL⁻¹).

In the study by Munoz-Bellido, Munoz-Created and García-Rodríguez [28], the antibacterial activity of sertraline in different clinical isolates from patients treated at a University Hospital in Salamanca, Spain, was evaluated. The MIC 90 values obtained

by the researchers against *K. pneumoniae* (MIC = 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and *A. baumannii* (MIC = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), higher than ours.

When investigating the synergistic effect of sertraline and methyldopa with SUT, it was possible to observe the occurrence of nine synergism events with FICI <0.5. The association of sertraline with SUT was synergistic in the standard ATCC strains of *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.31) and *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0, 31), and in the clinical isolates of *E. faecalis* -3 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.5), *E. faecium* - 5 (MIC = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.5) and *S. aureus* - 9 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.31).

However, when methyldopa was associated with SUT, synergism occurred in the standard strains of *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.09), *M. luteus* ATCC 7468 (MIC = 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.18) and *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.18). In clinical isolates, this association was synergistic only in *A. baumannii* - 2 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.15).

The association of sertraline with methyldopa also occurred in a synergistic event in two of the strains analyzed, one of which is a standard ATCC strain of *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.5) and another in the isolated MDR of *S. aureus* - 10 (MIC = 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; FIC = 0.31).

The mechanism of antibacterial action of sertraline and methyldopa is not yet fully understood. Studies report that compounds that have benzene rings in the structure, such as sertraline and methyldopa, may have antimicrobial activity [31]. In addition, Munoz-Bellido, Munoz-Criado and García-Rodríguez [28] suggest that the antibacterial action of sertraline can occur through the inhibition of efflux pumps, since it is a consensus that this drug acts with this mechanism on bacterial cells. Our understanding of the greatest antibacterial action of sertraline was due to the fact that it has a synergism between these two mechanisms.

In the study, the MBC of the drugs was also investigated, the results of which are described in **Table 3**. Through the analysis of these results, it was possible to verify that sertraline alone was bactericidal against most of the tested strains, of which we highlight this activity against the isolate *E. faecalis* - 3 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), as long as ew antibiotics present it. Already in methyldopa, this activity was little observed. However, when these drugs were combined, it was possible to observe an intensification of sertraline bactericidal activity, especially in the ATCC strains of *K. pneumoniae* ATCC

700603 (MBC = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and *S. aureus* ATCC 29213 (MBC = 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), and in the isolate *S. aureus* - 9 (MBC = 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

The tolerance level of the analyzed drugs is described in **Table 4**. The MBC/MIC ratio can be interpreted as bacteriostatic, if ≥ 16 , and bactericidal, if ≤ 4 [25]. Sertraline was bactericidal against most standard strains and against all clinical isolates tested, in line with the results of Serafin et al. 2018 [32].

With statistical analysis, we can conclude that sertraline and methyldopa were able to interfere in the action of *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 29213 as shown in **Fig. 2 (A, B)**. In addition, MIC values decreased considerably in these strains when the drugs were combined with the antibacterial sulfamethoxazole/trimethoprim.

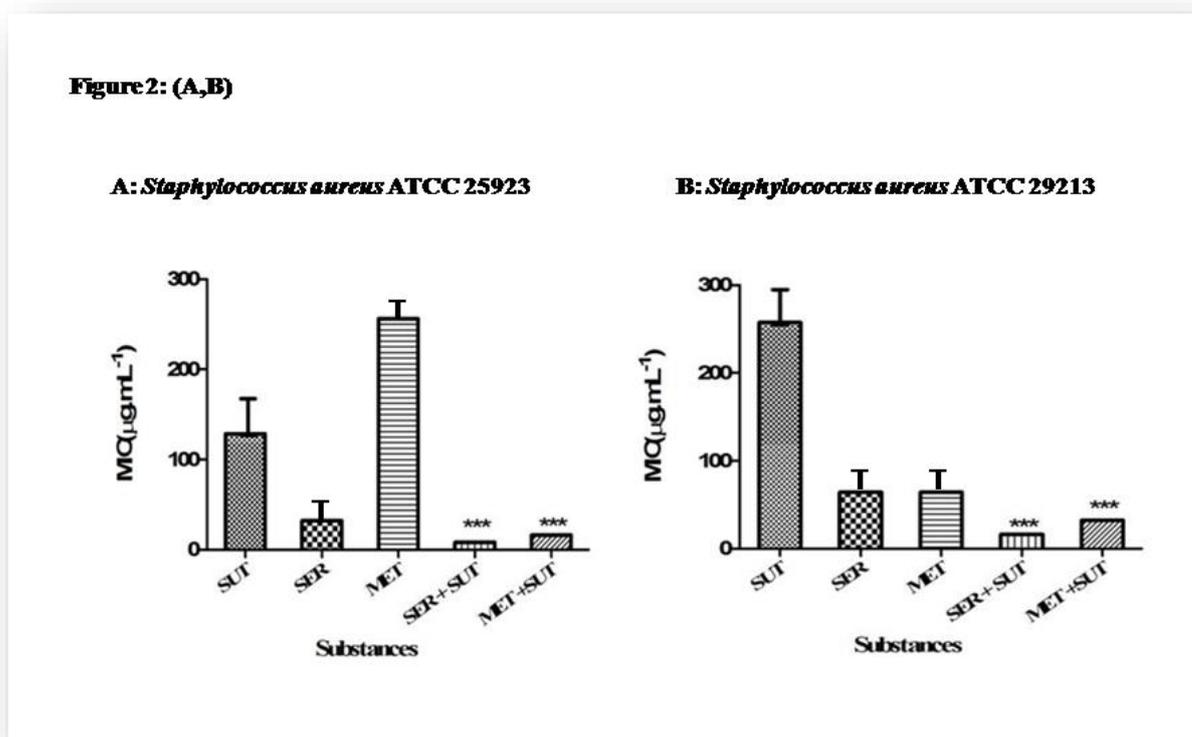


Fig. 2 - Comparison of sertraline and methyldopa in association with sulfamethoxazole/trimethoprim (SUT) against ATCC strains of: A: *S. aureus* ATCC 25923 and B: *S. aureus* ATCC 29213. SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim, SER: sertraline, MET: methyldopa, SER+SUT: combination of sertraline and sulfamethoxazole/trimethoprim, MET+SUT: combination of methyldopa and sulfamethoxazole/trimethoprim. One-way ANOVA followed by the Tukey test: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Source: Prepared by the author, 2020.

The combination of sertraline with SUT was significant in isolates of *E. faecalis* - 3, *E. faecium* - 5 and *S. aureus* - 9, as shown in **Fig. 3 (A, B, C)**. In turn, in the combination of SUT with methyldopa, a significant interaction was observed in the ATCC strain of *M. luteus* ATCC 7468 and in the isolate of *A. baumannii* - 2, which can be seen in **Fig. 3 (D, E)**.

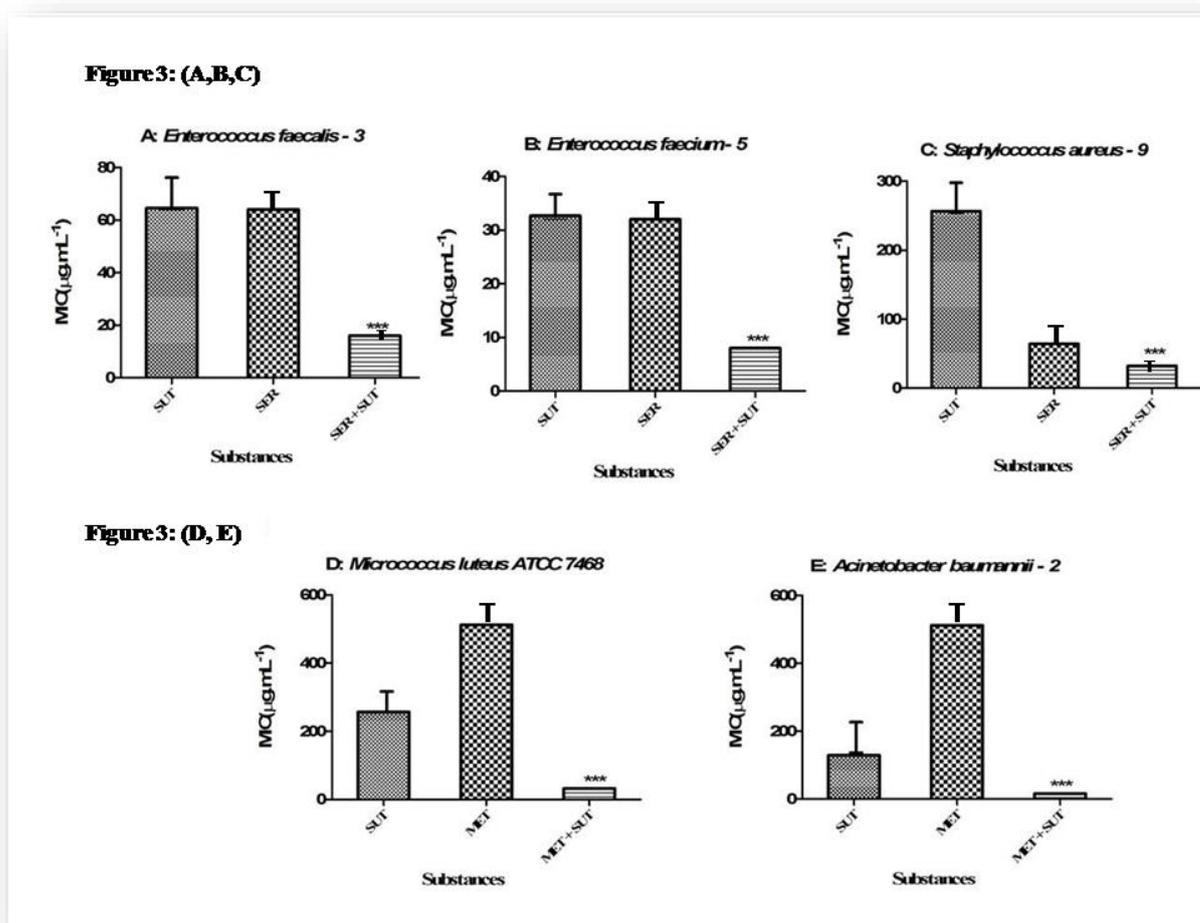


Fig. 3 - (A, B, C): Association of sertraline with sulfamethoxazole/trimethoprim in clinical isolates (MDR) from: A: *E. faecalis* - 3; B: *E. faecium* - 5 and C: *S. aureus* - 9. **Fig. 3 - (D, E):** Association of methyldopa with sulfamethoxazole/trimethoprim in the ATCC strain of *M. luteus* ATCC 7468 and in the isolate of *A. baumannii* - 2. SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim, SER: sertraline, MET: methyldopa. SER + SUT: combination of sertraline and sulfamethoxazole/trimethoprim, MET + SUT: combination of methyldopa and sulfamethoxazole/trimethoprim. Asterisks denote a level of significance compared to the untreated control. One-way ANOVA followed by the Tukey test: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Source: Prepared by the author, 2020.

In addition, it was observed that the combination of sertraline and SUT increased the effectiveness of this drug in several standard strains and clinical isolates analyzed. These results lead us to assume that the combination of sertraline with SUT is an advantageous combination for the treatment of some bacterial strains. Drug combinations are used as a way to combat the resistance of multidrug-resistant microorganisms, as they increase the spectrum of activity of antimicrobials, decrease the effective dose, triggering the synergistic effects, the occurrence of which was observed in our research [25, 33, 34].

Methyldopa was able to cleave plasmid DNA, which was evidenced by a decrease in the supercoiled form and an increase in the open circular form, as shown in **Fig. 4** at 37 ° C, pH 7.4 and pH 8.0; at 3.75 mM concentrations; 1.875 mM; 0.375 mM, as well as at 50 ° C, pH 7.4 and pH 8.0; at 3.75 mM concentrations; 1.875 mM. Free radical scavengers used in this study did not inhibit cleavage, which allowed us to assess the likely mechanism of hydrolytic action involved, similar to that promoted by natural nucleases.

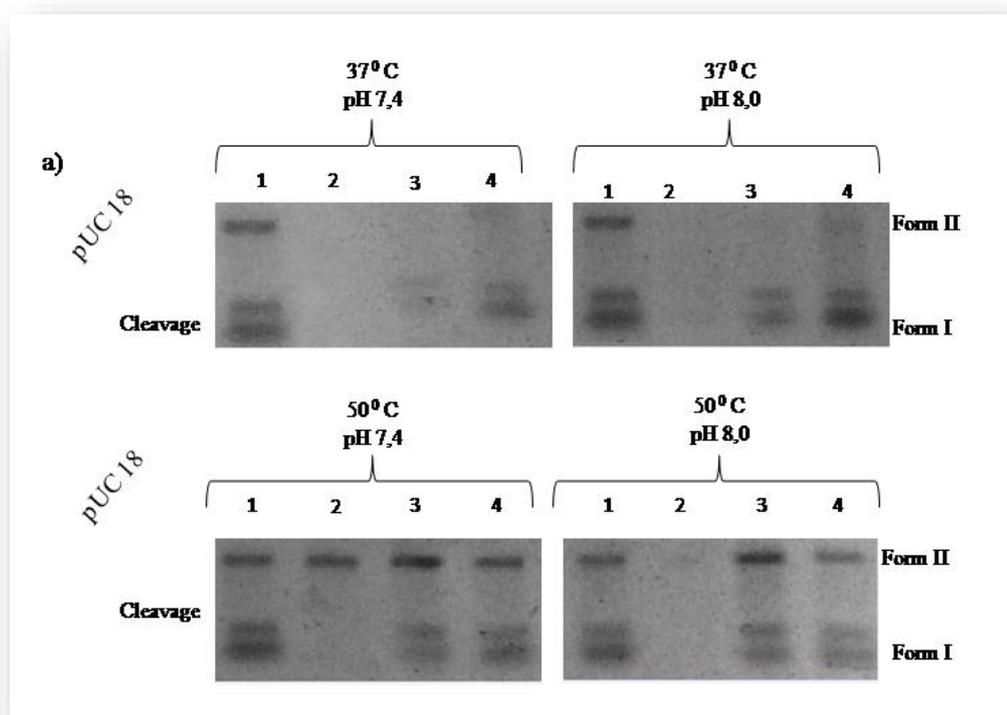


Fig. 4 - Cleavage DNA activity of methyl dopa under different conditions: pH 7.4 and 8.0; temperature 37 ° C and 50 ° C per 24h. a) plasmid pUC18. In all: lane 1, only DNA + buffer; lane 2, DNA + buffer + stock solution (3,75 mM); lane 3, DNA + buffer + stock solution 1:2 (1,875 mM); lane 4, DNA + buffer + stock solution 1:10 (0,375 mM).

Source: Prepared by the author, 2020

As far as we know, this is the first report of an antihypertensive drug that has the ability to cleave double-stranded plasmid DNA. Drugs that cleave DNA, such as bleomycin, are already being used in anticancer therapy [25, 35]. Our expectation is that methyl dopa will also show antitumor activity, and our research group will, in the near future, carry out tests against various cancer cell lines in the investigation of cytotoxic activity.

CONCLUSION

Sertraline showed greater antibacterial activity than methyldopa against the standard reference strains and clinical isolates tested. When these drugs were combined with sulfamethoxazole/trimethoprim, synergistic effects occurred. These results allow us to suggest sertraline as a candidate for the redirection of drugs as a promising therapeutic alternative in the treatment of bacterial infections. Methyldopa was able to cleave plasmid DNA under defined conditions of pH, temperature and determined reaction times, with a probable hydrolytic mechanism, similar to that promoted by natural nucleases. However, additional studies to evaluate the mechanism of action involved in these activities, as well as cytotoxicity tests, are necessary to make their use safe.

Table 1 - Characteristics of the clinical isolates used in this study.

Clinical isolates MDR	Clinical Origin	Resistant Antibiotics	Antibiotic Sensitiv
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 1	Blood	AMP/SUL, PIP/TAZ, CEF/AX, CEFO, CEFET, CEFTR, CEFE, IMI, MER, CIP	AMI, TIG, COL
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 2	Tracheal secretion	AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFO, CEFTA, CEFTR, CEFE, MER, CIP	AMI, GEN, TIG, COL
<i>Enterococcus faecalis</i> - 3	Urine	GEN, STR, LVX, ERY, CLI, TEC, VAN, SUT	AMP, LNZ, DAPT, TIG, NIT
<i>Enterococcus faecium</i> - 4	Urine	AMP, LVX, ERI, CLI, TEI, VAN, SUT	LNZ, TIG
<i>Enterococcus faecium</i> - 5	Urine	AMP, LVX, ERI, TEI, VAN	GEN, STR, LNZ, TIG
<i>Escherichia coli</i> - 6	Ascitic fluid	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFE, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, CEFE, ERTA, IMI, MER, GENT, CIP, TIG, COLI	AMI, GEN
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	Urine	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFE, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, ERTA, IMI, MER, GEN, CIP, TIG, COL	AMI, COL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	Urine	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFU, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, ERTA, IMI, MER, AMI, GEN, CIP	TIG, COL
<i>Staphylococcus aureus</i> - 9	Tracheal secretion	BEN, OXA, GEN, LVX, ERY, CLI	CEFTA, LNZ, DAPT, TEI, VAN, TIG, RIF, SUT
<i>Staphylococcus aureus</i> - 10	Blood	BEN, OXA, LVX, ERY	CEFTA, GEN, CLI, LNZ, DAPT, TEI, VAN, TIG, NIT, RIF, SUT

AMI - amikacin, AMP/SUL – ampicillin/sulbactam, AMP - ampicillin, BEN - Benzilpenicilina, CEFE - cefepime, CEF/AX - Cefuroxima Axetil, CEFO – cefoxitin, CEFU - cefuroxime, CEFTA - ceftazidime, CEFTR - ceftriaxone, CIP - cipro fl oxacin, CLI - clindamycin, COL - colistin, DAPT – daptomicyn, GEN - gentamycin, ERY - erythromycin, ERT - ertapenem, IMI - imipenem, LVX- levofloxacin, LNZ - linezolid, MER - meropenem, OXA - oxacillin, PEN - penicillin, PIP/TAZ - Piperaciclina/Tazobactan, RIF – Rifamicyn, SUT- sulphamethoxazole/trimethoprim, STR- streptomycin, TEI - teicoplanin, TIG - tigecycline, VAN- vancomycin, NIT - Nitrofurantoin

Source: Prepared by the author, 2020

Table 2 – Minimal inhibitory concentration (MIC) of sertraline, methyldopa and sulfamethoxazole/trimethoprim: in isolation and in combination, against standard reference bacterial strains and clinical isolates.

BACTERIAL STRAINS TESTED	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)											
	SER	MET	SUT	SER + SUT	FICI	EFFECT	SER + MET	FICI	EFFECT	MET + SUT	FICI	EFFECT
Standard Strains - ATCC												
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	16	512	1	16	1.06	N/I	16	1.03	N/I	16	0.09	S*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32	>512	1	16	0.62	N/I	32	-	-	16	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	16	>512	8	32	2.12	N/I	64	-	-	32	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	32	512	4	32	1.50	N/I	32	1.06	N/I	32	0.56	N/I
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	16	512	256	16	1.06	N/I	16	1.03	N/I	32	0.18	S*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32	256	128	8	0.31	S*	64	2.25	N/I	16	0.18	S*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	64	64	256	16	0.31	S*	16	0.5	S*	32	0.62	N/I
Clinical Isolates - MDR												
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 1	16	512	256	32	2.12	N/I	16	1.03	N/I	256	1.05	N/I
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 2	256	512	128	256	3	N/I	256	1.5	N/I	16	0.15	S*
<i>Enterococcus faecalis</i> - 3	64	>512	64	16	0.5	S*	128	-	-	256	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> - 4	32	512	128	16	0.62	N/I	64	2.12	N/I	64	2.25	N/I
<i>Enterococcus faecium</i> - 5	32	512	32	8	0.5	S*	64	2.12	N/I	64	2.12	N/I
<i>Escherichia coli</i> - 6	256	>512	512	256	1.5	N/I	256	-	-	512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	64	>512	512	128	2.25	N/I	128	-	-	512	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	32	>512	512	64	2.12	N/I	64	-	-	512	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> - 9	64	512	256	16	0.31	S*	64	1.12	N/I	256	1.05	N/I
<i>Staphylococcus aureus</i> - 10	64	256	256	32	0.62	N/I	16	0.31	S*	128	1.25	N/I

SER: sertraline; MET: methyldopa; SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim; SER+SUT: Combination of sertraline with sulfamethoxazole/trimethoprim; SER+MET: combination of sertraline and methyldopa; MET+SUT: combination of methyldopa with sulfamethoxazole/trimethoprim; Effects: S*: Synergistic, N/I: No interaction, A: Antagonistic; (-): FICI with result without determination

Source: Prepared by the author, 2020.

Table 3 – Minimum bactericidal concentration (MBC) of sertraline, methyl dopa and sulfamethoxazole/trimethoprim, isolated and in association, against standard reference bacterial strains and clinical isolates.

BACTERIAL STRAINS TESTED	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	SER	MET	SUT	SER + SUT	SER + MET	MET + SUT
Standard Strains ATCC						
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	32	512	512	32	32	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	>512	256	16	32	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	16	>512	256	32	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	256	>512	512	16	64	512
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	32	512	512	64	64	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32	256	256	16	128	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	512	512	128	64	32	32
Clinical Isolates - MDR						
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 1	16	>512	512	8	64	512
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 2	256	512	256	128	512	512
<i>Enterococcus faecalis</i> - 3	32	>512	256	32	128	256
<i>Enterococcus faecium</i> - 4	32	512	512	256	256	>512
<i>Enterococcus faecium</i> - 5	32	512	128	32	512	512
<i>Escherichia coli</i> - 6	256	>512	512	256	256	>512
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	64	>512	256	256	256	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	64	>512	512	128	512	>512
<i>Staphylococcus aureus</i> - 9	64	512	256	32	32	256
<i>Staphylococcus aureus</i> - 10	128	>512	512	128	512	512

SER: sertraline; MET: methyl dopa; SUT: sulfamethoxazole/trimethoprim; SER+SUT: combination of sertraline with sulfamethoxazole / trimethoprim; SER+MET: combination of sertraline with methyl dopa; MET+SUT: combination of methyl dopa with sulfamethoxazole / trimethoprim

Source: Prepared by the author, 2020.

Table 4 - Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and determination of tolerance level (MBC/MIC) of sertraline and methyldopa against ATCC standard strains and clinical isolates.

Bacterial strains tested	Sertraline				Methyldopa				
	Standard Strains ATCC	MIC SER ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC SER ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tolerance Index (MBC/MIC)	Interpretation	MIC MET ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC MET ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tolerance Index (MBC/MIC)	Interpretation
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	16	32	2	Bactericidal	512	512	1	Bactericidal	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32	16	0.5	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	16	16	1	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	32	256	8	-	512	512	1	Bactericidal	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	16	32	2	Bactericidal	512	>512	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32	32	1	Bactericidal	256	256	2	Bactericidal	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	64	512	8	-	64	512	8	-	
Clinical Isolates - MDR									
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 1	16	16	1	Bactericidal	512	>512	-	-	
<i>Acinetobacter baumannii</i> - 2	256	256	1	Bactericidal	512	512	1	Bactericidal	
<i>Enterococcus faecalis</i> - 3	64	32	0.5	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Enterococcus faecium</i> - 4	32	32	1	Bactericidal	512	512	1	Bactericidal	
<i>Enterococcus faecium</i> - 5	32	32	1	Bactericidal	512	512	1	Bactericidal	
<i>Escherichia coli</i> - 6	256	256	1	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 7	64	64	1	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 8	32	64	2	Bactericidal	>512	>512	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> - 9	64	64	1	Bactericidal	512	512	1	Bactericidal	
<i>Staphylococcus aureus</i> - 10	64	128	1	Bactericidal	256	>512	1	-	

(-): Result without determination

Source: Prepared by the author, 2020.

REFERENCES

- [1] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP et al (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517:445-449. [https://doi: 10.1038/nature14098](https://doi.org/10.1038/nature14098).
- [2] Wang XD, Wei W, Wang PP, Tang YT, Deng RC, Li B, et al (2014) Novel 3-aryl furan-2(5H)-one-fluoroquinolone hybrid: Design, synthesis and evaluation as antibacterial agent. *Bioorg Medicin Chemis* 22:3620-3629. [https://doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.026](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.026).
- [3] Xiao ZP, Wang XD, Wang PF, Zhou Y, Zhang JW, Zhang L et al (2014) Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone-flavonoid hybrids as potent antibiotics against drug-resistant microorganisms. *Eur J Med Chem* 80:92-100. [https://doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.037](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.037).
- [4] WHO/CDC/ICBDSR (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization.
- [5] Kim RS, Goossens N, Hoshida Y (2016) Use of big data in drug development for precision medicine. *Expert review of precision medicine and drug development* 1(3):245-253. [https://doi:10.1080/23808993.2016.1174062](https://doi.org/10.1080/23808993.2016.1174062).
- [6] Andersson JA, Fitts EC, Kirtley ML, Ponnusamy D, Peniche AG, Dann SM et al (2016) New Role for FDA-Approved Drugs in Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(6):3717-3729. [https://doi:10.1128/AAC.00326-16](https://doi.org/10.1128/AAC.00326-16).
- [7] Serafin MB, Horner R (2018) Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *The Brazilian Journal of infectious diseases* 22(3):252-256. [https://doi: 10.1016/j.bjid.2018.05.007](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.05.007).

- [8] Antczak C, Kloepping C, Radu C, Genski T, Muller-Kuhrt L, Siems K et al (2009) Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of cardenolides. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(7):3065-3073. <https://doi:10.1167/iovs.08-3158>.
- [9] Li YY, Jones SJ (2012) Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Medicine* 4(27):12-14. <https://doi:10.1186/gm326>.
- [10] Mehndiratta MM, Wadhai SA, Tyagi BK, Gulati NS, Sinha M (2016) Drug repositioning. *Int J Epilepsy* 3:91-4. <https://doi:10.1016/j.ijep.2016.09.002>.
- [11] Palit PP, Mandal SC, Mandal NB (2013) Reuse of old, existing, marketed non-antibiotic drugs as antimicrobial agents: a new emerging therapeutic approach. In: Méndez-Vilas (ed) *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Spain: Badajoz: Formatex Research Center. 1883: 1892.
- [12] Savoia D (2016) New Antimicrobial Approaches: Reuse of Old Drugs. *Current Drug Targets* 17: 731-738. <https://doi:10.2174/1389450116666150806124110>.
- [13] Samanta A, Chattopadhyay D, Sinha C, Jana AD, Ghosh S, Banerjee AMA (2012) Evaluation of *in vivo* and *in vitro* antimicrobial activities of a selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride. *Anti-Infective Agents* 10(2):1-10. <https://doi:10.2174/2211362611208020095>.
- [14] Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, Khan AF, Ullah F, Ullah I et al (2015) Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. *Journal of Biological Research* 22(1):4. <https://doi:10.1186/s40709-015-0028-1>.
- [15] Chan EWL, Yee ZY, Raja I, Yap JKY (2017). Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 10:70-74. <https://doi:10.1016/j.jgar.2017.03.012>.

- [16] Younis W, Thangamani S, Seleem MN (2015). Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. *Current pharmaceutical design* 21(28):4106-4111. [https://doi: 10.2174/1381612821666150506154434](https://doi:10.2174/1381612821666150506154434).
- [17] Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Silva DC, Moraes GA, Serafin MB, Tizotti MK *et al* (2018) Synergistic antibacterial effect of statins with the complex {[1-(4-bromophenyl)-3-phenyltriazeneN3-oxide- κ^2 N1,O4](dimethylbenzylamine- κ^2 C1, N4)palladium(II)}. *Braz J Pharm Sci* 54:1-9. <https://doi:10.1590/s2175-97902018000217369>.
- [18] Rangel VA, Bernstein LR, Mandujano TEA, García CSJ, García CR (2015) Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Frontiers in Microbiology* 6:282. <https://doi:10.3389/fmicb.2015.00282>.
- [19] Zheng W, Sun W, Simeonov A (2018) Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology* 175(2):181-191. <https://doi:10.1111/bph.13895>.
- [20] Rosa TF, Coelho SS, Foletto VS, Bottega A, Serafin MB, Machado C, Franco LN, Paula BR, Horner R (2020) Alternatives for the treatment of infections caused by ESKAPE pathogens. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 45:863-873. [https://doi: 10.1111/jcpt.13149](https://doi:10.1111/jcpt.13149).
- [21] CLSI (2014) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI standard M07-A9, 9th edn. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, PA. ISBN: 1-56238-785-5
- [22] Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(1):1-1: <https://doi:10.1093/jac/dkg301>.
- [23] Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Samseny ARRR., Hilou A, Souza A *et al* (2012) Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index

(FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 11:1-12. <https://doi:10.1186/1476-0711-11-18>.

[24] *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (1999) *Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents*. Approved Guideline M26-A. Wayne, USA: NCCLS.

[25] Das B, Mandal DM, Dash SK, Chattopadhyay S, Tripathy SS, Dolai DP, Dey SK, Roy S (2016) Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage- associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Infectious Diseases: Research and Treatment* 16(9):11-19. <https://doi:10.4137/IDRT.S31741>.

[26] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003) *Current protocols in molecular biology*. 5th edn. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA; ISBN: 978-0-471-50338-5.

[27] Domingues VO, Horner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues J et al (2010) *In Vitro* Evaluation of Triazines: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. *Journal Braz. Chem. Soc* 21(12): 2226-2237. <https://doi:10.1590/S0103-50532010001200009>.

[28] Munoz-Belido JL, Munoz-Criado S, García-Rodríguez JÁ (2000) Antimicrobial activity of psychotropic drugs Selective serotonin reuptake inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:177-180. [https://doi:10.1016/S0924-8579\(99\)00154-5](https://doi:10.1016/S0924-8579(99)00154-5).

[29] Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X (2012) The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56(7):3758-66. <https://doi:10.1128/AAC.00212-12>.

[30] Dastidar SG, Mondal U, Niyogi S, Chakrabarty AN (1986) Antibacterial property of methyl-DOPA and development of cross-resistance in m-DOPA mutants. *Indian J Med Res* 84: 142-147.

[31] Mandal A, Sinha C, Jena AK, Ghosh S, Samanta A (2010). An investigation on in vitro and in vivo antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:635-642. [https://doi: 10.1590/S1517-83822010000300014](https://doi:10.1590/S1517-83822010000300014).

[32] Serafin MB, Bottega A, Foletto VS, Rosa TF, Rampelotto RF, Carvalho FA, Horner, R (2018) Synergistic effect of sertraline and disulfiram against multidrug resistant bacteria as a new alternative to drug repositioning. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences* 56:1-6. <https://doi:10.1590/s2175-97902019000418089>.

[33] Sousa AK, Rocha JE, Gonçalves ST, Sampaio FT, Ribeiro FJ, Melo CHD (2018) New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. *Microb Pathog* 123:368-371. [https://doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.040](https://doi:10.1016/j.micpath.2018.07.040).

[34] Schneider EK, Reyes-Ortega F, Velkov T, Li J (2017) Antibiotic – non-antibiotic combinations for combating extremely drug-resistant Gram-negative “superbugs”. *Essays Biochem* 61:115-125. <https://doi:10.1042/EBC20160058>.

[35] Brunton LL, Lazo JS, Parkker KL (2006) *Goodman & Gilman*, McGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro.

5.3 MANUSCRITO 2

O **manuscrito 2** intitulado “**Avaliação *in vitro* de triazenos *N*-óxidos: atividade citotóxica, antibacteriana e de nuclease química frente a linhagens do melanoma e carcinoma hepatocelular**”, foi redigido de acordo com as normas de publicação do periódico “*Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*”.

Após apreciação da banca examinadora, o manuscrito será finalizado, traduzido para o idioma exigido (inglês) e submetido para avaliação dos editores e revisores do respectivo periódico.

Avaliação *in vitro* de triazenos *N*-óxidos: atividade citotóxica, antibacteriana e de nuclease química frente ao melanoma e carcinoma hepatocelular

Angelita Bottega¹, Altevir Rossatto Viana², Marissa Bolson Serafin³, Luciana Maria Fontanari Krause⁴, Tacieli Fagunde da Rosa⁵; Manfredo Hörner⁶, Rosmari Hörner⁷.

¹Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: angelitabotega@yahoo.com.br

²Laboratório de Biociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: rossato.viana@hotmail.com

³Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: mbs_1304@hotmail.com

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: lfontanari@yahoo.com.br

⁵Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: tacielifagundesdarosa@gmail.com

⁶ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil: hoerner.manfredo@gmail.com

⁷ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: rosmari.ufsm@gmail.com

Correspondence: Rosmari Hörner.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Avenida Roraima, 1000 - Cidade Universitária, Camobi, CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS, Brazil. Phone: 55 3220-8751; Mobile: 55 99111-9691. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com.

Resumo

Introdução: A escassez de novos medicamentos e o aumento exponencial das doenças neoplásicas e infecciosas são considerados um sério problema de saúde pública. Os triazenos (TZCs) são compostos que apresentam diversificada atividade biológica, sendo objeto de constantes estudos direcionados a descoberta de tratamentos para essas doenças. Reportamos a avaliação da atividade biológica de três TZCs *N*-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M3** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II): **C1** ({Bis[3-(4-clorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}) e seus respectivos precursores: **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofenil-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina). **Métodos:** O potencial citotóxico foi determinado *in vitro* por meio do ensaio colorimétrico com o reagente MTT, utilizando-se culturas de linhagens celulares (tumerais: B16F10 - melanoma murino; HepG2 - hepatocarcinoma humano; não neoplásica: 293T - fibroblasto de rim humano embrionário). O potencial de nuclease química foi verificado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), frente a 12 cepas bacterianas, sendo 7 padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e 5 isolados clínicos multirresistentes (MDR). **Resultados:** Entre as moléculas *N*-óxidos livres, **M1** apresentou maior citotoxicidade frente às linhagens HepG2 (IC₅₀ = 2.664 μM) e B16F10 (IC₅₀ = 3.950 μM), sendo mais ativa que os respectivos quimioterápicos padrões tosilato de sorafenibe (nexavar® - Bayer) (IC₅₀ = 7.133 μM) e temozolomida(temodal® - Schering-Plough) (IC₅₀ = 8.402 μM). Entre os complexos, **C3** foi mais ativo frente a HepG2 (IC₅₀ = 2.672 μM) e B16F10 (IC₅₀ = 3.527 μM), sendo mais citotóxico que tosilato de sorafenibe (IC₅₀ = 7.133 μM) e temozolomida (IC₅₀ = 8.402 μM) respectivamente. **C3** também apresentou atividade antibacteriana tanto frente a cepas Gram positivas quanto Gram negativas. Na atividade de nuclease química, os compostos não foram aptos a clivar o DNA plasmidial. **Conclusão:** Tanto a molécula *N*-óxido livre **M1**, como o complexo triazenido **C3** apresentaram valores de IC₅₀ sobre as linhagens HepG2 e B16F10 menores do que os medicamentos em uso clínico sorafenibe® e temozolomida®, sugerindo que podem ser uma alternativa para a descoberta de fármacos para o tratamento de cânceres como melanoma e hepatocarcionoma. Porém, ensaios clínicos *in vivo* e testes clínicos deverão ser realizados para investigar os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade para garantir sua segurança e eficácia.

Keywords: Triazenos, Triazenos *N*-óxidos, Citotoxicidade, Resistência Bacteriana, Clivagem.

1. INTRODUÇÃO

As doenças neoplásicas e infecciosas aumentaram consideravelmente nas últimas décadas. Esse fato, aliado à escassez de novos agentes terapêuticos, tem se tornado um sério problema de saúde pública [1,2,3]. O melanoma maligno é a mais frequente causa de morte entre as doenças que atingem a pele. A Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*) previu que em 2040, os casos de melanoma chegarão a quase meio milhão (466.914 casos), um aumento de 62%. A Instituição previu ainda, que as taxas de mortalidade aumentarão 20% nos próximos anos, passando de 60.712 casos em 2018 para 72.886 casos em 2025 [5].

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC), constitui cerca de 70 - 85% das neoplasias hepáticas. É o tumor primário do fígado, sendo o 6º tipo de câncer mais incidente no mundo e um dos mais letais, representando a quinta causa mais frequente de neoplasias em homens e a sétima em mulheres [6]. Embora os tratamentos atualmente disponíveis para essas doenças, tenham melhorado a sobrevida dos pacientes, ainda há limitações, pois geralmente baseiam-se na quimioterapia limitada por fatores como imunossupressão, resistência e toxicidade, as quais corroboram para taxas significativas de mortalidade [4,7,8].

Os triazenos (TZCs), classe de compostos de cadeia alifática aberta que se caracterizam por apresentarem três átomos de nitrogênio interligados em sequência (-N=NN), despertam o interesse da comunidade científica, que busca por alternativas inovadoras no combate às doenças neoplásicas e infecciosas. Esses compostos, já apresentam diversificada atividade biológica, como antitumoral [13, 14, 15, 16], antibacteriana [17, 18, 19, 20], e de clivagem do DNA [19].

Os *N*₁-óxidos derivam dos TZCs clássicos pela substituição do átomo de hidrogênio (H) no fragmento -N(H) por uma função hidroxila (OH), resultando em um sistema tautômero na forma de um *N*-óxido/*N*-hidróxido triazeno. Estes compostos atuam preferencialmente como agentes quelantes frente a íons metálicos, principalmente os de transição, promovendo a formação de um anel quelato de cinco membros livres de carbono, apresentando a capacidade de coordenar-se tanto a metais de caracter mole quanto a metais mais duro [21,18]. Estas espécies têm diferentes aplicações na área biológica, especialmente no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos [22,23, 24].

Reportamos a avaliação biológica inédita de moléculas TZCs *N*-óxidos: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II): **C1** ({*Bis*[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}), **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)} e **C3** ({*Bis*[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)} e seus respectivos precursores, **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-

Bromofenil-amina) e **P3** (4-*Iodofenil-amina*). A citotoxicidade foi determinada *in vitro* por meio do ensaio colorimétrico com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), utilizando-se culturas de linhagens celulares (tumerais: B16F10 - melanoma murino; HepG2 - hepatocarcinoma humano; não neoplásica: 293T - fibroblasto de rim humano embrionário). O potencial de nuclease química foi avaliado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas padrão de referência da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos multirresistentes (MDR).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Moléculas selecionadas

As moléculas TZCs *N-óxidos* livres (**M1**, **M2** e **M3**), complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) (**C1**, **C2** e **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2** e **P3**), foram cedidas para investigação de suas atividades biológicas, pelo Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o NITriCo, através de parceria interlaboratorial. A síntese e caracterização das moléculas *N-óxidos* livres, já foram elucidadas na publicação de Martins e colaboradores, no periódico *CrystEngComm* em novembro de 2017 (MARTINS et al., 2017) [25]. Já os complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II), resultantes da coordenação das moléculas **M1**, **M2** e **M3** desprotonadas na forma dos respectivos ânions ligantes, foram caracterizadas e sintetizadas por Moraes, G. A. (2013) [26]. As estruturas químicas dessas moléculas são apresentadas na figura 1.

2.2 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

2.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens celulares tumorais aderentes B16-F10 e HepG2 e a linhagem não neoplásica 293T, foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). A linhagem 293T foi utilizada no estudo, como controle para determinar o grau de seletividade dos compostos em relação as células neoplásicas. Todas as linhagens foram cultivadas em meio específico conforme as recomendações do BCRJ. Garrafas de poliestireno (Corning) 25cm³ contendo as células e meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina), foram incubadas a uma temperatura de 37 °C, em

incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Os meios de cultura foram substituídos a cada 2-3 dias, de acordo com o metabolismo das linhagens celulares. Antes de atingirem a confluência (70-80% de sua densidade de saturação) as células foram submetidas à subcultura para evitar eventual morte celular por excesso de células.

Para expansão celular, as células foram removidas mecanicamente da superfície do frasco de cultura primária com auxílio de *cell scraper*. Em seguida, as células com meio de cultura foram transferidas para tubos falcon (Corning) e centrifugados por 5 minutos à 1.500 RPM em centrífuga (Eppendorf). O pellet formado foi ressuspensão em meio de cultura e repassado para uma garrafa de 75cm³. Os estoques celulares foram mantidos em criotubos de congelamento, armazenadas a -80 °C.

2.2.2 Avaliação da viabilidade celular por ensaio colorimétrico - MTT

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais ainda representa um método de referência para a triagem inicial de novos agentes antineoplásicos. Dessa forma, para avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) [27]. Este método é baseado na redução do sal de tetrazólio (cor amarela) em cristais de formazan insolúveis (cor púrpura), pelas enzimas succinato desidrogenase mitocondriais presentes nas células viáveis [28].

Os experimentos com as linhagens celulares foram realizados com as células cultivadas na quarta passagem após o descongelamento. Após a subcultura, os frascos de poliestireno contendo as linhagens celulares em crescimento exponencial foram retirados da incubadora e o número de células viáveis foi estimado por hemocitometria (câmara de Neubauer), com auxílio do corante azul de tripan 0,4%. A densidade das suspensões celulares foi ajustada para 5×10^4 células mL⁻¹ (células aderentes), sendo que exatamente 200 µL/poço contendo aproximadamente 10.000 células, foram adicionados a microplacas de 96 orifícios com fundo plano. As linhagens celulares B16-F10, HepG2 e 293T foram adicionadas nos poços por 24 horas para aderência suficiente de células. A seguir, as células foram incubadas com sete diferentes concentrações dos compostos (1µM; 3µM; 6µM; 12µM; 25µM; 50µM; 100µM) por 24 h, a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Além disso, foram utilizadas culturas controle contendo células na ausência dos compostos para fins de comparação.

Após o período de incubação, 20µL de solução salina estéril contendo MTT (5mg/mL) foi adicionada aos poços e as placas foram incubadas por mais 4 horas. Por conseguinte, o meio foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan dissolvidos pela adição de 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A citotoxicidade foi detectada por meio da medida das absorbâncias a 570nm em leitora de microplacas (Anthos-2010). Os experimentos foram todos realizados em

triplicata e a viabilidade celular para cada concentração dos compostos foi expressa em porcentagem, comparada com a obtida para os controles não tratados (100% de viabilidade). Os valores de IC₅₀ (concentração do composto teste que reduziu a viabilidade celular em 50% em comparação com células controle (não tratadas)) foram estimados por análise de regressão não linear utilizando o software Graph Pad Prism (versão 5.0). Os dados foram relatados considerando uma média de três experimentos individuais realizados em triplicatas.

Para fins de controle e comparação, além da atividade citotóxica dos compostos testes, foram avaliadas as atividades dos medicamentos antineoplásicos utilizados na prática clínica: temozolomida - TMZ (temodal® - Schering-Plough) e tosilato de sorafenibe - SRF (nexavar® - Bayer). O quimioterápico temozolomida foi eleito por representar a classe dos triazenos comercialmente disponíveis.

2.3 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

2.3.1 Cepas bacterianas

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a doze cepas bacterianas sendo: sete padrões de referência da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e cinco isolados clínicos multirresistentes (MDR). As cepas encontravam-se armazenadas em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) contendo 15% de glicerol a - 20 °C. As cepas ATCC Gram positivas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Micrococcus luteus* ATCC 7468. Já as Gram negativas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Os cinco isolados clínicos MDR, foram obtidos de pacientes admitidos em um hospital universitário de Santa Maria - RS, sendo: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* os quais foram identificados através de provas fenotípicas manuais e automatizadas pelo aparelho Vitek® 2 (*BioMérieux, Marcy l'Etoile*, França), no Laboratório de Microbiologia do referido hospital, e cedidas para realização dos experimentos. O perfil de resistência dos isolados são apresentados na tabela 2.

2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pelo método padrão de microdiluição em caldo, seguindo-se o documento M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012 (CLSI-2012) [29].

Todos os compostos analisados foram testados nas concentrações de 0,5 µg.mL⁻¹ a 128 µg.mL⁻¹ e solubilizados em etanol absoluto. Inicialmente, foram preparadas soluções estoques

dos triazenos na concentração $2.560 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas soluções quando aplicadas nas placas foram diluídas 20 vezes na concentração mais alta testada ($128 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A partir daí, foram feitas diluições na razão de 2 para os demais poços, sendo testadas 9 concentrações (0,5 a $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foram realizados controles do solvente a fim de verificar a possível atividade do etanol sobre os microrganismos, controle positivo (somente meio de cultura e inóculo) e controle negativo (somente meio de cultura), sendo que nesta concentração utilizada o etanol não apresentou atividade frente às bactérias analisadas.

O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril, utilizando-se o método de suspensão direta das colônias de culturas recentes. A referência para a turbidez da suspensão bacteriana foi o padrão 0,5 McFarland, ou seja, $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Resumidamente, microplacas de 96 orifícios, contendo caldo Muller Hinton, compostos teste ($0,5\text{-}128 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e inóculo bacteriano (1×10^5 UFC/poço), foram incubadas a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após a incubação, a CIM foi determinada como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição, sendo cada ensaio, realizado em triplicata.

2.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A análise da CBM foi realizada conforme o método descrito no documento M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), 1999 [30], com adaptações. Resumidamente, após a leitura visual da CIM, foram retirados com auxílio de uma alça de platina calibrada, aproximadamente $10 \mu\text{L}$ do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível e também do último poço utilizado como controle. Este volume foi a seguir semeado em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton, as quais foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo período de 48 horas. Após a incubação, a concentração CBM foi determinada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na subcultura.

2.4 Avaliação da atividade de nuclease dos compostos

Foram realizados ensaios de clivagem do DNA plasmidial dupla fita dos compostos com o objetivo de investigar a atividade de nuclease química dos mesmos. Para a extração do DNA plasmidial (pUC18) previamente inserido nas células bacterianas de *Escherichia coli*, cepa DH5 alfa, seguiu-se os procedimentos padrões, pela técnica de lise alcalina (“*large-scale preparation of plasmid DNA*”), descrita no livro de protocolos de Ausubel et al., 2003 [31].

A clivagem do DNA foi avaliada pela conversão do DNA plasmidial pUC18 superenovelado (Forma I) em formas de DNA circular (Forma II) e linear aberta (Forma III). O

ensaio de rastreio para obter a clivagem dos ácidos nucleicos foi realizado num volume final de 20 µL onde estavam presentes os seguintes reagentes: 2 µg de DNA plasmidial e diferentes concentrações dos compostos testados (3,75, 1,875 e 0,375 mM) e tampão Tris-HCL (pH 7,4 e pH 8,0), sendo os microtubos posteriormente, incubados a 37°C e 50°C por 24 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após período de incubação, adicionou-se 4µL de *loading buffer* as amostras, as quais foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) com aplicação de voltagem de 50-70 V por período de 2-3 horas, utilizando tampão de corrida TBE (Tris, Borato EDTA). Os géis resultantes foram digitalizados em um sistema de fotodocumentação, para quantificação das bandas do DNA.

2.5 Considerações Éticas

A utilização dos isolados para pesquisa clínica foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob CAAE 38850614.4.0000.5346. O cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen) é registrado sob o número AE78E18 - Universidade Federal de Santa Maria.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). Diferenças com $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ foram consideradas significativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde a descoberta dos efeitos antiproliferativos da cisplatina, há mais de 50 anos [11] um vasto número de complexos metálicos têm sido desenvolvidos e investigados quanto ao seu potencial biológico [12]. Os trizenos (TZCs) têm apresentado diversificada atividade biológica como antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química [13, 14, 16,17, 18, 19, 32].

Estudos relatam o potencial citotóxico de compostos trizenos frente a células neoplásicas do melanoma e hepatocarcinoma [33, 34, 35]. Os compostos TZCs *N-óxidos* ensaiados neste estudo são inéditos quanto a avaliação de suas atividades biológicas. Na tabela 1, são apresentados os valores de concentração inibitória 50% (IC_{50}), em μM , desses compostos e precursores, quando estes foram incubados por 24 horas frente às linhagens celulares tumorais (B16F10 e HepG2) e não neoplásica (293T). De acordo com os dados apresentados, pode-se inferir que os mesmos apresentaram atividade citotóxica variável.

O TZC *N-óxido* **M1** apresentou maior efeito citotóxico frente às linhagem HepG2 ($IC_{50} = 2.664 \mu M$) e B16F10 ($IC_{50} = 3.950 \mu M$). Entre os complexos trizenidos *N-óxidos*, **C3** apresentou valores de IC_{50} relevantes quando incubados com as linhagens tumorais HepG2 ($IC_{50} = 2.672 \mu M$) e B16F10 ($IC_{50} = 3.950 \mu M$).

Observamos que tanto a molécula livre **M1** ($IC_{50} = 3.143 \mu M$), como o complexo **C3** ($IC_{50} = 5.691 \mu M$) foram citotóxicos frente à linhagem controle não neoplásica - 293T. Essa falta de seletividade é um fator indesejável, uma vez que pode ocorrer diminuição no índice terapêutico. Entretanto, grande parte dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer atuam de forma inespecífica, lezando tanto células tumorais proliferativas, como células normais, provocando efeitos colaterais relacionados à exposição prolongada ao medicamento, dentre os quais destaca-se, a cisplatina [36, 37].

Na literatura há vários relatos de pesquisas utilizando compostos TZCs frente a microrganismos, as quais demonstram que esses possuem atividade antibacteriana [16, 17, 18, 19, 20]. Horner et al., 2008 [18] e Ombaka et al., 2012 [20], sugerem que essa atividade pode estar atribuída a sua propriedade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular desses microrganismos.

Nas tabelas 3 e 4, são apresentados os resultados obtidos no ensaio *in vitro*, frente a diferentes cepas bacterianas. Nas cepas ATCC, o complexo **C3** foi mais ativo que as demais moléculas ensaiadas, sendo bacteriostático e bactericida especialmente frente a *E. faecalis* ATCC 29212 (CIM = $64 \mu g mL^{-1}$; CBM = $64 \mu g mL^{-1}$), frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 7468 e *E. coli* ATCC 25922, todas com iguais valores de CIM e CMB (CIM = $128 \mu g mL^{-1}$; CBM= $128 \mu g mL^{-1}$). Nos isolados multirresistentes, o complexo **C3** também destacou-se entre as demais moléculas, apresentando atividade antibacteriana frente à

maioria dos isolados multirresistente ensaiados, destacando-se frente a *S. aureus* (CIM = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os compostos ensaiados, apresentaram melhor atividade antibacteriana, frente às cepas GP, corroborando com outros estudos da literatura que demonstram que TZcs são mais ativos frente a esses microrganismos [17,18, 20]. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que bactérias GP possuem ácidos teicóicos em suas membranas que conferem carga negativa à superfície externa das células, auxiliando na entrada de íons positivos. Dessa forma, complexos triazenidos com cátions metálicos como **C3**, podem atuar sobre essas estruturas, o que justificaria a maior atividade antibacteriana apresentada. Além disso, os GN possuem parede celular mais complexa, apresentando uma barreira à penetração de numerosas moléculas antimicrobianas o que pode explicar a maior resistência apresentada [20,38].

Na avaliação do potencial de clivagem química realizado com DNA plasmidial superenovelado (pUC18), observou-se nas condições definidas de pH, temperatura e tempos determinados de reação, que os compostos ensaiados não foram aptos a clivar o DNA plasmidial.

5 CONCLUSÃO

Reportamos a avaliação da atividade biológica de três compostos triazenos *N*-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido) e **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II): **C1** ({*Bis*[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)} e **C3** ({*Bis*[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}) e seus respectivos precursores, **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofenil-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina). A exposição a diferentes concentrações dos TZCs ensaiados, demonstrou diferenças no potencial biológico, tanto frente às linhagens tumorais, como frente às cepas bacterianas padrão ATCC e isolados clínicos multirresistentes. A molécula livres **M1**, apresentou maior citotoxicidade frente à linhagem do hepatocarcinoma humano - HepG2 (IC₅₀ = 2.664 μ M) e melanoma murino - B16F10 (IC₅₀ = 3.950 μ M), sendo mais ativa que os respectivos quimioterápicos padrões sorafenibe (IC₅₀ = 7.133 μ M) e temozolamida (IC₅₀ = 8.402 μ M). Entre os complexos, **C3** apresentou maior IC₅₀ sobre a linhagens HepG2 (IC₅₀ = 2.672 μ M) e B16F10 (IC₅₀ = 3.527 μ M), sendo mais ativo que sorafenibe (IC₅₀ = 7.133 μ M) e temozolomida (IC₅₀ = 8.402 μ M) respectivamente. **C3** também apresentou atividade antibacteriana tanto frente a cepas Gram positivas quanto Gram negativas. Os compostos deste ensaio, não foram aptos a clivar o DNA plasmidial nas condições definidas de tempo, pH e temperatura ensaiados. Os resultados nos permitem sugerir que **M1** e **C3**, podem representar uma alternativa promissora para a descoberta de fármacos para o tratamento de cânceres como melanoma e hepatocarcinoma. Porém, testes *in vivo* e ensaios clínicos adicionais são necessários para investigar os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade para garantir sua segurança e eficácia.

Competing financial interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors are grate fulto Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for supporting this study.

Figura 1: Estrutura química das moléculas avaliadas.

COMPOSTOS	NOME DAS MOLÉCULAS	ESTRUTURA QUÍMICA
M1	<i>3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido</i>	
M2	<i>3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido</i>	
M3	<i>3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido</i>	
C1	<i>{Bis[3-(4-clorofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}</i>	
C2	<i>{Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}</i>	
C3	<i>{Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}</i>	
P1	<i>4-clorofenil-amina</i>	
P2	<i>4-bromofenil-amina</i>	
P3	<i>4-iodofenil-amina</i>	

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Tabela 1 - Atividade citotóxica (IC₅₀ μM) dos compostos triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), incubados por 24 horas com as linhagens celulares tumorais (HepG2 e B16F10) e não neoplásica (293T).

COMPOSTOS ENSAIADOS	IC ₅₀ valores (μM)		
	HepG2	B16F10	293T
M1	2.664 ± 1.30	3.950 ± 1.27	3.143 ± 1.49
M2	44.55 ± 1.44	>100	11.54 ± 1.42
M3	58.95 ± 1.44	>100	3.882 ± 1.30
C1	32.06 ± 1.24	8.568±1.38	12.63±1.96
C2	8.561 ± 1.53	8.666±1.18	8.648±1.44
C3	2.672 ± 1.13	3.527±1.28	5.691±1.58
P1	9.988 ± 2.37	>100	10.74 ± 1.31
P2	14.69 ± 4.80	9.844 ± 2.13	9.272 ± 1.95
P3	13.13 ± 1.21	2.070 ± 5.30	13.95 ± 1.11
TMZ	-	8.402 ± 1.11	-
SFB	7.133 ± 1.08	-	-

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M2** : (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M3**: (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) **P1**: (4-Clorofenil-amina); **P2**: (4-Bromofeni-amina); **P3**: (4-Iodofenil-amina); **TMZ**: temozolamida; **SFB**: sorafenibe; (-) non determined.

Fonte: Preparado pela autora, 2021.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos MDR avaliados no estudo.

Isolados Clínicos MDR	Origen Clínica	Antibióticos Resistentes	Antibióticos Sensíveis
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sangue	AMP/SUL, PIP/TAZ, CEF/AX, CEFO, CEFET, CEFTR, CEFE, IMI, MER,CIP	AMI, TIG, COL
<i>Escherichia coli</i>	Líquido Ascítico	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFE, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, CEFE, ERTA, IMI, MER,GENT,CIP, TIG, COLI	AMI, GEN
<i>Enterococcus faecium</i>	Urina	AMP, LVX, ERY, CLI, TEI, VAN, SUT	LIN, TIGE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFE, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, ERTA, IMI, MER, GEN, CIP,TIG, COL	AMI, COL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sangue	BEN, OXA, LVX, ERY	CEFTA, GEN, CLI, LNZ, DAPT, TEI, VAN, TIG, NIT, RIF, SUT

AMI - amikacin, AMP/SUL – ampicillin/sulbactam, AMP - ampicillin, BEN - Benzylpenicillin, CEFE - cefepime, CEF/AX - Cefuroxime Axetil, CEFO – cefoxitin, CEFU - cefuroxime, CEFTA - ceftazidime, CEFTR - ceftriaxone, CIP - ciprofloxacin, CLI - clindamycin, COL - colistin, DAPT – daptomicyn, GEN - gentamycin, ERY - erythromycin, ERT - ertapenem, IMI - imipenem, LVX- levofloxacin, LNZ - linezolid, MER - meropenem, OXA - oxacillin, PEN - penicillin, PIP/TAZ - Piperaciclina/Tazobactan, RIF – Rifamicyn, SUT- sulphamethoxazole/ trimethoprim, STR- streptomycin, TEI - teicoplanin, TIG - tigecycline, VAN- vancomycin, NIT - Nitrofurantoin.

Fonte: Preparada pela autora, 2021.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana *in vitro* de compostos triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), frente á cepas bacterianas padrão ATCC e isolados clínicos Gram positivos.

Compostos Ensaiaados	Cepas padrão ATCC								Isolados Clínicos MDR				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>M. luteus</i> ATCC 7468		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecium</i>		
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
	(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		
M1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128
M2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	>128	=128	>128	>128	>128
C1	=128	>128	>128	>128	=128	=128	>128	>128	=128	=128	=128	>128	>128
C2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
C3	=128	=128	=128	>128	=64	=64	=128	=128	=64	=64	=128	=128	=128
P1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P2	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M2** : (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M3:** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) **P1:** (4-Clorofenil-amina); **P2:** (4-Bromofeni-amina); **P3:** (4-Iodofenil-amina).

Source: Preparado pela autora, 2021.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana *in vitro* de compostos triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), frente á cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos Gram negativos.

Compostos Ensaiaados	CEPAS ATCC						ISOLADOS CLÍNICOS MDR					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603		<i>E.coli</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)	
M1	>128	>128	=128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
C1	>128	>128	=128	>128	>128	>128	=128	>128	=128	>128	>128	>128
C2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
C3	=128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	=128	=128	>128
P1	>128	>128	=128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M2** : (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M3:** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) **P1:** (4-Clorofenil-amina); **P2:** (4-Bromofeni-amina); **P3:** (4-Iodofenil-amina).

Fonte: Preparado pela autora, 2021.

REFERENCIAS

1. Chopra, I. The 2012 garrod lecture: discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *J. antimicrob. chemother.*, **2013**, 68, 496-505. DOI:10.1093/jac/dks436.
2. Carlet, J.; Rambaud, C.; Pulcini, C. Save Antibiotics: a call for action of the world alliance against antibiotic resistance (waaar). *BMC infect. dis.*, **2014**, 14 (436), 1-2. DOI:10.1186/1471-2334-14-436.
3. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. j. cancer.*, **2015**, 136(5), p. 359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
4. Bray, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Zanetti, R.; Ferlay, J. Cancer incidence in five continents volume XI. Lyon: International Agency for Research on Cancer. *Ca cancer j clin.*, **2018**, 68, 394-424.
5. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Mathieu, L.; Soerjomataram, I.; Ahmedin Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca cancer j clin.* **2021** Feb 4. DOI: 10.3322/caac.21660. Epub ahead of print. PMID: 33538338.
6. American Cancer Society. Cancer facts & figures **2019**. Atlanta, 2016. <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>>.
7. McGlynn, K. A.; Petrick, J.L.; London, W.T. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis.*, **2015**, 19 (2), 223-238. DOI:10.1016/j.cld.2015.01.001.
8. Gao, J.J.; Petrick J.L.; London, T.W. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, **2015**, 21 (42), 12059-12070. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.12059.
9. Moriguchi, M.; Umemura, A.; Itoh, Y. Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Clin J Gastroenterol.*, **2016**, 9(4), 184-190. DOI 10.1007/s12328-016-0670-7.
10. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. Brasília: Ministério da Saúde, **2013**.
11. Franco, J.M. P.; Menezes, C.D.A.; Cabral, F. R. F. Resistência bacteriana e o papel do farmacêutico frente ao uso irracional de antimicrobianos: revisão integrativa. *Revista de ciências.*, **2015**, 3(2), 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.19095/rec.v3i2.64>.
12. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature.*, **1965**, 205, 698-699.
13. Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews.*, **2014**, 114 (8), 4540-4563. DOI:10.1021/cr400460s.

14. Cimbora-Zovko, T.; Brozovic, A.; Piantanida, I.; Fritz, G. Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. *European J. of Medic. Chemistr.*, **2011**, 46(7), 2971-2983. DOI:10.1016/j.ejmech.2011.04.024
15. Bonmassar, L.; Marchesi, F.; Pascale, E.; Franzese, O.; Margison, G.P.; Bianchi, A.; D'Atri, S.; Bernardini, S.; Lattuada, D.; Bonmassar, E.; Aquino, A. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Short Review and a Case Report. *Current Med. Chemistry.*, **2013**, 20, 2389-2401. DOI: 10.2174/0929867311320190001.
16. Brozovic, A.; Stojanovic, N.; Ambriovic-Ristov, A. Polanc, S.; Osmak, M. 3-Acetyl-bis(2-chloro-4-nitrophenyl)triazene is a potent antitumor agent that induces oxidative stress and independently activates the stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Anticancer Drugs.*, **2014**, 25(3), 289-295. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000060.
17. Tizotti, M. K.; Horner, R.; Freitas, A. G. O.; Kempfer, C.B.; Bottega, A.; Rodrigues J.N.; Cóser, V. M.; Locatelli, A.; Paraginsk, G. Giacomelli, C.; Hörner, M. X-ray characterization and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazene complex {Au(I)[RPhNNNPhR']][PPh₃] [R = (C=O)NH₂, R' = (C=O)CH₃]. *Inorganic Chimica Ata.*, **2016**, 441, 78-85. DOI:10.1016/j.ica.2015.10.038.
18. Hörner, M.; Giglio, F.V.; Santos, A.J.R.W.A.; Westphalen, A. B.; Iglesias, B. A.; Martins, P.R.; Amaral, C.H.; Michelot, T.M.; Reetz, L.G.B.; Bertoncheli, C.M.; Paraginski, G.L.; Horner, R. Triazeno e atividade antibacteriana. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas.*, **2008**, 44 (3), 441-449.
19. Domingues, V. O.; Hörner R.; Reetz, L.G.B.; Kuhn, F.; Coser, V.M.; Rodrigues, J.N.; Bauchspiess, R.; Pereira, W.V.; Paraginski, G.; Locatelli, A.; Fank, J.O.; Giglio, V.F.; Hörner, M. In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *J. of the Braz. Chemical Society.*, **2010**, 21 (12), 2226-2237.
20. Ombaka, A. O; Muguna, A. T.; Gichumbi, J. M. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. *J. of Environmental Chemistry Ecotoxicology.*, **2012**, 4, 133-136.
21. Manzoni de Oliveira, G.; Hörner, M.; Machado, A.; Back, D.F.; Monteiro, J.H.S.K.; Davolos, M. R. New chelate complexes of trivalent Y and lanthanides (Eu, Ho, Yb) with a triazene N-oxide: Synthesis, structural characterization and luminescence properties. *Inorg. quimica acta.* **2011**, 366, 203-208.
22. Paraginski, G.L.; Berticelli, C.R.; Zambiasi, P.J.; Paraginski, V.T.K.; Hörner, M.; Santos, A.J.W.A.; Hörner, R. Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à artemia salina leach. de alguns compostos triazenos. *quím. nova.*, **2014**, 37(7), 1138-1144. DOI:10.5935/0100-4042.20140180.
23. Stevens, M.F.M.; Gescher, A.; Turnbull, C.P. *Biochem. Pharmacol.*, **1979**, 28, 769-776.
24. Rachid, M. Z.; MacPhee, C.; Williams, M. et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5505-5509.
25. Martins, M. P.; Salbego, P.R.S.; Moraes, G.A. Understanding the Crystalline Formation of Triazene N-Oxides and the Role of Halogen- π Interactions. *CrystEngComm.*, **2017**, 1-35. DOI: 10.1039/C7CE02015E.

26. Moraes, G.A. Triazenos N-óxidos e seus complexos de Au(I) e Pd(II): Uma abordagem no contexto da engenharia de cristais. 2018.314 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, **2018**. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/14696>>.
27. Plumb, J. A.; Milroy, R.; Kaye, S. B. Effects of the pH of 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research.*, **1989**, 49, 4435-4440.
28. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. immunol. Methods.*, **1983**, 65, 55-63.
29. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, in: CLSI document M07-A9, Wayne, PA, **2012**.
30. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26- A. Wayne, USA: NCCLS; **1999**.
31. Ausubel, F.; Brent R.; Kingston R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. *Short Protocols in Molecular Biology*. 4. ed. John Wiley & Sons, **1999**.
32. Seiter, K.; Katragadda, S.; Ponce, D.; Rasul, M.; Ahmed, N. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. *J. of Hematology and Oncology.*, **2009**, 2(21), 1-6 . DOI:10.1186/1756-8722-2-21.
33. Adibi, H.; Majnooni, M.B.; Mostafaie, E.; Mansouri, K.; Mohammadi, M. Synthesis, and *in-vitro* cytotoxicity studies of a series of triazene derivatives on human cancer cell lines. *Iranian J. of Pharmaceutical Research.*, **2013**, 12 (4), 695-703.
34. Alvino, E.; Gilberti, S.; Cantagallo, D. In vitro antitumor activity of 3 ϵ -desamino-3 ϵ -(2-methoxy-4-morpholinyl)doxorubicin on human melanoma cells sensitive or resistant to triazeno compounds. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **1997**, 40, 180-184.
35. Sousa, S.; Santos, F.; Gaspar, M.M.; Calado, S.; Pereira, J.D.; Mendes, E.; Francisco, A.P.; Perry, M.J. The Selective Cytotoxicity of New Triazene Compounds to Human Melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **2017**, 25 (15), 3900-3910. DOI:10.1016/j.bmc.2017.04.049.
36. Bodiga, V. L.; Bodiga, S.; Surapud, S.; Boindala, S.; Putcha, U.; Nagalla, B.; Subramaniam, K.; Manchala, R. Effect of vitamin supplementation on cisplatin-induced intestinal epithelial cell apoptosis in Wistar/NIN rats. *Nutrition.*, **2012**, 28, 572-580. DOI:10.1016/j.nut.2011.09.007.
37. Odii, B. O.; Coussons, P. Reduction of Cisplatin Cytotoxicity in Hepatocarcinoma Cells by Optimization of Treatment Conditions. *International Journal of Scientific Research.*, **2014**, 3, 297-302.
38. Pankey, G.A.; Sabath, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, 38(6), 864-870.

5.4 MANUSCRITO 3

O **manuscrito 3**, intitulado “*Avaliação da atividade biológica de moléculas trizenos N-Óxidos inéditas frente a linhagens celulares do glioblastoma multiforme: U87MG e T98G*” está sendo redigido de acordo com as normas de publicação do periódico “*Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*”.

Após apreciação da banca examinadora, o manuscrito será finalizado, traduzido para o idioma exigido (inglês) e submetido para avaliação dos editores e revisores do respectivo periódico.

Avaliação da atividade biológica de moléculas triazenos *N*-Óxidos inéditas frente a linhagens celulares do glioblastoma multiforme: U87MG e T98G

Angelita Bottega¹, Altevir Rossatto Viana², Marissa Bolson Serafin³, Luciana Maria Fontanari Krause⁴, Guilherme Alves de Moraes⁵, Priscilla Jussiane Zambiasi⁶, Manfredo Hörner⁷, Rosmari Hörner⁸.

¹Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: angelitabotega@yahoo.com.br.

²Laboratório de Biociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: rossato.viana@hotmail.com

³Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: mbs_1304@hotmail.com

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: lfontanari@yahoo.com.br

⁵ Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: guilhermemoraes18@yahoo.com.br

⁶Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil: priscila pzambiasi@gmail.com

⁷ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil: hoerner.manfredo@gmail.com

⁸Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil: rosmari.ufsm@gmail.com

Correspondence: Rosmari Hörner.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Avenida Roraima, 1000 - Cidade Universitária, Camobi, CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS, Brazil. Phone: 55 3220-8751; Mobile: 55 99111-9691. E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com.

Resumo

Informação: O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral de origem astrocítica, com maior grau de malignidade (grau IV), que acomete mais frequentemente, indivíduos de idade adulta. As terapias indicadas são a ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, todas com baixa eficiência devido a sua agressividade, que leva a altas taxas de morbimortalidade. Além dessa problemática, estão as doenças infecciosas, que têm aumentado consideravelmente. Os triazenos (TZCs) são compostos que devido a sua ampla versatilidade biológica têm sido objeto de constantes estudos. Reportamos a avaliação da atividade biológica de três moléculas triazenos *N*-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II): **C1** ({*Bis*[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}); **C3**{*Bis*[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)} e seus respectivos precursores **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina). **Métodos:** A citotoxicidade foi determinada *in vitro* por meio do ensaio colorimétrico com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), utilizando-se culturas de linhagens celulares do glioblastoma multiforme (U87MG e T98G). A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), frente a 10 cepas bacterianas, sendo seis padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e quatro isolados clínicos multirresistentes (MDR). **Resultados:** Frente à linhagem U87MG do glioblastoma multiforme, as moléculas *N*-óxidos livres apresentaram maior efeito citotóxico, destacando-se a atividade de **M1** (IC₅₀ = 1.488 µM), que foi aproximadamente três vezes mais ativo que quimioterápico padrão temozolimide (IC₅₀ = 4.369 µM). Já frente à linhagem T98G, os complexos triazenidos *N*-óxidos apresentaram maior atividade, dos quais destacamos o complexo **C2** (IC₅₀ = 9.211 µM), cujos valores de IC₅₀ é próximo ao apresentado pelo padrão temozolomide (IC₅₀ = 7.326 µM), uma vez que é relatado que essa linhagem apresenta maior resistência frente a esse quimioterápico, devido à superexpressão de genes envolvidos com a execução do reparo. Os TZCs apresentaram atividade antibacteriana, especialmente frente às cepas Gram positivas. **Conclusões:** **M1**(3-(4-clorofenil)-3-feniltriazeno *N*₁-óxido) e **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)})) consistem potencial para descoberta de novos medicamentos para o tratamento do glioblastoma multiforme. Testes *in vivo* e ensaios clínicos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos de ação envolvidos para garantir sua segurança e eficácia.

Keywords: Triazenos, Citotoxicidade, Glioblastoma multiforme, Resistência Bacteriana, Clivagem.

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral, que acomete mais frequentemente, indivíduos de idade adulta. É classificado pelo seu grau de malignidade como sendo de alto grau (grau IV) pela Organização Mundial da Saúde de 2016 (OMS), sendo o glioma difuso mais agressivo da linhagem astrocítica [1, 2, 3]. A incidência anual é de três a quatro casos por cada 100.000 adultos [4]. O padrão terapêutico estabelecido na terapia de primeira linha para GBM combina ressecção cirúrgica, radioterapia, seguida de quimioterapia com temozolomida (TMZ). Esta abordagem melhorou significativamente a sobrevida. No entanto, o prognóstico ainda é desfavorável, e gira em torno de 14 meses, sendo que há recorrência em praticamente todos os pacientes, que acabam evoluindo a óbito [5, 6]. Assim, existe uma clara necessidade de encontrar novas estratégias terapêuticas para o tratamento do GBM.

Os triazenos (TZCs), classe de compostos de cadeia alifática aberta que se caracterizam por apresentarem três átomos de nitrogênio interligados em sequência (-N=N-N(H)-), têm se destacado, pelo fato de já terem sido comprovadas suas diversificadas atividades biológicas como, antitumoral, antibacteriana e de nuclease química [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Os *N*₁-óxidos derivam dos TZCs clássicos pela substituição do átomo de hidrogênio (H) no fragmento -N(H) por uma função hidroxila (OH), resultando em um sistema tautômero na forma de um *N*-óxido/*N*-hidróxido triazeno. Atuam preferencialmente como quelatos frente a íons metálicos, principalmente os de transição, promovendo a formação de um anel com cinco membros livres de carbono, apresentando a capacidade de coordenar-se tanto a metais de caracter mole quanto a metais de caracter mais duros [11, 14]. Estas espécies têm diferentes aplicações na área biológica, especialmente no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos [15,16].

Reportamos a avaliação da atividade biológica de três moléculas TZCs *N*-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), três complexos triazenidos de Cu(II): **C1** ({Bis[3-(4-clorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , O^4]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , O^4]cobre(II)}); **C3**{Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , O^4]cobre(II)}) e seus respectivos precursores: **P1** (4-Clorofenil-amina); **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina). A citotoxicidade foi determinada *in vitro* por meio do ensaio colorimétrico com o reagente MTT, utilizando-se culturas de linhagens celulares tumorais do glioblastoma multiforme (U87MG e T98G). A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Moléculas triazenos *N*-óxidos selecionadas.

As moléculas *N*-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido), os complexos triazenidos de Cu(II): **C1** ({*Bis*[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({*Bis*[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)}); **C3**{*Bis*[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido- κ^2N^1 , *O*⁴]cobre(II)} e seus respectivos precursores **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina), foram cedidas para investigação de suas atividades biológicas, pelo Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o NITriCO, através de parceria interlaboratorial. A síntese e caracterização das moléculas *N*-óxidos livres foram elucidadas na publicação de Martins e colaboradores, no periódico *CrystEngComm* em novembro de 2017 [17]. Já os complexos triazenidos foram sintetizados e caracterizados por Moraes (2013) [18].

2.2 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

2.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

A linhagem celular U87MG do glioblastoma multiforme, foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). Já a linhagem T98G, foi gentilmente cedida pela Dra. Valeria Valente, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Araraquara, São Paulo, Brasil. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio específico conforme as recomendações do BCRJ. Garrafas de poliestireno (Corning) 25cm³ contendo às células e meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640– Sigma-Aldrich), suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina), os quais, foram incubados a uma temperatura de 37 °C, em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Os meios de cultura foram substituídos a cada 2-3 dias, de acordo com o metabolismo das linhagens celulares. Antes de atingirem a confluência (70-80% de sua densidade de saturação) as células foram submetidas à subcultura para evitar eventual morte celular por excesso de células.

Para expansão celular as células foram removidas mecanicamente da superfície do frasco de cultura primária com auxílio de *cell scraper*. Em seguida, as células com meio de cultura foram transferidas para tubos falcon (Corning) e centrifugados por 5 minutos à 1.500 RPM em centrífuga (Eppendorf). O pellet formado foi ressuspenso em meio de cultura e repassado para uma garrafa de 75cm³. Os estoques celulares foram mantidos em criotubos de congelamento, armazenadas em freezer

a -80 °C. Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade.

2.2.2 Avaliação da viabilidade celular por ensaio colorimétrico - MTT

Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) [19]. Este método é baseado na redução do sal de tetrazólio (cor amarela) em cristais de formazan insolúveis (cor púrpura), pelas enzimas succinato desidrogenase mitocondriais presentes nas células viáveis [20].

Os experimentos com as linhagens celulares foram realizados com as células cultivadas na quarta passagem após o descongelamento. Após a subcultura, os frascos de poliestireno contendo as linhagens celulares em crescimento exponencial foram retirados da incubadora e o número de células viáveis foi estimado por hemocitometria (câmara de Neubauer), com auxílio do corante azul de tripan 0,4%. A densidade das suspensões celulares foi ajustada para 5×10^4 células mL⁻¹ (células aderentes), sendo que exatamente 200 µL/poço contendo aproximadamente 10.000 células, foram adicionados a microplacas de 96 orifícios com fundo plano. As linhagens celulares T98G e U87MG foram adicionadas nos poços por 24 horas para aderência suficiente de células. A seguir, as células foram incubadas com sete diferentes concentrações dos compostos (1µM; 3µM; 6µM; 12µM; 25µM; 50µM; 100µM) por 24 h, a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Além disso, foram utilizadas culturas controle contendo células na ausência dos compostos para fins de comparação.

Após o período de incubação, 20µL de solução salina estéril contendo MTT (5mg/mL) foi adicionada aos poços e as placas foram incubadas por mais 4 horas. Por conseguinte, o meio foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan dissolvidos pela adição de 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A citotoxicidade foi detectada por meio da medida das absorbâncias a 570nm em leitora de microplacas (Anthos-2010). Os experimentos foram todos realizados em triplicata e a viabilidade celular para cada concentração dos compostos foi expressa em porcentagem, comparada com a obtida para os controles não tratados (100% de viabilidade). Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular) foram calculados por meio de curvas não-lineares apropriadas e expressos como valores médios ± desvio padrão (DP).

Para fins de controle e comparação, além da atividade citotóxica dos compostos testes, foram avaliadas a atividade do medicamento antineoplásico de primeira escolha utilizado na prática clínica para o tratamento do glioblastoma multiforme: temozolomida - TMZ (temodal® - Schering-Plough). Esse quimioterápico representa a classe dos triazenos comercialmente disponíveis. Os valores de citotoxicidade, em µM, dos compostos e medicamento antineoplásico, constam na tabela 1.

2.3 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

2.3.1 Cepas bacterianas

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a dez cepas bacterianas sendo: seis padrões de referência da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e quatro isolados clínicos multirresistentes (MDR). As cepas encontravam-se armazenadas em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) contendo 15% de glicerol a - 20 °C. As ATCC Gram positivas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Micrococcus luteus* ATCC 7468. Já as Gram negativas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Os quatro isolados clínicos MDR, foram obtidos de pacientes admitidos em um hospital universitário de Santa Maria - RS, sendo: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, os quais foram identificados através de provas fenotípicas manuais e automatizadas pelo aparelho Vitek® 2 (*BioMérieux, MarcyL'Etoile*, França), no Laboratório de Microbiologia do referido hospital, e cedidas para realização dos experimentos. O perfil de resistência desses isolados é apresentado na tabela 2.

2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do composto que impede o crescimento visível do microrganismo, foi determinada pelo método padrão de microdiluição em caldo, seguindo-se o documento M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012 (CLSI) [21]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.3 Determinação da concentração bactericida mínima

A análise da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada conforme o método descrito no documento M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), 1999 [22].

2.4 Considerações Éticas

A utilização dos isolados para pesquisa clínica foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob CAAE 38850614.4.0000.5346. O cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen) é registrado sob o número AE78E18 - Universidade Federal de Santa Maria.

2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). Diferenças com $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ foram consideradas significativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os TZCs, já possuem diversificada atividade biológica como, antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química, documentada em diferentes estudos [7, 8, 10, 11, 12, 13, 24]. Assim, nosso grupo de pesquisa investigou a atividade citotóxica de moléculas triazenos *N-óxidos* e seus respectivos precursores, frente a duas linhagens celulares tumorais do glioblastoma multiforme (U87MG e T98G). Os valores de concentração inibitória 50% (IC_{50}), em μM , dos compostos, quanto incubados por 24 horas frente as linhagens tumorais do glioblastoma (U87MG e T98G) são reportados na tabela 1.

Frente à linhagem sensível U87MG, observamos significativo efeito citotóxico da molécula triazeno *N-óxido* **M1** ($IC_{50} = 1.488 \mu M$), sendo maior que os apresentados pelo quimioterápico padrão temozolimida ($IC_{50} = 4.369 \mu M$) e pelo respectivo complexo **C1** ($IC_{50} = 29.05 \mu M$). Por sua vez, observamos que a molécula livre **M2** ($IC_{50} = 4.839 \mu M$), também apresentou atividade citotóxica considerável frente a esta linhagem, sendo seu efeito similar ao TMZ ($IC_{50} = 4.369 \mu M$), e aproximadamente duas vezes maior que a apresentada pelo respectivo complexo **C2** ($IC_{50} = 7.334 \mu M$).

Quando os compostos foram ensaiados frente à linhagem resistente T98G, o complexo **C2** ($IC_{50} = 9.211 \mu M$) destacou-se com valores citotóxicos próximos ao padrão **TMZ** ($IC_{50} = 7.326 \mu M$). Essa atividade foi menor que a apresentada pela molécula livre **M2** ($IC_{50} = 11.42 \mu M$). Estudos relatam a resistência que as células T98G apresentam frente ao TMZ devido a superexpressão de genes envolvidos com a execução de vias de reparo do DNA. [25, 26]

Os TZCs possuem atividade antibacteriana relatada em diferentes estudos [10, 11, 12, 13, 14]. Para Horner et al., 2008 [11] e Ombaka et al., 2012 [13], essa pode estar atribuída à propriedade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular das bactérias, que impedem sua síntese e consequentemente, levam a morte celular. Dessa forma, avaliamos a atividade antibacteriana dos compostos *N-óxidos*, frente a diferentes cepas bacterianas padrão de referência ATCC e isolados MDR. Os valores de CIM e CBM dos compostos ensaiados são apresentados nas tabelas 3 e 4.

Entre às cepas ATCC e isolados multirresistentes ensaiados, destacamos o potencial antibacteriano apresentado pelo complexo **C3**, que foi ativo tanto frente às cepas Gram positivas, como Gram negativas ensaiadas. Destacamos sua maior atividade frente às cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 (CIM = $64 \mu g mL^{-1}$; CBM = $64 \mu g mL^{-1}$) e nos isolados MDR de *S. aureus* e *E. faecium* ambos com iguais valores de CIM e CBM (CIM = $64 \mu g mL^{-1}$ e CBM = $64 \mu g mL^{-1}$).

Evidenciamos no estudo que os compostos ensaiados, apresentaram melhor atividade antibacteriana, frente às cepas GP, corroborando com outros estudos da literatura que demonstram que os TZCs apresentam melhor atividade frente a esses microrganismos [11,12, 14]. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que bactérias GP possuem ácidos teicóicos em suas membranas que conferem carga negativa à superfície externa de suas células, auxiliando na entrada de íons positivos. Dessa forma, complexos triazenidos com íons metálicos como **C3**, podem atuar sobre essas estruturas, o que justificaria a melhor atividade antibacteriana apresentada. Além disso, bactérias GN possuem parede celular mais complexa, apresentando uma barreira à penetração de numerosas moléculas antimicrobianas o que pode explicar a maior resistência encontrada [27, 28].

4 CONCLUSÃO

Reportamos a avaliação da atividade biológica de três moléculas triazeno N-óxidos livres: **M1** (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), **M2** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), **M3**(3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido), três complexos triazenidos de Cu(II): **C1** ($\{Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido N_1\text{-óxido-}\kappa^2 N^1, O^4]cobre(II)\}$), **C2** ($\{Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N_1\text{-óxido-}\kappa^2 N^1, O^4]cobre(II)\}$); **C3**($\{Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido N_1\text{-óxido-}\kappa^2 N^1, O^4]cobre(II)\}$) e seus respectivos precursores: **P1**(4-Clorofenil-amina), **P2** (4-Bromofeni-amina) e **P3** (4-Iodofenil-amina). Os compostos ensaiados apresentaram atividade citotóxica variável frente as linhagens do glioblastoma multiforme (U87MG e T98G). Frente à linhagem U87MG, as moléculas *N*-óxidos livres apresentaram maior efeito citotóxico, destacando-se a atividade de **M1** ($IC_{50} = 1.488 \mu M$), que foi aproximadamente três vezes mais ativo que quimioterápico padrão temozolimide ($IC_{50} = 4.369 \mu M$). Na linhagem T98G, os complexos apresentaram maior atividade, dos quais destacamos o complexo **C2** ($IC_{50} = 9.211 \mu M$), cujos valores de IC_{50} foram próximos ao apresentado pelo padrão temozolomide ($IC_{50} = 7.326 \mu M$), uma vez que é relatado que essa linhagem apresenta maior resistência frente a esse quimioterápico, pela superexpressão de genes envolvidos com a execução de reparo do DNA. Os TZCs apresentaram atividade antibacteriana, especialmente frente às cepas Gram positivas. Assim, inferimos que **M1** e **C2** consituem potencial para descoberta de novos medicamentos para o tratamento do glioblastoma multiforme, sendo necessário a realização de ensaios clínicos adicionais para avaliar os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade dessas moléculas, para garantir sua segurança e eficácia.

Competing financial interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors are grate fulto Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for supporting this.

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (μM) das moléculas triazenos N-Óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), incubadas por 24h frente a linhagens celulares do glioblastoma multiforme (U87MG; T98G).

COMPOSTOS ENSAIADOS	IC ₅₀ valores (μM)	
	U87MG	T98G
M1	1.488 ± 2.74	22.47 ± 1.24
M2	4.839 ± 1.55	11.42±1.29
M3	8.402 ± 1.38	26.82 ± 1.44
C1	29.05 ± 1.14	50.26 ± 1.08
C2	7.334 ± 1.19	9.211 ± 1.71
C3	13.16±1.41	17.48±1.71
P1	12.20±1.81	32.48±1.10
P2	22.60±2.20	21.03±1.29
P3	12.43±2.68	21.34±1.68
TMZ	4.369±1.10	7.326 ± 2.65

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido); **M2** : (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido); **M3:** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno N₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}); **C3**{Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido N₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)}); **P1:** (4-Clorofenil-amina); **P2:** (4-Bromofeni-amina); **P3:** (4-Iodofenil-amina); **TMZ:** temozolamida; **SRF:** sorafenibe.

Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos MDR avaliados no estudo.

Isolados Clínicos MDR	Origen Clínica	Antibióticos Resistentes	Antibióticos Sensíveis
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Escarro	AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFO, CEFTR, CEFE, IMI, MERO, GEN, CIP	TIGE, COLI
<i>Enterococcus faecium</i>	Swab Retal	AMP/SUL, GEN, ERY, CLI, TEI, VAN	LIN, TIGE, STR
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	AMP, AMP/SUL, PIP/TAZ, CEFE, CEF/AX, CEFTA, CEFTR, ERTA, IMI, MER, GEN, CIP, COL	AMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sangue	BEN, OXA, LVX, ERY	CEFTA, GEN, CLI, LNZ, DAPT, TEI, VAN, TIG, NIT, RIF, SUT

AMI - amikacin, AMP/SUL – ampicillin/sulbactam, AMP - ampicillin, BEN - Benzylpenicillin, CEFE - cefepime, CEF/AX - Cefuroxime Axetil, CEFO – cefoxitin, CEFU - cefuroxime, CEFTA - ceftazidime, CEFTR - ceftriaxone, CIP - ciprofloxacin, CLI - clindamycin, COL - colistin, DAPT – daptomicyn, GEN - gentamycin, ERY - erythromycin, ERT - ertapenem, IMI - imipenem, LVX- levofloxacin, LNZ - linezolid, MER - meropenem, OXA - oxacillin, PEN - penicillin, PIP/TAZ - Piperaciclina/Tazobactan, RIF – Rifamicyn, SUT- sulphamethoxazole/ trimethoprim, STR- streptomycin, TEI - teicoplanin, TIG - tigecycline, VAN- vancomycin, NIT - Nitrofurantóin.

Fonte: Preparada pela autora, 2021.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana *in vitro* de compostos triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), frente á cepas bacterianas padrão ATCC e isolados clínicos Gram positivos.

Compostos Ensaaiados	CEPAS ATCC						Isolados Clínicos MDR			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>M. luteus</i> ATCC 7468		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecium</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)	
M1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	=128	>128	>128
M2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M3	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128	>128
C1	>128	>128	=128	=128	>128	>128	=128	>128	=128	>128
C2	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128	>128
C3	=128	>128	=64	=64	=128	=128	=64	=64	=128	=128
P1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128
P2	>128	>128	=128	> 128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M2:** (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M3:** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) **P1:** (4-Clorofenil-amina); **P2:** (4-Bromofeni-amina); **P3:** (4-Iodofenil-amina).

Source: Preparado pela autora, 2021.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana *in vitro* de compostos triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**) e seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**), frente á cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos Gram negativos.

Compostos Ensaaiados	CEPAS						ISOLADOS CLÍNICOS			
	ATCC						MDR			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603		<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		
M1	>128	>128	=128	=128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
M3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128
C1	>128	>128	=128	>128	>128	>128	=128	>128	>128	>128
C2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
C3	=128	=128	>128	>128	>128	>128	=128	=128	=128	=128
P1	>128	>128	=128	>128	>128	=128	>128	>128	>128	>128
P2	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
P3	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

M1: (3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M2** : (3-(4-bromofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **M3:** (3-(4-iodofenil)-1-feniltriazeno *N*₁-óxido); **C1** ({Bis[3-(4-chlorofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}), **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) e **C3** ({Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenido *N*₁-óxido-κ²*N*¹, *O*⁴]cobre(II)}) **P1:** (4-Clorofenil-amina); **P2:** (4-Bromofeni-amina); **P3:** (4-Iodofenil-amina).

Fonte: Preparado pela autora, 2021.

REFERÊNCIAS

1. Li, Y.M.; Suki, D.; Hess, K.; Sawaya, R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection?. *J Neurosurg.*, **2016**, 124(4):977–88. DOI: 10.3171/2015.5.JNS142087.
2. Thakkar, J.P.; Dolecek, T.A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q. T.; Lightner, D. D.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Villano, J. L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *C. Epidemiol Biomarkers Prev.*, **2014**, 23(10):1985–96. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.
3. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Deimling, V. A.; Figarella, B. D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.*, **2016**, 131:803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
4. Ostrom, Q.T.; Bauchet, L.; Davis, F.G.; Deltour, I.; Fisher, J.L.; Langer, C.E.; Pekmezci, M.; Schwartzbaum, J.A.; Turner, M.C.; Walsh, K.M., Wrensch, M.R.; Barnholtz-Sloan, J. S. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology.*, **2014**, 16:896–913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087.
5. Chernov, M.F.; Muragaki, Y.; Kesari, S.; McCutcheon, I.E. Intracranial Gliomas. Part I – Surgery. *Prog Neurol Surg.*, **2018**, 30:1–11. DOI: 10.1159/000464374.
6. Davis, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *C. j. of oncology nursing.*, **2016**, 20(5):2–8. DOI:10.1188/16.CJON.S1.2-8.
7. Cimborá-Zovko, T; Brozovic, A., Piantanida, I; Fritz, G.; Virag, A.; Alič, B.; Majce, V.; Kočevár, M.; Polanc, S.; Osmak, M. Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. *E. J. of M. Chemistry.*, **2011**, 46(7), 2971-2983. DOI:10.1016/j.ejmech.2011.04.024
8. Bonmassar, L.; Marchesi, F.; Pascale, E.; Franzese, O.; Margison, G.P.; Bianchi, A.; D'Atri, S.; Bernardini, S.; Lattuada, D.; Bonmassar, E.; Aquino, A. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Short Review and a Case Report. *Current Med. Chemistry.*, **2013**, 20, 2389-2401. DOI: 10.2174/0929867311320190001.
9. Brozovic, A.; Stojanovic, N.; Ambriovic-Ristov, A. Polanc, S.; Osmak, M. 3-Acetyl-bis(2-chloro-4-nitrophenyl)triazene is a potent antitumor agent that induces oxidative stress and independently activates the stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Anticancer Drugs.*, **2014**, 25(3), 289-295. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000060.
10. Tizotti, M. K.; Horner, R.; Freitas, A. G. O.; Kempfer, C.B.; Bottega, A.; Rodrigues J.N.; Cóser, V. M.; Locatelli, A.; Paraginsk, G. Giacomelli, C.; Hörner, M. X-ray characterization and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazene complex {Au(I)[RPhNNNPhR']][PPh₃] [R = (C=O)NH₂, R' = (C=O)CH₃]. *In. Chimica Ata.*, **2016**, 441, 78-85. DOI:10.1016/j.ica.2015.10.038.
11. Hörner, M.; Giglio, F.V.; Santos, A.J.R.W.A.; Westphalen, A. B.; Iglesias, B. A.; Martins, P.R.; Amaral, C.H.; Michelot, T.M.; Reetz, L.G.B.; Bertoncheli, C.M.; Paraginski, G.L.; Horner, R. Triazeno e atividade antibacteriana. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas.*, **2008**, 44 (3), 441-449.
12. Domingues, V. O.; Hörner R.; Reetz, L.G.B.; Kuhn, F.; Coser, V.M.; Rodrigues, J.N.; Bauchspieß, R.; Pereira, W.V.; Paraginski, G.; Locatelli, A.; Fank, J.O.; Giglio, V.F.; Hörner,

- M. In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *J. of the Braz. Chemical Society.*, **2010**, 21 (12), 2226-2237.
13. Ombaka, A. O.; Muguna, A. T.; Gichumbi, J. M. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. *J. of En. Chemistry Ecotoxicology.*, **2012**, 4, 133-136.
 14. Paraginski, G.L.; Berticelli, C.R.; Zambiasi, P.J.; Paraginski, V.T.K.; Hörner, M.; Santos, A.J.W.A.; Hörner, R. Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à artemia salina leach. de alguns compostos triazenos. *Quím. nova.*, **2014**, 37(7), 1138-1144. DOI:10.5935/0100-4042.20140180.
 15. Stevens, M.F.M.; Gescher, A.; Turnbull, C.P. *Biochem. Pharmacol.*, **1979**, 28, 769-776.
 16. Rachid, M. Z.; MacPhee, C.; Williams, M. et al. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5505– 5509.
 17. Martins, M. P.; Salbego, P.R.S.; Moraes, G.A. Understanding the Crystalline Formation of Triazene N-Oxides and the Role of Halogen... π Interactions. *CrystEngComm.*, **2017**, 1-35, 2017. DOI: 10.1039/C7CE02015E.
 18. Moraes, G. A. Estrutura cristalina e molecular de complexos triazenidos N-óxidos de Cu(II), Ni(II), e Au(II) e estudo dos seus derivados imobilizados em MCM-41. **Dissertação 2013**, p. 114. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Disponível em: < <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/7964>>.
 19. Plumb, J. A.; Milroy, R.; Kaye, S. B. Effects of the pH of 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromide-formazan absorption on chemo sensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research.*, **1989**, 49, 4435-4440.
 20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. immunol. Methods.*, **1983**, 65, 55-63.
 21. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, in: CLSI document M07–A9, Wayne, PA, **2012**.
 22. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26- A. Wayne, USA: NCCLS; **1999**.
 23. Ausubel, F.; Brent R.; Kingston R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. *Short Pr. in Molecular Biology*. 4. ed. John Wiley & Sons, **1999**.
 24. Seiter, K.; Katragadda, S.; Ponce, D.; Rasul, M.; Ahmed, N. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. *J. of Hemat. and Oncology.*, **2009**, 2(21), 1-6 . DOI:10.1186/1756-8722-2-21.
 25. Sousa, J. F.; Cristofaro, L. F.D.; Serafim, R. B. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, **2015**, 36 (2), 213-218.
 26. Lee, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases.*, **2016**, 3 (3), 198-210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
 27. Pankey, G.A.; Sabath, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, 38(6), 864-870.
 28. Finberg, R.W.; Moellering, R.C.; Tally, F.P. et al. The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, 39, (9), 1314-1320.

6 DISCUSSÃO

Esta seção apresenta uma visão geral e uma breve discussão dos principais resultados obtidos nos estudos de redirecionamento de medicamentos, envolvendo a sertralina e a metildopa, bem como da investigação da atividade biológica das moléculas triazenos N-óxidos.

Dessa forma, a partir dos resultados apresentados na seção 5 (**PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**), verificamos que diferentes estudos têm descrito atividades antineoplásicas e antimicrobianas de fármacos não-antibióticos (CHAN et al., 2017; HARBUT et al., 2015; ROSA et al.; 2021). Esse fato torna cada vez mais interessante a investigação de possíveis fármacos candidatos ao redirecionamento.

Assim, apresentamos no **Artigo 1**, intitulado “*Antimicrobial and antineoplastic properties of sertraline*” o medicamento sertralina, amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento dos transtornos da ansiedade e depressão. Ao pesquisarmos esse fármaco, verificamos que há diferentes estudos publicados, reportando a atividade antineoplásica da sertralina contra diferentes tipos de cânceres, como melanoma, glioblastoma, leucemia mielóide aguda, linfoma, hepatocarcinoma e câncer de cólon. Esses estudos foram organizados e apresentados na tabela 1 do respectivo artigo.

Também são reportados (tabela 1), estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstram que a sertralina também apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária contra diferentes tipos de gêneros e espécimes de microrganismos. Com base nos resultados do estudo, sugerimos que o redirecionamento da sertralina constitui uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento das doenças neoplásicas e microbianas, especialmente as ocasionadas por gêneros bacterianos. Entretanto, estudos adicionais sobre os mecanismos de ação envolvidos nestas atividades são necessários para tornar seu uso seguro para o tratamento dessas doenças.

Na continuidade de nossos estudos envolvendo o redirecionamento de medicamentos, reportamos no **Manuscrito 1** intitulado “*In vitro evaluation of the antibacterial activity of sertraline and methyldopa and their synergistic effects with sulfamethoxazole/trimethoprim as an alternative in drug repositioning*”, a análise da atividade biológica e sinérgica *in vitro* da sertralina e do medicamento metildopa, utilizados respectivamente para o tratamento da depressão e hipertensão arterial. No estudo foi investigado também, a interação desses fármacos com o antibacteriano, sulfametoxazol/trimetoprima (SUT).

No manuscrito 1, os valores de MIC e FICI (Tabela 2), demonstram que quando avaliada a atividade isolada dos fármacos frente às cepas bacterianas analisadas, sertralina foi particularmente mais ativa que metildopa, tanto frente às cepas padrão Gram-positivas como Gram-negativas, com atividade mais expressiva frente a *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 35218 e *M. luteus* ATCC 7468, todos com valores de MICs = 16 µg.mL⁻¹.

Nos isolados clínicos MDR, sertralina foi ativa frente *A. baumannii* -1 (MIC = 16 µgmL⁻¹), *E. faecium* - 4 (MIC = 32 µgmL⁻¹), *E. faecium* - 5 (MIC = 32 µgmL⁻¹) e *K. pneumoniae* - 8 (MIC = 32µgmL⁻¹). No estudo de Munoz-Bellido, Munoz-Criado e García-Rodríguez (2000), também foi relatado atividade antibacteriana da sertralina, entretanto os valores de MIC obtidos frente a *K. pneumoniae* (CIM = 128 µgmL⁻¹) e *A. baumannii* (CIM = 64µgmL⁻¹), foram superiores aos encontrados em nosso estudo. Por sua vez, na pesquisa desenvolvida por Datisdar et al. (1986), metildopa demonstrou notável atividade antibacteriana em ensaio realizado frente a 405 cepas bacterianas Gram positivas e Gram negativas, divergindo dos resultados encontrados em nosso estudo, em que o medicamento metildopa apresentou menor atividade antibacteriana.

A utilização de combinações sinérgicas de medicamentos, para tratar infecções de origem bacteriana, é uma prática adotada há tempos pela comunidade médica, uma vez que apresenta vantagens em relação à terapia individual (EJIM et al., 2011; QIN et al., 2017; ZILBERBERG et al., 2014). Fármacos não-antibióticos redirecionados podem apresentar efeito antibacteriano tanto entre si quanto em combinação com antimicrobianos, constituindo uma alternativa para superar o problema da fraca atividade dos regimes monoterapêuticos (CHAN et al., 2017; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

Quando investigado o efeito sinérgico da sertralina e metildopa com SUT, ocorreram 9 eventos de sinergismo com FICI <0,5, sendo esses, também relatadas na tabela 2. A associação da sertralina com SUT foi sinérgica nas cepas padrão ATCC de *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 8 µgmL⁻¹; FIC = 0,31) e *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,31), e nos isolados clínicos de *E. faecalis* -3 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,5), *E. faecium* - 5 (MIC = 8 µgmL⁻¹; FIC = 0,5) e *S. aureus* - 9 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,31). Já quando metildopa foi associada a SUT, ocorreu sinergismo em *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,09), *M. luteus* ATCC 7468 (MIC = 32 µgmL⁻¹; FIC = 0,18) e *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,18). Nos isolados clínicos, essa associação foi sinérgica somente em *A. baumannii* - 2 (MIC = 16 µgmL⁻¹; FIC = 0,15).

Foi observado que a combinação da sertralina com o SUT aumentou a eficácia desse fármaco em várias cepas padrão e isolados clínicos analisados. Esses resultados nos levam a

supor que a combinação de sertralina com o SUT é uma combinação vantajosa para o tratamento de algumas infecções ocasionadas por determinadas cepas bacterianas. Combinações de medicamentos são usadas como forma de combater a resistência de microrganismos multirresistentes, pois aumentam o espectro de atividade dos antimicrobianos, diminuem a dose efetiva desencadeando os efeitos sinérgicos, cuja ocorrência foi observada em nossa pesquisa.

Além desses resultados, verificou-se que a associação da sertralina com metildopa, também foi sinérgica em duas das cepas analisadas, sendo uma padrão ATCC de *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,5) e outra no isolado de *S. aureus* - 10 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,31).

O mecanismo de ação antibacteriana da sertralina e da metildopa ainda não está totalmente elucidado. Estudos relatam que compostos que possuem anéis de benzeno na estrutura, como a sertralina e a metildopa, podem apresentar atividade antimicrobiana (Mandal et al. 2010). Munoz-Bellido, Munoz-Criado e García-Rodríguez (2000) sugerem que a ação antibacteriana da sertralina pode ocorrer pela inibição das bombas de efluxo, uma vez que é consenso que este medicamento atua com este mecanismo nas células bacterianas. Nosso entendimento da maior ação antibacteriana da sertralina ocorrida pode estar associado ao fato da mesma apresentar uma combinação desses dois mecanismos de ação.

No estudo investigou-se também a CBM dos fármacos (Tabela 3), onde observamos que a sertralina sozinha foi bactericida contra a maioria das cepas bacterianas, das quais destacamos essa atividade frente ao isolado de *E. faecalis* - 3 (32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), uma vez que poucos antibióticos apresentam essa capacidade. Já em metildopa, essa atividade foi pouco observada. No entanto, quando esses medicamentos foram combinados, ocorreu intensificação da atividade bactericida da sertralina, especialmente frente à *K. pneumoniae* ATCC 700603 (MBC = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. aureus* ATCC 29213 (MBC = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e no isolado de *S. aureus* - 9 (MBC = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

O nível de tolerância dos medicamentos (Tabela 4), determinados pela razão MBC/MIC como sendo bacteriostática, se ≥ 16 , e bactericida, se ≤ 4 (DAS et al. 2016), demonstraram que sertralina foi bactericida contra a maioria das cepas padrão e contra todos os isolados clínicos testados, estando de acordo com os achados de Serafin et al., 2020.

Na avaliação da atividade de clivagem do DNA plasmidial (pUC 18), observamos um aumento na forma circular aberta em metildopa, sendo este um indicativo dessa capacidade (Figura 10). Assim, investigamos o provável mecanismo envolvido nesse processo, e constatamos que não ocorreu inibição da clivagem na presença dos sequestradores

de radicais livres utilizados, o que nos permite sugerir que o provável mecanismo de ação envolvido, fosse o hidrolítico, similar ao promovido pelas nucleases naturais. Pelo que é de nosso conhecimento esse é o primeiro relato de um fármaco anti-hipertensivo, exercendo atividade de clivagem, entretanto, fármacos que clivam o DNA, como a bleomicina, já são utilizados há anos na terapia anticancerígena (DOMINGUES et al., 2010; BRUNTON; LAZO; PARKKER et al., 2006).

O fato dos TZCs apresentarem diversificada atividade biológica, como citotóxica e antibacteriana, fez com que estes compostos fossem o foco de inúmeras pesquisas (DOMINGUES et al., 2010; HÖRNER et al., 2008; MOHAMMADI, 2014; OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI et al., 2012; PARAGINSKI et al., 2014; TIZOTTI et al., 2016).

Dessa forma, nos **Manuscrito 2 e 3**, demonstramos os resultados de nossos estudos nos quais avaliamos a atividade de moléculas trizenos N-óxidos e seus respectivos precursores, frente a diferente linhagens celulares tumorais, bem como frente a diferentes gêneros e espécimes bacterianas.

No **Manuscrito 2**, intitulado “**Avaliação *in vitro* de trizenos N-óxidos: atividade citotóxica, antibacteriana e de nuclease química frente ao melanoma e carcinoma hepatocelular**” podemos observar na tabela 2, o resultado do ensaio de citotoxicidade das moléculas TZCs. É possível observar que entre os complexos triazenidos N-óxidos de Cu(II) ensaiados, **C3** (*Bis[3-(4-iodofenil)-1-feniltriazenidoN₁-óxido-κ²N¹, O⁴]cobre(II)*) apresentou resultados citotóxicos promissores frente as linhagens tumorais, inibindo a proliferação celular de HepG2 (IC₅₀ = 2.672 μM) e B16F10 (IC₅₀= 3.950 μM) em concentrações mais baixas que as apresentadas pelos quimioterápicos padrões, sorafenibe (IC₅₀ = 7.133 μM) e temozolomida (IC₅₀= 8.402 μM) respectivamente. Este complexo **C3** também apresentou maior atividade antibacteriana, tanto frente a cepas Gram positivas quanto Gram negativas, cujos resultados são apresentados nas tabelas 3 e tabela 4 desse manuscrito.

Frente às cepas ATCC, **C3** apresentou maior efeito bacteriostático e bactericida frente à *E. faecalis* ATCC 29212 (CIM = 64 μg mL⁻¹; CBM = 64 μg mL⁻¹). Em *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 7468, e *E. coli* ATCC 25922, foi menos ativo com todas as cepas apresentando iguais valores de CIM e CBM (CIM = 128 μg mL⁻¹; CBM=128 μg mL⁻¹). Frente aos isolados MDR, a atividade de **C3** foi maior frente a *S. aureus* (CIM = 64 μg mL⁻¹ e CBM = 64 μg mL⁻¹).

No que se refere à atividade de nuclease química, os compostos ensaiados não foram aptos a clivar o DNA plasmidial nas concentrações e condições definidas de tempo, pH e temperatura (3,75, 1,875 e 0,375 mM a pH 7,4 e pH 8,0 incubados a 37 ° C e 50 ° C por 24

horas). Os resultados apresentados, permitem sugerir que o complexo **C3** pode ser promissor para a descoberta de metalofármacos eficazes para o tratamento de cânceres como melanoma e hepatocarcinoma. Porém ensaios clínicos adicionais deverão ser realizados para verificar os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade para garantir sua segurança e eficácia.

No **Manuscrito 3**, intitulado “*Avaliação da atividade biológica de moléculas triazenos N-Óxidos inéditas frente a linhagens celulares do glioblastoma multiforme: U87MG e T98G*” os resultados de citotoxicidade são reportados na tabela 1 do respectivo manuscrito.

Os compostos ensaiados apresentaram atividade citotóxica variável frente às linhagens do glioblastoma multiforme (U87MG e T98G). Frente à U87MG, as moléculas *N-óxidos* livres apresentaram maior efeito citotóxico, destacando-se **M1** ($IC_{50} = 1.488 \mu M$), que foi aproximadamente três vezes mais ativa que quimioterápico padrão temozolomide ($IC_{50} = 4.369 \mu M$). Já frente à T98G, os complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) apresentaram maior atividade, onde **C2** ($IC_{50} = 9.211 \mu M$) apresentou valores de IC_{50} próximos ao do quimioterápico padrão temozolomide ($IC_{50} = 7.326 \mu M$). Consideramos a atividade desse complexo relevante, uma vez que é relatado que a linhagem tumoral T98G apresenta maior resistência frente ao quimioterápico TMZ, pela superexpressão de genes envolvidos com a execução de reparo do DNA (SOUZA; CRISTOFARO; SERAFIN et al., 2015; LEE et al., 2016).

Nas tabelas 3 e 4, são apresentadas as atividades das moléculas TZCs frente a diferentes cepas bacterianas. É possível observar que as mesmas foram mais ativas especialmente frente às cepas Gram positivas. Nossos resultados corroboram com outros estudos da literatura, que relatam que compostos TZCs, apresentam maior atividade frente a microrganismos Gram positivos (HORNER et al., 2018; PARAKINSKY et al., 2014).

Diante dos resultados de nosso estudo, sugerimos que **M1**(3-(4-clorofenil)-1-feniltriazeno N_1 -óxido) e **C2** ({Bis[3-(4-bromofenil)-1-feniltriazenido N_1 -óxido- $\kappa^2 N^1, O^4$]cobre(II)}) consistem potencial para descoberta de novos medicamentos para o tratamento do glioblastoma multiforme. No entanto, testes *in vivo* e ensaios clínicos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos de ação envolvidos para garantir sua segurança e eficácia.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em função dos objetivos propostos neste trabalho e considerando os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- As moléculas triazenos *N*-óxidos livres (**M1**, **M2**, **M3**), complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II) (**C1**, **C2**, **C3**), seus respectivos precursores (**P1**, **P2**, **P3**) e medicamentos antineoplásicos ensaiados, apresentaram atividade citotóxica variável.
- O complexo **C3** apresentou resultados citotóxicos promissores frente às linhagens celulares tumorais, inibindo a proliferação celular de HepG2 ($IC_{50} = 2.672 \mu M$) e B16F10 ($IC_{50} = 3.950 \mu M$) em concentrações mais baixas que a apresentada pelos quimioterápicos padrões, sorafenibe ($IC_{50} = 7.133 \mu M$) e temozolomida ($IC_{50} = 8.402 \mu M$) respectivamente.
- A molécula TZCs *N*-óxido livre **M1**, foi mais citotóxica frente à linhagem do glioblastoma multiforme U87MG ($IC_{50} = 1.488 \mu M$), sendo aproximadamente três vezes mais ativa que quimioterápico padrão temozolimida ($IC_{50} = 4.369 \mu M$).
- O complexo **C2** foi mais ativo frente à linhagem do glioblastoma multiforme T98G ($IC_{50} = 9.211 \mu M$), apresentando valores de IC_{50} próximos ao apresentado pelo padrão temozolomida ($IC_{50} = 7.326 \mu M$).
- Os compostos triazenos *N*-óxidos livres, complexos triazenidos *N*-óxidos de Cu(II), e seus precursores, demonstraram moderada atividade frente às cepas bacterianas da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos MDR ensaiados, sendo esta mais ativas frente aos microrganismos Gram positivos
- O complexos **C3** apresentou atividade antibacteriana, tanto frente à cepas Gram positivas quanto Gram negativas, com atividade bacteriostática e bactericida especialmente frente à *E. faecalis* ATCC 29212 (CIM = $64 \mu g mL^{-1}$; CBM = $64 \mu g mL^{-1}$).

- Nos isolados multirresistentes (MDR), **C3** foi bacteriostático e bactericida especialmente frente a *S. aureus* (CIM = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$).
- As moléculas triazenos *N-óxidos* livres, complexos triazenidos *N-óxidos* de Cu(II) e seus respectivos precursores, nas concentrações (3,75; 1,875 e 0,375mM) e condições definidas de pHs (7,4 e 8,0), temperaturas (37 °C e 50°C), e tempos determinados de reação, não foram aptos a clivar o DNA plasmidial.
- Nos medicamentos, sertralina e metildopa, a análise da atividade de nuclease química mostrou que nas concentrações (3,75; 1,875 e 0,375mM) e condições definidas de pHs (7,4 e 8,0), temperaturas (37 °C e 50°C), e tempos determinados de reação, metildopa clivou o DNA plasmidial, por provável mecanismo hidrolítico, semelhante as nucleases naturais.
- A atividade antibacteriana dos medicamentos redirecionados, demonstrou que sertralina foi especialmente mais ativa que metildopa, tanto frente às cepas bacterianas padrão da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), bem como frente ao isolados clínicos MDR ensaiados.
- A sertralina exerceu atividade bactericida frente à maioria das cepas bacterianas padrão da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo também bactericida frente a todos isolados clínicos MDR ensaiados.
- Em relação ao Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) ocorreram 9 eventos de sinergismo com FICI <0,5.
- A combinação entre sertralina e metildopa, foi sinérgica em duas das cepas analisadas, sendo uma padrão ATCC de *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,5) e outra no isolado de *S. aureus* – 10 ((MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,31).
- A associação da sertralina com SUT foi sinérgica nas cepas padrão ATCC de *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,31) e *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,31), e nos isolados clínicos de *E. faecalis* -3 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC =

0,5), *E. faecium* - 5 (MIC = 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,5) e *S. aureus* - 9 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,31).

- A combinação da sertralina com o SUT aumentou a eficácia desse fármaco em várias cepas padrão e isolados clínicos analisados. Esses resultados nos levam a supor que a combinação de sertralina com o SUT é uma combinação vantajosa para o tratamento de algumas infecções causadas por cepas bacterianas.
- A associação de metildopa com SUT, foi sinérgica frente a *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,09), *M. luteus* ATCC 7468 (MIC = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,18) e *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,18). Nos isolados clínicos, essa associação foi sinérgica somente em *A. baumannii* - 2 (MIC = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; FIC = 0,15).
- Metildopa mostrou-se capaz de clivar o DNA plasmidial (pUC18) por intermédio de reações em diferentes, concentrações e pHs.
- O nível de tolerância demonstrou que a sertralina apresentou atividade bactericida frente a maioria das cepas padrão ATCC analisadas e frente a todos os isolados MDR ensaiados.
- Diante dos resultados apresentados pelos medicamentos redirecionados, propomos a sertralina como uma opção promissora para o tratamento de infecções ocasionadas por microrganismos MDR, pois esta demonstrou significativa atividade antibacteriana frente aos isolados ensaiados, tendo sua ação potencializada quando associada a SUT.
- Sugerimos que a atividade antibacteriana da sertralina, pode estar relacionada à sua estrutura química, pois apresenta anéis de benzeno. Com tudo, estudos complementares são necessários para entender os possíveis mecanismos de ação, toxicidade, efeitos *in vivo*, entre outros, para que o fármaco possa ser seguro para uso no tratamento de infecções, especialmente as de origem bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ACUNZO, J. et al. TCTP as therapeutic target in cancers. **Cancer Treat Rev.** v. 40, p.760-769, 2014. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.02.007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019.** Atlanta, 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>>. Acesso em: 05 jan. 2021.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2021.** Atlanta, 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html>>. Acesso em: 05 jan. 2021.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 160p., 2020.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 3, n. 8, p. 673- 683, 2004. DOI: 10.1038/nrd1468.
- ASTOLFI, A. et al. Pharmacophore-Based Repositioning of Approved Drugs as Novel *Staphylococcus aureus* Nor A Efflux Pump Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 60, p. 1598-1604, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01439.
- AYAZ, M. et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. **Journal of Biological Research.** v. 22, n.1, p. 1-8, 2015. DOI:10.1186/s40709-015-0028-1.
- BONMASSAR, L. et al. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Short Review and a Case Report. **Current Medicinal Chemistry,** v. 20, p.2389-2401, 2013. DOI : 10.2174/0929867311320190001.
- BRADSHAW, A. et al. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. **Frontiers in Surgery.** v. 3, n. 21, p. 1-15, 2016. DOI:10.3389/fsurg.2016.00021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Fígado no Adulto.** 2014. p. 163.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf>. Acesso em 10 de mai. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em 10 de jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro, 6. ed. p. 112 INCA, 2020. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-abc-6-edicao-2020.pdf>>. Acesso em 5 de jan. 2021.

BRAUN, M. M. et al. Emergence of orphan drugs in the United States: a quantitative assessment of the first 25 years. **Nat. Ver. Drug Discov.** v.9, n.7, p.519-522, 2010. DOI: 10.1038/nrd3160.

BRAY, F. et al. Cancer incidence in five continents volume XI. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**. v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

BROWN, A. S.; PATEL, C. J. A standard database for drug repositioning. **Sci. Data**, Estados Unidos, v. 4, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1038/sdata.2017.29.

BRUNTON L. L., LAZO J. S., PARKKER K. L. **Goodman & Gilman**, McGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro, 2006.

BUENO, N. G.; PEREIRA, A.V. Determinação espectrofotométrica de metildopa em ensaio de dissolução de comprimidos utilizando extrato de rabanete como fonte de peroxidase. **Quim. Nova**, v. 38, n. 8, p. 1107-1111, 2015. DOI:10.5935/0100-4042.20150091.

CASSINI, A. et al. Attributable Deaths and Disability Adjusted Life-Years Caused by Infections With Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. **Lancet Infectious Diseases**. v. 19, p.56-66, 2019. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.

CAPUCHA, V.T.A. Desenvolvimento de Pró-Fármacos de Triazenos Anti-Tumorais para Aplicação em Estratégias ADEPT: Ativação pela Carboxipeptidase G2. 2010. Nº p. 13-. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica. Lisboa, Portugal. Disponível em: < <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/2611>>. Acesso em: Jan 2021.

CARVALHO, J. F.; FONTES, F. L. Revisão dos achados sobre cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010-2013. **Arq. Ciênc. Saúde**, Rio Grande do Norte, v. 21, n. 3, p. 28-35, 2014.

CANAKCI, D. et al. Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1,3-diaryltriazene-substituted sulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. v. 34, n. 1, p. 110–116, 2018. DOI:10.1080/14756366.2018.1530994.

CHABNER, B. A. et al. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2012.

CHAGAS, A. L. et al. Brazilian society of hepatology updated recommendations for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Arq. Gastroenterol.** v. 57, p. 1-20, 2020. DOI: 10.1590/S0004-2803.202000000-20.

CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Glob. Antimicrob. Resist.** v. 10, p. 70- 74, 2017. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.03.012.

CHIEN, J. M. et al. The mechanism of sertraline-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in human OC2 oral cancer cells. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 10, p. 1635-1643, 2011. DOI: 10.1177/0960327110396523.

CIMBORA-ZOVKO, T. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2971-2983, 2011. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.04.024.

DAS B. et al. Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage- associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains, Infectious Diseases: **Research and Treatment**. v. 16, n. 9, p. 11-19, 2016. DOI:10.4137/IDRT.S31741.

DASTIDAR, S.G. et al. Antibacterial property of methyl-DOPA and development of cross-resistance in m-DOPA mutants. **Indian J Med Res**. v. 84, p. 142-147, 1986.

DI-CARLO, D. T. et al. Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis. **Neurosurg Rev**. v. 42, n. 2, p. 263-275, 2017. DOI:10.1007/s10143-017-0928-7.

DOMINGUES, V. O. et al. In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2226-2237, 2010. DOI: 10.1590/S0103-50532010001200009.

EJIM, L.; FARHA, M. A.; FALCONER, S. B. et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nat. Chem. Biol.**, Canadá, v. 7, p. 348-350, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nchembio.559>>. Acesso em: 20 mai. 2018. DOI: 10.1038/NChemBio.559.

FERREIRA, J. D., et al. Covid-19 e Câncer: Atualização de Aspectos Epidemiológicos. **Rev. Bras. Cancerol. [Internet]**. 14º de maio de 2020. Disponível em: <<https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/1013>>. Acesso em: 6 de jan. 2021.

FOLETTTO, V.S. et al. Fluoxetine and Paroxetine: Repositioning as a Therapeutic Alternative in the Treatment of Various Diseases. **Am J Ther**. v. 27, n.5, p. 547-551, 2020. DOI: 10.1097/MJT.0000000000001011.

FOLETTTO, V. S. et al. Repositioning of antidepressant drugs and synergistic effect with ciprofloxacin against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology (Online)**, v. 19, n. 37, p. 53, 2021. DOI:10.1007/s11274-021-03016-3.

- GAO, J. J. et al. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**. v. 42, n. 21, p. 12059-12070, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.12059.
- GADDIKERI, S. et al. Hepatocarcinoma exofítico em fígado não cirrótico simulando tumor mesenquimal. **Radiol Bras**. v. 1, n. 50, p. 62-68, 2014. DOI:10.2214/AJR.13.11511.
- GAMA, S. et al. Copper(II) complexes with tridentate pyrazole-based ligands: synthesis, characterization, DNA cleavage activity and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 105, n. 5, p. 637-644, 2011. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.01.013.
- GELOSA, P. et al. Repurposing of drugs approved for cardiovascular diseases: Opportunity or mirage?. **Biochem Pharmacol**. v. 177, p. 113895, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113895.
- GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Braz J Surg Clin Research**. v. 5, n.1, p. 69-72, 2014.
- GOWDA, S. K. R. et al. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.
- GRIESS, P. On new nitrogenous derivatives of the phenyl- and benzoyl-series. **Proc Royal Soc**. v. 9, p. 594–597, 1858. DOI: 10.1098/rspl.1857.0113.
- GUAN, W. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J Med**. v. 382, p. 1708-1720, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
- HADERA, M. et al. Study on Antimicrobial Potential of Selected Non-antibiotics and its Interaction with Conventional Antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biosciences**. v. 6, n. 1, p. 1-7, 2018. DOI:10.20510/ukjpb/6/i1/173522.
- HAGHIGHATPANAHI, M. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and plasmid-borne *bla*CTX-M and *bla*TEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. **J Glob Antimicrob Resist**. v. 7, p. 110-113, 2016. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.08.005.
- HANNA, T.P. et al. Cancer, COVID-19 and the precautionary principle: prioritizing treatment during a global pandemic. **Nat Rev Clin Oncol**. v. 17, p.268-270, 2020. DOI:10.1038/s41571-020-0362-6.
- HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica; 12ª ed., **McGraw**: Rio de Janeiro, 2012.
- HARBUT, M. B. et al. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. **PNAS**. v. 112, n. 14, p. 4453- 4458, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25831516>. Acesso em: 3 mai. DOI:10.1073/pnas.1504022112.
- HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance, **Lancet**, v. 387, p. 176-187, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.

HÖRNER, M. et al. Triazeno e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

HSU, J. How covid-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. **BMJ**. v.18, p. 1-2, 2020. DOI: 10.1136/bmj.m1983.

HU, M. et al. Risk of Coronavirus Disease 2019 Transmission in Train Passengers: an Epidemiological and Modeling Study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 72, n. 4, p. 604-610, 2021. DOI: 10.1093/cid/ciaa1057.

HUANG, J. K. et al. The mechanism of sertraline-induced Ca²⁺ rise in human PC3 prostate cancer cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 109, n. 2, p. 103-110, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00690.x.

JEKIMOV, S. et al. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. **Frontiers in Oncology Molecular and Cellular Oncology**, v. 4, n. 86, p. 1-18, 2014.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20, p. 136, 2016. DOI 10.1186/s13054-016-1320-7.

KARAMI K. et al. Synthesis, electronic structure and molecular docking of new organometallic palladium (II) complexes with intercalator ligands: The influence of bridged ligands on enhanced DNA/serum protein binding and in vitro antitumoral activity. **J Organ Chem**. v. 827, p. 1-14, 2017. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2016.10.001.

KAST, R. K.; HALATSC, M. E. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Glioblastoma: A Trio of Old Drugs—Captopril, Disulfiram and Nelfinavir—Are Inhibitors with Potential as Adjunctive Treatments in Glioblastoma. **ArchMedical Research**. v. 43, p. 243 – 247, 2012. DOI: 10.1016/j.arcmed.2012.04.005.

KOZOVSKA, Z.; GABRISOVA, V.; KUCEROVA, L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. **Neoplasma**. v. 63, n. 4, p.510-517, 2016. DOI:10.4149/neo_2016_403.

KUDO, M., et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. **The Lancet**, v. 39, n. 10126, p. 1163–1173, 2018. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)30207-1.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**. v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.

LE, P. et al. Repurposing human kinase inhibitors to create an antibiotic active against drug Resistant *Staphylococcus aureus*, persists and biofilms. **Nature Chemistry**. v. 12, p. 145-158, 2019. DOI:10.1038/s41557-019-0378-7.

LI, X. et al. Synthesis, crystal structure and action on Escherichia coli by microcalorimetry of copper complexes with 1,10-phenanthroline and amino acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 105, p. 23-30, 2011. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.09.001.

- LI, Y.Y.; JONES, S.J. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Medicine**. v. 4, n. 27, p. 12-14, 2012. DOI:10.1186/gm326.
- LIANG, W. et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **Lancet Oncol**. v. 21, n. 3, p. 335-337, 2020. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30096-6.
- LINDER, M. C. The relationship of cooper to DNA damage and damage prevention in humans. **Mutation Research**. v. 733, p. 83-91, 2012. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2012.03.010.
- LIU, Z.; BANAEI, N.; REN, K. Microfluidics for Combating Antimicrobial Resistance. **Trends. Biotechnol**. v. 35, n. 12, 2017. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.07.008.
- LUCIEN, M.A.B. et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 104, p.250-254, 2021. DOI:10.1016/j.ijid.2020.12.087.
- MACEDO, D. et al. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **J. Affect. Disord**. v. 208, p. 22-32, 2017. DOI:10.1016/j.jad.2016.09.012.
- MARTINS, M. P. et al. Understanding the Crystalline Formation of Triazene N-Oxides and the Role of Halogen... π Interactions. **CrystEngComm**. v. 20, n.1, p. 1-35, 2017. DOI: 10.1039/C7CE02015E.
- MENEGASSO, A. R. S. et al. In Situ Proteomic Analysis of Glioblastoma Multiforme: A Translational Approach to Improve Prognostic/Diagnostic Routines. **Braz. J. Anal. Chem**, v.7, n. 29, p. 64-83, 2020. DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.
- MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**., 2014, 114 (8), 4540–4563. DOI:10.1021/cr400460s.
- MOHAMMADI, A. Novel triazene dyes based on N-phenylpiperazine: Synthesis, antibacterial activity and solvatochromic properties. **J Mol Liq**. v.193, p. 69–73, 2014. DOI: 10.1016/j.molliq.2013.12.024.
- MORAES, G.A. Triazenos N-óxidos e seus complexos de Au(I) e Pd(II): Uma abordagem no contexto da engenharia de cristais. 2018.314 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/14696>>.
- MORIGUCHI, M.; UMEMURA, A.; ITOH, Y. Current status and future prospects of chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. **Clin J Gastroenterol**. v. 9, n. 4, p. 184-190, 2016. DOI: 10.1007/s12328-016-0670-7.
- MOTOFEI, I.G. Malignant Melanoma: Autoimmunity and Supracellular Messaging as New Therapeutic Approaches. *Curr. Treat. Options in Oncol*. v. 20, n. 45, p. 1-15, 2019. DOI 10.1007/s11864-019-0643-4.

MUNOZ-BELLIDO, J. L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUES, J. A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: Selective serotonin reuptake inhibitors. **Int J Antimicrob.** v. 14, n. 3, p. 177-180, 2000. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773485> >. Acesso em: 5 mai. 2020.

OLIVEIRA, M. C. B. Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre o DNA. Tese de doutorado. Florianópolis, 2006. 129 p. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2006. Disponível em:<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88308/224278.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

OMBAKA, A. O.; MUGUNA, A. T.; GICHUMBI, J. M. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. **J Envir Chem Ecotoxicol.** v. 4, p. 133-136, 2012. DOI: 10.5897/JECE12.006.

PAIM, R. S. P.; LORENZINI, E. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente. **Rev Cuid,** v. 5, n. 2, p. 757-764, 2014. DOI: 10.15649/cuidarte.v5i2.88.

PAPAPETROPOULOS, A.; SZABO, C. Inventing new therapies without reinventing the wheel: the power of drug repurposing. **Br. J. Pharmacol.** v. 175, v. 2, p. 165–167, 2018. DOI: 10.1111/bph.14081.

PARAGINSKI, G. L. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. de alguns compostos triazenos. **Química Nova,** v. 37, n. 7, p. 1138-1144, 2014. DOI:10.5935/0100-4042.20140180.

PEDRETTI, S. et al. Hypofractionated radiation therapy versus chemotherapy with temozolomide in patients affected by RPA class V and VI glioblastoma: a randomized phase II trial. **Journal of Neuro-Oncology,** p. 1-9, 2019. DOI: 10.1007/s11060-019-03175-2.

PELFRENE, E. et al. Antimicrobial multidrug resistance in the era of COVID-19: a forgotten plight?. **Antimicrob Resist Infect Control.** v. 10, n. 21, p. 1-6, 2021. DOI:10.1186/s13756-021-00893-z.

PUCCI, C.; MARTINELLI, C., CIOFANI, G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. **Ecancer medical science.** v. 13, n. 961, p.1-26, 2019. DOI: 10.3332/ecancer.2019.961.

PURIM, K. et al. Características do melanoma em idosos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v.47, p. 1-8, 2020. Rio de Janeiro 2020, Epub June 15, 2020. DOI: 10.1590/0100-6991e-20202441.

QIN, X. et al. A randomised, double-blind, phase 3 study comparing the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem for complicated intra-abdominal infections in hospitalised adults in Asia. **Int J Antimicrob Agents.** v. 49, n. 5, p. 579-588, 2017. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.010.

RASTELLI, G. et al. Repositioning Natural Products in Drug Discovery. **Molecules.** v. 25, p. 1154, 2020. DOI: 10.3390/molecules25051154.

RANGEL, V.A. et al. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. **Frontiers in Microbiology**. v.6, n.282, p. 1-8 , 2015
DOI:10.3389/fmicb.2015.00282.

RAO, B.; LAIN, S.; THOMPSON, A. M. p53-Based cyclotherapy: exploiting the ‘guardian of the genome’ to protect normal cells from cytotoxic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 2954-2958, 2013. DOI: 10.1038/bjc.2013.702.

ROSA, T.F. et al. Repurposing of escitalopram oxalate and clonazepam in combination with ciprofloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim for treatment of multidrug-resistant microorganisms and evaluation of the cleavage capacity of plasmid DNA. **Canadian Journal of Microbiology**. v.67, 2021. DOI: 10.1139/cjm-2020-0546 (*in press*).

ROSSATO, L. et al. In vitro synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Folia Microbiol.** n.61, p. 399-403, 2016. DOI:10.1007/s12223-016-0449-8.

SALHAB, M.; CANELO, R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. **J Cancer Res Ther.** v. 7, n. 4, p. 463-475, 2011. DOI: 10.4103/0973-1482.92023.

SAMANTA, A. et al. Evaluation of in vivo and in vitro antimicrobial activities of a selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride. **Anti-Infectiv. Agents.** v. 10, n. 2, p. 1-10, 2012. DOI: 10.2174/2211362611208020095.

SANTINI, C.; et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chem. Rev.**v.114, p.815–862, 2014. DOI: 10.1021/cr400135x.

SERAFIN, M.B.; HORNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **The Brazilian Journal of infectious diseases.** v. 22, n. 3, p. 252-256, 2018. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.05.007.

SERAFIN, M.B. et al .Synergistic effect of sertraline and disulfiram against multidrug resistant bacteria as a new alternative to drug repositioning. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences.** v. 56, p. 1-6, 2020. DOI: 10.1590/s2175-97902019000418089.

SKAGA, E.; SKAGA, I.; ZANINA, G. et al. The efficacy of a coordinated pharmacological blockade in glioblastoma stem cells with nine repurposed drugs using the CUSP9 strategy. **J. of Cancer Research and Clinical Oncology.** v. 145, p. 1495-1507, 2019. DOI: 10.1007/s00432-019-02920-4.

STRATHDEE, S.A.; DAVIES, S.C.;MARCELIN, J.R. Confronting antimicrobial resistance beyond the COVID-19 pandemic and the 2020 US election. **The Lancet.** v. 396, p. 1050-1053, 2020. DOI:10.1016/ S0140-6736(20)32004-3.

SILVA, P. P. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic chemistry.** v. 50, p. 6414-6424, 2011. DOI:10.1021/ic101791r.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Doenças e problemas do câncer de pele**. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: 28 de abr. 2020.

SOUSA; J. F.; CRISTOFARO, L. F.D.; SERAFIN, R. B. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 36, n. 2, p.213-218, 2015.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **J Biol Inorg Chem.** v. 6, n. 4, p. 337-347, 2001. DOI: 10.1007/s007750100209.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.** 2021 Feb 4. DOI: 10.3322/caac.21660. Epub ahead of print. PMID: 33538338.

TAN, A.C. et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **Cancer J Clin.** v. 70, p. 299–312, 2020. DOI: 10.3322/caac.21613.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. **Nat Rev Cancer.** v. 9, p. 206–216, 2019. DOI: 10.1038/nrc2589.

TIZOTTI, M. K. et al. X-ray characterization and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazenide complex {Au(I)[RPhNNPhR']][PPh₃] [R = (C=O)NH₂, R' = (C=O)CH₃]. **Inorganica Chimica Acta**, v. 441, p. 78-85, 2016. DOI: 10.1016/j.ica.2015.10.038.

TORTA, R.; SIRI, I.; CALDERA, P. Sertraline effectiveness and safety in depressed oncological patients. **SupCare Cancer**, v. 16, n. 1, p. 83-91, 2008. DOI: 10.1007/s00520-007-0269-0.

TZADOK, S. et al. *In vitro* novel combinations of psychotropic and anti-cancer modalities in U87 human glioblastoma cells. **Int J Oncol.** v. 37, n. 4, p.1043-1051, 2010. DOI: 10.3892/ijo_00000756.

VERBAANDERD, C. et al. Repurposing Drugs in Oncology: Next Steps. **Trends Cancer.** v. 3, n. 8, p. 543-546, 2017. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.06.007.

WHO/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: **World Health Organization**; 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js23171en/>>. Acesso em: 2 jan. de 2021.

WHO/ Monitoring global progress on antimicrobial resistance: tripartite AMR country self-assessment survey (TrACSS) 2019–2020. **Global analysis report**; 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 2 Jan. de 2021.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature.** v. 15, p. 543, 2017. DOI: 10.1038/nature.2017.21550.

XIA, D. et al. Sertraline exerts its antitumor functions through both apoptosis and autophagy pathways in acute myeloid leukemia cells. **Leuk Lymphoma**. v. 58, n. 9, p. 1-10, 2017. DOI: 10.1080/10428194.2017.1287358.

YEO, C. Y. et al. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane-gold(O-alkylthiocarbamates), $\text{Ph}_3\text{PAu}[\text{SC}(\text{OR})=\text{N}(\text{p-tolyl})]$ (R = Me, Et and iPr). **Gold Bulletin**. v. 46, p. 145-152, 2013. DOI 10.1007/s13404-013-0091-z.

YOUNIS, W.; THANGAMANI, S.; SELEEM, M.N. Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. **Current pharmaceutical design**. v. 21, n. 28, 2015, p. 4106-4111. DOI: 10.2174/1381612821666150506154434.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **Br. J. Pharmacol.** v. 175, n. 2, p. 181-191, 2018. DOI: 10.1111/bph.13895.

ZILBERBERG, M. D. et al. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. **Crit. Care**. v. 18, n. 6, p. 596- 608, 2014. Disponível DOI: 10.1186/s13054-014-0596-8.

ZOST, S. J. et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against Sars- -CoV-2. **Nature**, v.584, n.7821, p.443-9, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2548-6.