

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

**TRIAZENOS E COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE
OURO(I) E COBRE(II): ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA
E ANTIBACTERIANA *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maísa Kräulich Tizotti

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**TRIAZENOS E COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE
OURO(I) E COBRE(II): ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA E
ANTIBACTERIANA *IN VITRO***

Maísa Kräulich Tizotti

Dissertação apresentada ao curso 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 obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Kräulich Tizotti, Maísa
Triazenos e complexos triazenidos de ouro(I) e
cobre(II): atividade antileucêmica e antibacteriana in
vitro / Maísa Kräulich Tizotti.-2013.
92 p.; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Triazenos 2. Leucemia 3. Bactérias 4. Complexos
triazenidos de ouro(I) 5. Complexos triazenidos de
cobre(II) I. Hörner, Rosmari II. Título.

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


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

**TRIAZENOS E COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE OURO(I) E
COBRE(II): ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA E ANTIBACTERIANA *IN
VITRO***

elaborada por
Maísa Kräulich Tizotti

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

COMISSÃO EXAMINADORA:



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



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



Virgínia Maria Cóser, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 22 de março de 2013.

Dedico esta dissertação de mestrado a todas as pessoas que fizeram parte desta conquista, especialmente aos meus queridos pais José e Eliane, ao meu irmão Marcel e ao meu noivo Thiago por todas as palavras de apoio, incentivo, pelo amor incondicional e compreensão. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me fortalecer a cada dia e me guiar durante esta trajetória!

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner**, sou eternamente grata pela valiosa oportunidade a mim concedida e por colaborar de forma considerável com o meu amadurecimento profissional. Obrigada pela confiança, orientação, dedicação, ensinamentos, sugestões, respeito, apoio e paciência!

A minha mãe **Eliane**, meu pai **José** e meu irmão **Marcel**, que me proporcionaram todo o apoio necessário e são meus maiores exemplos. Obrigada por sempre acreditarem em mim, pelo amor incondicional, conselhos sábios, carinho, incentivo, ajuda e investimento! Sem vocês esse sonho não seria possível!

Ao meu noivo **Thiago**, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, agradeço imensamente pelo seu amor, dedicação, carinho, respeito, companheirismo, amizade e compreensão. Te amo muito!

Aos **amigos** que, mesmo longe, estão sempre presentes na minha vida transmitindo energias positivas e me apoiando em todos os momentos.

A **todas as colegas do laboratório de Bacteriologia** pelo carinho, amizade, parceria, ajuda e paciência ao longo destes anos. Agradeço em especial a **Cláudia**, minha colega e amiga de longa data que trabalhou comigo desde o princípio e também a **Liliana, Lívia, Mônica, Rosiéli e Silvana** pela amizade, carinho e ajuda. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos risos entre as bolachinhas e o cafezinho, pelos almoços no RU, pelos conselhos nos momentos difíceis, pelo incentivo, pelos conhecimentos transmitidos e principalmente por terem se tornado mais do que colegas de laboratório. Adoro vocês meninas, obrigada por tudo!

Ao setor de Hematologia-Oncologia do HUSM pela parceria e apoio.

Ao Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da UFSM, em especial ao **Prof. Dr. Manfredo Hörner**, ao **Gustavo** e ao **Augusto** pela síntese e caracterização de compostos investigados nesta dissertação, pela ajuda e sugestões.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM** e ao **Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**. Obrigada a todos os professores e funcionários!

Ao **CNPq** e a **CAPES** pelo suporte e apoio financeiro.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

RESUMO

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

TRIAZENOS E COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE OURO(I) E COBRE(II): ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA E ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

AUTORA: MAÍSA KRAÜLICH TIZOTTI
ORIENTADORA: Dr^a. ROSMARI HÖRNER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de março de 2013.

As neoplasias representam uma das principais causas de óbito no mundo e esforços para descobrir terapias antineoplásicas mais eficazes têm conduzido à síntese de inúmeras moléculas. Além disso, o aumento da resistência bacteriana tem motivado a pesquisa por novos agentes antimicrobianos. Notoriamente, os triazenos representam uma classe de compostos com ampla versatilidade farmacológica, apresentando atividades antitumorais e antibacterianas consideráveis. Da mesma forma, em razão dos promissores resultados obtidos em diversos estudos, complexos de ouro(I) e cobre(II) vêm sendo amplamente visados como potenciais agentes terapêuticos. Desse modo, neste trabalho descreveu-se a atividade antileucêmica e antibacteriana *in vitro* de 1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazeno e do complexo relacionado [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I), assim como, de 1,2,3-benzotriazina-4(3*H*)-ona e três complexos triazenidos de cobre(II) relacionados. Os efeitos antiproliferativos sobre as células da medula óssea de pacientes com neoplasias hematológicas e de pacientes não acometidos por câncer foram avaliados por meio do ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células mononucleares foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos (100 – 50 – 12,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) durante 24 h. Além disso, foi determinada a atividade antibacteriana destes compostos frente a bactérias gram positivas e gram negativas utilizando-se o método de microdiluição em caldo Mueller Hinton. Os resultados revelaram que a sensibilidade das células tumorais aos complexos foi superior a dos ligantes livres. Os melhores resultados, em termos de atividade antileucêmica *in vitro*, foram obtidos para os complexos de cobre (II), e, entre eles, o composto denominado *Bis*{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^{β}](fenantrolina- $\kappa N^I, N^{I0}$)(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^{\beta}, N^{\beta}$)}cobre(II) mostrou-se o mais eficiente. Além disso, este composto apresentou uma notável atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas. O complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) exibiu efeitos antiproliferativos expressivos, especialmente em células de paciente com síndrome mielodisplásica ($CI_{50} = 7,72 \mu\text{mol mL}^{-1}$). Em particular, a sua atividade citotóxica foi significativamente mais elevada contra células tumorais do que contra células normais. Este composto também apresentou atividade pronunciada contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *E. faecalis* ATCC 51288 ($CIM = 8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Assim, estes resultados sugerem que tanto o complexo triazenido contendo (trifenilfosfina)ouro(I) quanto o complexo triazenido de cobre(II) contendo 1,10-fenantrolina representam uma estratégia alternativa na concepção de novos metalofármacos com propriedades antitumorais e/ou antibacterianas.

Palavras-chave: Triazenos. Leucemia. Bactérias. Complexos de Coordenação. Cobre. Ouro.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

TRIAZENES AND GOLD(I) AND COPPER(II) TRIAZENIDE COMPLEXES: IN VITRO ANTILEUKEMIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

AUTHOR: MAÍSA KRAÜLICH TIZOTTI
ADVISER: Dr^a. ROSMARI HÖRNER
Presentation date: Santa Maria, March 22nd, 2013.

Cancer represents one of the leading causes of death worldwide and efforts to discover more effective anticancer therapies have led to the synthesis of a wide diversity of molecular species. Furthermore, the increase of the bacterial resistance has motivated the screening of new antimicrobial agents. Notably, triazenes are a class of compounds with great pharmacological versatility, presenting considerable antitumor and antibacterial activities. Similarly, complexes of gold(I) and copper(II) have been widely targeted as potential therapeutic agents due to the promising results found in several research studies. Thereby, in this work we describe the in vitro antileukemic and antibacterial activity of the 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and related complex [1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazenido- κN^3](triphenylphosphine- κP)gold(I) as well as of 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one and three related triazenide complexes of copper(II). The antiproliferative effects on bone marrow cells of the patients with hematological malignancies and of the patients without cancer were evaluated using the bioassay of the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT). Mononuclear cells were incubated with different concentrations of compounds (100 – 50 – 12.5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) during 24 h. Antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria by the microdilution technique in Mueller Hinton broth was also evaluated. The results revealed that the sensitivity of tumor cells to the complexes was higher than to the free ligands. The best results in terms of in vitro antileukemic activity were achieved with copper(II) complexes, and, among them, the compound named *Bis*[[1,2,3-benzotriazenide-4-one)- κN^3](phenanthroline- $\kappa N^1, N^{10}$)(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenide-4-one]- $\kappa N^2, N^3$)}copper(II) was found to be the most efficient. Moreover, this compound had a remarkable activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The complex [1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazenido- κN^3](triphenylphosphine- κP)gold(I) exhibited expressive antiproliferative effects, especially on cells from patient with myelodysplastic syndrome ($IC_{50} = 7.72 \mu\text{mol mL}^{-1}$). In particular, its cytotoxic activity was significantly higher against tumor cells than against normal cells. In addition, this compound showed pronounced activity against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *E. faecalis* ATCC 51288 ($MIC = 8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Thus, these results suggest that both triazenide complex including the [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment as the triazenide complex of copper(II) with 1,10-phenanthroline provide a strategy for the architecture of new anticancer drugs and antibacterial agents.

Keywords: Triazenes. Leukemia. Bacteria. Coordination Complexes. Copper. Gold.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1 – Taxas brutas de incidência de leucemia por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, de acordo com a Unidade da Federação22
- Figura 2 – Representação da estrutura molecular dos agentes antineoplásicos alquilantes dacarbazina (1) e temozolomida (2).....29
- Figura 3 – Ilustração esquemática do mecanismo de ação proposto para o agente antineoplásico alquilante temozolomida.....30
- Figura 4 – Representação da estrutura molecular de três compostos triazenos com potencial atividade biológica.....31
- Figura 5 – Representação da estrutura molecular da cisplatina e de dois análogos importantes utilizados na prática clínica33
- Figura 6 – Representação da estrutura molecular da auranofina.....35

MANUSCRITO

- Figure 1. View of the molecular structure with atom-labeling scheme of **HL**. Displacement ellipsoids at the 50% level and H atoms with arbitrary radii59
- Figure 2. View of the molecular structure with atom-labeling scheme of [(L)Au(PPh₃)]. Displacement ellipsoids at the 50% level and H atoms with arbitrary radii59
- Figure 3. View of the supramolecular, 2-D assembling of **HL** towards the plane (103). The infinite two-dimensional arrangement occurs along to the crystallographic directions [010] and [30-1] *via* classical hydrogen bonds (indicated as dashed lines) N2-H2...O1', N2-H3...N11'' and, N13-H13...O2'''; symmetry codes ('): -x, -y, 1-z, ("): 1.5-x, -0.5+y, 0.5-z, (""): 1.5-x, 0.5+y, 0.5-z. Atoms with arbitrary radii60
- Figure 4. View of the supramolecular, 1-D assembling of [(L)Au(PPh₃)] toward the crystallographic direction [010]. The one-dimensional arrangement occurs along to the base vector [111] *via* classical hydrogen bonds N1-HA...O1' and non-classical hydrogen bonds C15-H15...O2'' (indicated as dashed lines); symmetry codes ('): 2-x, -y, -z. Atoms with arbitrary radii60
- Figure 5. Molecular fragment sections of **1** (X = H) and **2** (X = PPh₃)61

MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS

Figura 7 – Representação da estrutura molecular do ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3*H*)-ona (1).....69

Figura 8 – Projeção da estrutura cristalina do complexo *trans*-Bis[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3]bis(piridina- κN)(aquo)cobre(II) (2)70

Figura 9 – Projeção da estrutura cristalina do complexo Bis[[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3](2,2'-biperidina- $\kappa N^2, N^2$)(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^3$)cobre(II) (3)70

Figura 10 – Projeção da estrutura cristalina do complexo Bis[[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3](fenantrolina- $\kappa N^1, N^{10}$)(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^3$)cobre(II) (4)71

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Crystal data and structure refinement for the free triazene 1 and complex 2	62
Table 2. Selected geometric parameters (Å, °) for free triazene 1 and complex 2	63
Table 3. Hydrogen-bonding geometric parameters (Å, °) the free triazene 1 and complex 2	64
Table 4. Interplanar angles (°) between molecular fragments of the free triazene 1 and complex 2	64
Table 5. Cytotoxic activity data of compound 1 , 2 and Dacarbazine® (MTT-dye reduction assay)	65
Tabela S1. Minimum inhibitory concentration values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for the triazene 1 and complex 2	66

RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

Tabela 1 – Atividade citotóxica (CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) do ligante triazeno livre e complexos triazenidos de Cu(II) relacionados contendo coligantes diimínicos	75
Tabela 2 – Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do ligante triazeno livre (1) e dos complexos triazenidos de Cu(II) relacionados contendo coligantes diimínicos (2, 3, 4) frente a cepas bacterianas ATCC e MDR	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivos	13
1.1.1. Objetivo geral	13
1.1.2. Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Câncer: considerações gerais e estimativas	15
2.2. Leucemias	18
2.2.1. Considerações gerais.....	18
2.2.2. Epidemiologia.....	21
2.2.3. Abordagens terapêuticas tradicionais.....	22
2.2.4. Leucemias agudas	23
2.2.5. Leucemia mieloide crônica.....	25
2.3. Infecções bacterianas: multirresistência aos antimicrobianos	26
2.4. Compostos triazenos (diazaminas): uso clínico e perspectivas	28
2.5. A Química Inorgânica Medicinal	32
2.5.1. Complexos de ouro	34
2.5.2. Complexos de cobre.....	36
3 MANUSCRITO	38
Graphical Abstract	39
Highlights	40
Abstract	42
Introduction	43
Results and Discussion	44
Conclusion	49
Experimental Section	49
Supplementary material	54
Acknowledgments	54
References	54
4 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS	69
4.1. Ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona e complexos triazenidos de Cu(II) ..	69
4.2. Avaliação da atividade antileucêmica <i>in vitro</i>	71
4.2.1. Células e condições de cultura.....	71
4.2.2. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT	72
4.3. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	73
4.3.1. Cepas bacterianas	73
4.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS	75
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

Considerando os dados epidemiológicos mundiais, pode-se inferir que as doenças neoplásicas estão em progressiva ascensão. O câncer é responsável por pelo menos uma, em cada oito mortes no mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012) e as estimativas têm alertado que até o ano de 2030 haverá um incremento considerável na incidência de neoplasias, as quais ocasionarão mais de 13 milhões de óbitos (FERLAY et al., 2010).

Este aumento substancial no ônus do câncer, aliado à rápida emergência de fenômenos de resistência a fármacos, sobretudo a agentes antimicrobianos (APPELBAUM, 2012), têm se tornado um evidente problema de saúde pública mundial. Diante deste quadro, é de fundamental importância um esforço multidisciplinar contínuo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mais eficazes e seletivas, de modo a superar esses desafios.

Em razão das diversas propriedades farmacológicas e tecnológicas já demonstradas pelos triazenos (TZCs), especialmente as atividades antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química, compostos desta classe têm sido extensivamente pesquisados no intuito de se descobrir moléculas potencialmente ativas (GADJEVA, 2002; BURR; MSELATI; THOMAS, 2003; HÖRNER, 2003; MARCHESI et al., 2007; CAPORASO et al., 2007; ZHOU et al., 2007; PARAGINSKI, 2007; HÖRNER et al., 2008; BROCH, 2008; SEITER et al., 2009; REETZ, 2009; DOMINGUES et al., 2010; CIBORA-ZOVKO et al., 2011, CAPUCHA et al., 2012).

Outro aspecto relevante dos TZCs é que na qualidade de ligantes exibem alta versatilidade quanto aos modos de coordenação, demonstrando uma notável capacidade para satisfazer exigências estereoquímicas de uma ampla variedade de complexos contendo metais de transição. Dessa forma, representam moléculas de grande interesse na química de coordenação e também na química medicinal, principalmente pela sua aplicabilidade biológica (BACK et al., 2012).

O triunfo do antineoplásico cisplatina e outros metalofármacos, como o trióxido de arsênio (utilizado no tratamento de leucemia), o antirreumático auranofina e o antimicrobiano sulfadiazina de prata, tem motivado a comunidade científica a investigar a atividade farmacológica de novos complexos contendo metais de

transição (GUO; SADLER, 1999; GAYNOR; GRIFFITH, 2012). Apesar do sucesso clínico e comercial da cisplatina e seus derivados, desvantagens como a resistência tumoral e significativa toxicidade têm restringido a utilização destes fármacos (KELLAND, 2007; WHEATE et al., 2010). Assim, há esforços consideráveis na busca por novas abordagens terapêuticas baseadas em metais, mais eficazes e menos tóxicas.

Subsequentemente, uma série de novos complexos metálicos têm atraído atenção dos pesquisadores devido as suas promissoras propriedades biológicas, especialmente atividade antitumoral (GAYNOR; GRIFFITH, 2012). Estudos publicados nos últimos anos enfatizam que tanto complexos de cobre (GAMA et al., 2011; RAMAKRISHNAN et al., 2011) quanto complexos de ouro (NOBILI et al., 2010; SANTINI et al., 2011) podem representar alternativas interessantes aos complexos de platina.

Assim, utilizando-se da interdisciplinariedade da química medicinal, o presente estudo caracteriza-se por uma avaliação *in vitro* da atividade biológica de dois pré-ligantes triazenos e complexos de ouro(I) e cobre(II) relacionados. São relatados os seus efeitos antiproliferativos sobre células mononucleares da medula óssea, obtidas principalmente de pacientes com diagnóstico de leucemia, bem como, de pacientes não acometidos por doenças neoplásicas (controle). Da mesma maneira, apresenta-se a atividade antibacteriana destes compostos frente a diferentes espécies patogênicas.

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antileucêmica *in vitro* de dois pré-ligantes triazenos e complexos triazenidos de ouro(I) e cobre(II) relacionados, bem como, investigar a atividade antibacteriana destes compostos frente a diversas espécies bacterianas comumente envolvidas em infecções hospitalares.

1.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar, por meio de ensaio colorimétrico, os efeitos antiproliferativos *in vitro* do pré-ligante 1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazeno e do complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) frente a células mononucleares da medula óssea, isoladas de pacientes não tratados, com diagnóstico de leucemia e de paciente não acometido por neoplasias (controle), atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).
- Verificar, por meio de ensaio colorimétrico, os efeitos antiproliferativos *in vitro* do pré-ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona e três complexos triazenidos relacionados contendo Cu(II) frente a células mononucleares da medula óssea provenientes de pacientes não tratados, com diagnóstico de leucemia e de paciente não acometido por neoplasias (controle), atendidos no HUSM.
- Determinar a atividade antibacteriana dos compostos em estudo frente a diferentes cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), bem como, frente a bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos, isoladas de pacientes atendidos no HUSM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer: considerações gerais e estimativas

Câncer, cuja definição científica se refere aos termos neoplasia ou tumor maligno, corresponde a um conjunto distinto de doenças extremamente temidas pela sociedade, uma vez que se tornaram um estigma de sofrimento e mortalidade (ALMEIDA et al., 2005). Estas doenças surgem devido a uma série de alterações genéticas, incluindo mutações no DNA e/ou mudanças epigenéticas, que se acumulam de forma gradual dentro da célula. Tais alterações levam à proliferação descontrolada (maligna) e seleção natural de clones mais agressivos, que possuem vantagem de crescimento sobre as células adjacentes, contribuindo para a expansão tumoral (CASSIDY et al., 2010; BOWER; WAXMAN, 2010).

A proliferação excessiva, não compensada por uma perda celular adequada, conduz ao acúmulo progressivo de células neoplásicas capazes de invadir e causar danos a tecidos e órgãos (metástases). Este desequilíbrio entre a taxa de morte celular e a formação de novas células está relacionado tanto às anormalidades genéticas das células cancerosas quanto à incapacidade do hospedeiro em detectar e destruir tais células. Assim, falhas no processo de apoptose (morte celular programada), estimulação inapropriada da proliferação celular devido a defeitos genéticos, bem como, anormalidades em genes supressores de tumor constituem as principais causas do crescimento descontrolado no câncer (CASCIATO; LOWITZ, 2009).

Na maioria das doenças neoplásicas, as alterações genéticas são adquiridas como eventos somáticos, porém, em um menor número de neoplasias, são encontradas alterações genéticas hereditárias. Uma vez que os mesmos genes podem estar envolvidos tanto em mutações adquiridas quanto hereditárias, a compreensão dos processos moleculares e celulares envolvidos pode ser aplicada a totalidade dos cânceres (CASSIDY et al., 2010).

Embora as causas que conduzem ao aparecimento do câncer ainda não estejam totalmente definidas, evidências científicas têm demonstrado que tanto

fatores intrínsecos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas, entre outros) quanto fatores externos/adquiridos (tabagismo, dieta, microrganismos infecciosos, alcoolismo, obesidade, exposição a produtos químicos, radiação, poluentes ambientais, entre outros) estão associados à ocorrência de tumores (ANAND et al., 2008; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

A contribuição de fatores genéticos hereditários e fatores ambientais para o risco de câncer é de 5-10% e 90-95%, respectivamente. Dessa forma, um percentual significativo de neoplasias não possui origem hereditária, sendo que elementos vinculados ao estilo de vida, tais como, hábitos alimentares, tabagismo, o consumo de álcool e infecções exercem papel considerável no processo de carcinogênese. Apesar de preocupante, este fato tem sido considerado uma oportunidade para a prevenção, visto que, mudanças significativas no estilo de vida dos indivíduos poderiam diminuir a incidência de tumores (ANAND et al., 2008).

De acordo com as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), dos 57 milhões de óbitos ocorridos no mundo em 2008, 36 milhões (63%) resultaram de doenças não transmissíveis, especialmente, doenças cardiovasculares (17 milhões), neoplasias (7,6 milhões), doenças respiratórias crônicas (4,2 milhões) e diabetes (1,3 milhões) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

É importante enfatizar que a despeito do vasto número de pesquisas e dos importantes avanços no tratamento antitumoral, observados na última década, o câncer continua sendo a principal causa de morte em muitos países, especialmente naqueles com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Além disso, nos próximos vinte anos, estas doenças estão destinadas a se tornarem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todas as regiões do mundo. Atualmente, a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento (BRAY et al., 2012).

No Brasil, acompanhando a tendência mundial, as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas enfermidades do aparelho circulatório e pelas doenças neoplásicas. Acredita-se, que esta transição epidemiológica esteja relacionada, principalmente, ao envelhecimento da população, ao intenso processo de urbanização e ações de promoção e recuperação da saúde (BRASIL, 2011).

Estimativas recentes do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o ano de 2012 e válidas também para o ano de 2013 indicam a

ocorrência de 518,5 mil novos casos de câncer no Brasil (BRASIL, 2011). Nos Estados Unidos da América (EUA), são esperados 1,6 milhões de novos casos de câncer para 2012 e aproximadamente 577 mil mortes em decorrência da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Em 2010, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, da OMS, divulgou um levantamento contendo estimativas completas de incidência e mortalidade para 27 tipos de neoplasias, em 184 países. Este levantamento demonstrou que no ano de 2008 ocorreram 12,7 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de mortes pela doença em todo o mundo. Os tumores mais comumente diagnosticados foram o câncer de pulmão, de mama e colorretal, sendo o primeiro responsável pelo maior percentual de óbitos, seguido do câncer de estômago e de fígado. Considerando as mudanças no crescimento demográfico e no envelhecimento da população, previu-se para o ano de 2030, um aumento significativo na incidência de câncer (20,3 milhões de casos novos) e também no índice de mortalidade (13,2 milhões de óbitos) (FERLAY et al., 2010).

Neste contexto, nota-se a necessidade de intervenções direcionadas capazes de amenizar estas previsões, entre elas, ações de promoção da saúde, estratégias eficientes de prevenção primária, detecção precoce, vigilância epidemiológica, assistência aos pacientes, formação de recursos humanos, bem como, desenvolvimento de protocolos de tratamento mais eficazes (BRAY et al., 2012; BRASIL, 2011). Acredita-se que mesmo cânceres de difícil tratamento possam ser controlados por meio de uma nova geração de diagnósticos e esquemas terapêuticos baseados no entendimento detalhado do mecanismo interno das células cancerosas (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

De modo geral, as modalidades terapêuticas empregadas na terapia contra o câncer incluem métodos locais (extirpação cirúrgica e radioterapia) e abordagens sistêmicas (agentes antineoplásicos), as quais são empregadas em um percentual considerável de tumores malignos. Esquemas terapêuticos que combinam cirurgia, radioterapia e quimioterapia na proporção ideal têm sido utilizados com o propósito de erradicar as células neoplásicas e elevar os índices de cura em alguns tipos de câncer (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2009).

Apesar de bem estabelecida, a terapia antineoplásica continua sendo objeto de constantes pesquisas que visam aperfeiçoar os seus resultados e descobrir agentes capazes de inibir com maior especificidade o crescimento das células

malignas. A maioria dos medicamentos antineoplásicos possui um índice terapêutico bastante estreito, especialmente os agentes citotóxicos, o que eleva o seu potencial para ocasionar efeitos adversos, geralmente graves (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007).

Nas últimas décadas, importantes progressos alcançados na compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer, bem como, informações obtidas por meio do sequenciamento do genoma humano têm servido de base para a descoberta de novos alvos moleculares e terapias direcionadas. Estes novos conhecimentos possuem potencial aplicação para o monitoramento das doenças e aumentam as oportunidades para novas terapias, incluindo abordagens personalizadas (GINSBURG; WILLARD, 2012).

2.2. Leucemias

2.2.1. Considerações gerais

A hematopoese representa um processo contínuo, complexo e dinâmico de produção das células sanguíneas, o qual envolve renovação, proliferação, diferenciação e maturação (RODAK; FRITSMA; DOING, 2007; NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

Durante a vida intrauterina este processo é observado em diferentes sítios, abrangendo as fases mesoblástica, hepática e medular. A fase mesoblástica inicia-se aproximadamente no décimo nono dia do desenvolvimento embrionário, nas ilhotas sanguíneas do saco vitelino, sendo praticamente restrita à produção de eritrócitos. Entre a quarta e quinta semanas de gestação, o fígado do feto passa a ser responsável pela produção das células hematopoéticas, iniciando-se a fase hepática. Somente a partir do quinto mês de gestação, a medula óssea se estabelece como principal sítio hematopoético, correspondendo ao único local ativo após o nascimento (RODAK; FRITSMA; DOING, 2007).

De modo geral, a hematopoese é caracterizada pela proliferação de um grupo limitado de células-tronco hematopoéticas (CTHs) pluripotentes, as quais podem

permanecer indiferenciadas (capacidade de autorregeneração) ou produzir, por meio de divisão assimétrica, um número considerável de células progenitoras, tanto da linhagem mieloide quanto linfoide. Por sua vez, as células progenitoras se diferenciam em precursores direcionados a linhagens hematopoéticas individuais, os quais dão origem a todas as células sanguíneas maduras e funcionais: linfócitos, eritrócitos, granulócitos, macrófagos e plaquetas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

A medula óssea é constituída por microambientes específicos denominados nichos. As CTHs residem em nichos compostos por células do estroma medular, células acessórias (linfócitos T e macrófagos), componentes da matriz extracelular e diversas citocinas regulatórias. A manutenção das CTHs mais primitivas em estado quiescente ocorre no nicho osteoblástico, já o nicho vascular é responsável por manter as CTHs e células progenitoras proliferando e preparadas para o processo de diferenciação. As interações que ocorrem nestes microambientes possuem um papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação hematopoéticas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

Perturbações nas vias de sinalização regulatórias podem levar à expansão descontrolada de uma ou mais populações celulares e, conseqüentemente, conduzir ao desenvolvimento de uma variedade de neoplasias hematológicas, especialmente leucemias e desordens mieloproliferativas (BENEKLI, 2003; NOOR; BELL; WARD, 2011).

O termo leucemia foi primeiramente utilizado em meados do século XIX, pelo patologista Rudolf Virchow, refletindo os altos níveis de leucócitos (glóbulos brancos) observados no sangue dos pacientes leucêmicos (PILLER, 2001). Atualmente, este termo é empregado para designar um conjunto bastante heterogêneo de neoplasias hematológicas, nas quais o elevado número de leucócitos, geralmente imaturos ou disfuncionais, interfere na função normal da medula óssea. Isto resulta na diminuição da produção de leucócitos funcionais e outras linhagens celulares, como eritrócitos e plaquetas, conduzindo à anemia, coagulação sanguínea defeituosa, supressão do sistema imunológico e infecções (NOOR; BELL; WARD, 2011).

Assim, os principais sinais e sintomas clínicos apresentados por pacientes leucêmicos incluem astenia, palidez, perda ponderal, infecções de repetição, febre e hemorragias. Nas leucemias agudas os sinais clínicos podem surgir subitamente e a maioria dos casos requer tratamento imediato. Já as leucemias crônicas progridem

lentamente, sendo muitas vezes diagnosticadas a partir de exames de rotina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

De modo geral, a leucemia é definida como proliferação descontrolada de uma ou mais células da linhagem hematopoética, resultante do acúmulo de mutações em genes, como oncogenes e/ou genes supressores de tumores, e da perda do controle sobre a proliferação e diferenciação no conjunto de células progenitoras hematopoéticas. Translocações cromossômicas, resultando em genes quiméricos que codificam proteínas com propriedades alteradas também contribuem para a transformação leucêmica (CRANS; SAKAMOTO, 2001).

Embora as causas para o desenvolvimento de leucemias ainda não estejam bem estabelecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, tais como: exposição à radiação ionizante, uso prévio de alguns antineoplásicos, certas anormalidades genéticas intrínsecas, tabagismo, exposição ocupacional ao benzeno, entre outros (BRASIL, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

O processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico pode surgir em diversas fases do desenvolvimento celular e diferentes critérios têm sido utilizados como base para a classificação das leucemias. Tradicionalmente, considerando aspectos clínicos e morfológicos/citoquímicos, como o grau de maturidade e a taxa de proliferação das células malignas, estas entidades clínico-patológicas foram divididas em quatro categorias principais: leucemia linfocítica aguda (LLA), subtipos (L1-3); leucemia mieloide aguda (LMA), subtipos (M0-7); leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC) (BENNETT et al., 1976; JAFFE et al., 2001).

Tendo em vista a necessidade de uma estratificação mais abrangente das leucemias, que relacionasse o comportamento clínico com características morfológicas, imunológicas, citogenéticas e moleculares, a OMS elaborou uma nova classificação. Avanços nas técnicas de diagnóstico e uma maior compreensão acerca das anormalidades genéticas envolvidas na fisiopatologia das neoplasias hematológicas contribuíram muito para o desenvolvimento desta classificação (JAFFE et al., 2001; PAES et al., 2002).

Publicada em 2001 (JAFFE et al., 2001), revisada e atualizada em 2008 (SWERDLOW et al., 2008), a classificação da OMS para os tumores do tecido hematopoético e linfóide foi a primeira baseada em um consenso mundial. Em decorrência de sua relevância clínica, praticidade e reprodutibilidade em diversos

cenários internacionais, esta classificação se consolidou entre os especialistas da área, sendo adotada por patologistas, médicos e pesquisadores no mundo todo (CAMPO et al., 2011).

O princípio fundamental da classificação consiste no reconhecimento das doenças por meio de um conjunto de parâmetros clínicos, morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e moleculares, variando a importância de acordo com cada entidade (CAMPO et al., 2011). A caracterização fisiopatológica das leucemias e a identificação dos defeitos moleculares envolvidos possuem um impacto direto sobre o diagnóstico, prognóstico e estratégias de tratamento. Como o tratamento inicial oferece a melhor oportunidade para a cura, o diagnóstico deve ser feito com precisão e rapidez (CRANS; SAKAMOTO, 2001).

Salienta-se que a descoberta de novas tecnologias, que permitam analisar no genoma, alterações genômicas, transcriptômicas e epigenômicas, apresenta papel fundamental para novas percepções moleculares (GINSBURG; WILLARD, 2012).

2.2.2. Epidemiologia

De acordo a OMS, no ano de 2008 foram estimados aproximadamente 351 mil casos novos de leucemia no mundo e 257 mil óbitos em decorrência da doença. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este grupo de neoplasias hematológicas representou 2,8% dos cânceres. Na faixa etária de 0-14 anos de idade as leucemias corresponderam às doenças neoplásicas mais incidentes e com maior índice de mortalidade (FERLAY et al., 2010). Apesar das leucemias representarem a principal forma de câncer em pacientes pediátricos, aproximadamente 90% dos casos são diagnosticados em adultos com mais de 20 anos de idade e em idosos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Segundo Curado et al. (2011), a leucemia constitui a principal causa de morte por câncer entre crianças, adolescentes e adultos jovens na América Latina. Apesar do índice de mortalidade ter diminuído para a faixa etária de 15 a 24 anos de idade, o declínio mostrou-se menos significativo do que o observado para pacientes pediátricos. Os autores enfatizam a necessidade de novos avanços no tratamento de pacientes leucêmicos, especialmente adolescentes e adultos jovens,

semelhantes aos obtidos por protocolos terapêuticos para a leucemia infantil (CURADO et al., 2011).

No Brasil, as estimativas para o biênio 2012-2013 indicam a ocorrência de aproximadamente 8510 casos novos de leucemia, acometendo cinco a cada cem mil homens e quatro a cada cem mil mulheres. Na região Sul, sem considerar os tumores da pele não melanoma, a leucemia representa a décima primeira neoplasia mais incidente entre os homens e a décima terceira entre as mulheres. As maiores taxas brutas de incidência de leucemia, para ambos os sexos, foram estimadas nos estados localizados no sul, sudeste e nordeste do país (Figura 1). Somente no estado do Rio Grande do Sul foram estimados 670 novos casos da doença para o biênio 2012-2013 (BRASIL, 2011).

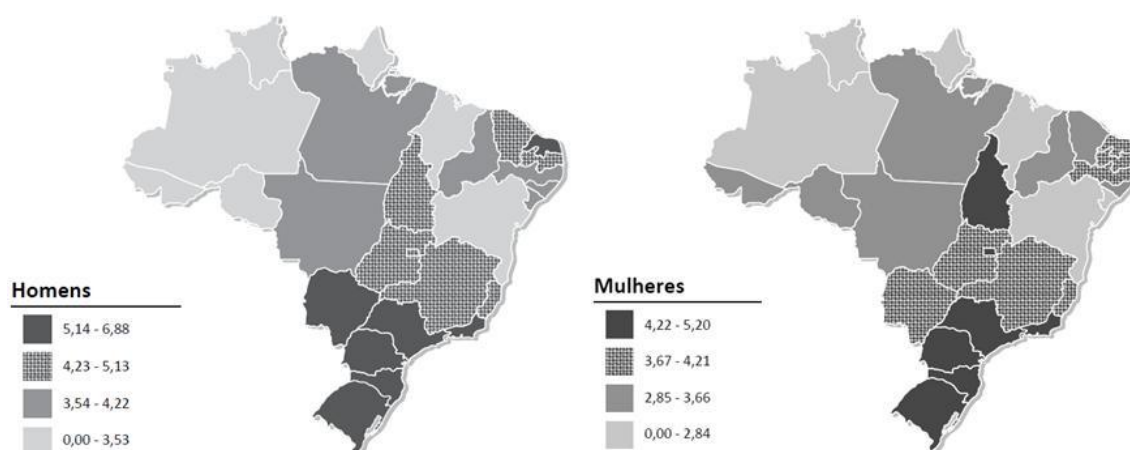


Figura 1 – Taxas brutas de incidência de leucemia por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, de acordo com a Unidade da Federação.

Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

2.2.3. Abordagens terapêuticas tradicionais

No decorrer das últimas três décadas, avanços no tratamento antileucêmico e nas técnicas diagnósticas resultaram em uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes acometidos por leucemias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

As abordagens terapêuticas tradicionais incluem principalmente regimes de quimioterapia, os quais podem ser complementados por radioterapia ou transplante de CTHs. Como o método mais eficaz para tratar leucemias é a quimioterapia, vários agentes antineoplásicos têm sido utilizados isoladamente ou em diferentes combinações (poliquimioterapia). O objetivo primário deste tratamento é a máxima eliminação das células neoplásicas, ou seja, uma remissão completa, de modo que se possa reestabelecer as funções normais da medula óssea (NOOR; BELL; WARD, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Cada tipo de leucemia requer protocolos de tratamento específicos. Geralmente, a combinação de diferentes agentes antitumorais é empregada no início do tratamento (etapa de indução da remissão), oferecendo os benefícios de remissão precoce e um menor risco de resistência tumoral. As etapas de consolidação e manutenção são destinadas a prevenir a recorrência da doença. Na maioria das vezes, a consolidação consiste em uma repetição da quimioterapia de indução ou na sua intensificação por meio de fármacos adicionais. Em contraste, o tratamento de manutenção envolve a utilização de doses menores do que aquelas administradas durante a fase de indução. Apesar de a quimioterapia tradicional ser dirigida para certas macromoléculas ou enzimas, ela não discrimina de forma eficaz as células malignas das células normais com alta taxa de proliferação, resultando em inúmeros efeitos adversos (NOOR; BELL; WARD, 2011).

Em casos de leucemia refratária ou recorrente, quimioterapia em doses elevadas pode ser utilizada, seguida de resgate medular por meio de transplante de CTHs do próprio paciente (autólogo) ou de um doador compatível (allogênico). O transplante allogênico possui limitações em decorrência da falta de disponibilidade de doadores adequados e por estar associado a uma maior mortalidade e morbidade (NOOR; BELL; WARD, 2011)

2.2.4. Leucemias agudas

As leucemias agudas (LAs) são reconhecidas por apresentarem um início abrupto e tempestuoso, seguido de uma evolução rapidamente fatal em pacientes não tratados. Constituem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas

caracterizadas pela proliferação maligna de células precursoras hematopoéticas, cuja diferenciação foi interrompida, levando ao acúmulo de blastos leucêmicos imaturos na medula óssea e conseqüentemente à falência deste órgão (JAFFE et al., 200; SWERDLOW et al., 2008).

A fisiopatologia das LAs está geralmente associada a alterações em genes envolvidos no controle da diferenciação celular, proliferação e/ou apoptose. A caracterização dessas alterações possibilitou a identificação de marcadores de prognóstico, que além de direcionarem a escolha de abordagens terapêuticas, se tornaram alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Com base em aspectos morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos, estas leucemias são subdivididas em dois grupos principais: leucemias linfocíticas agudas (LLAs) e leucemias mieloides agudas (LMAs) (JAFFE et al., 2001; SWERDLOW et al., 2008).

Entre as crianças e adolescentes as LLAs são mais comuns, sendo responsáveis por três quartos dos casos de leucemia nesta faixa etária (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). A LLA de células precursoras B (LLA-B) compreende aproximadamente 80% dos casos de LLA infantil, enquanto a LLA de células precursoras T (LLA-T) representa cerca de 20%. Embora os protocolos pediátricos para LLA apresentem resultados excelentes, crianças que tiveram recidiva da doença e pacientes adultos diagnosticados com LLA ainda possuem baixas taxas de sobrevida livre da doença. A quantidade expressiva de fatores prognósticos desfavoráveis, encontrada em adultos portadores de LLA, contribui de maneira significativa para este cenário (AKERS et al., 2011).

Ao contrário das LLAs, as LMAs são mais frequentes em pacientes adultos e apesar dos protocolos de tratamento intensivos, as taxas de sobrevida para estas doenças são menores que 50%, tanto para pacientes adultos quanto pediátricos (AKERS et al., 2011; CHEN et al., 2011). Entretanto, avanços significativos foram alcançados no tratamento da leucemia promielocítica aguda (LPA), um subtipo distinto de LMA associada à translocação $t(15;17)(q22;q12)$: *PML-RARA*, a partir da introdução de terapias direcionadas ao alvo molecular (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008).

Na maioria dos pacientes portadores de LMA que conseguem uma remissão completa, a leucemia reincide no prazo de três anos após o diagnóstico. Em geral, o prognóstico destes pacientes em recidiva é ruim e as opções de tratamento insatisfatórias (DOHNER et al., 2010).

Dessa forma, as LAs representam um grande desafio. As terapias intensas como altas doses de quimioterapia e transplantes de CTHs geralmente culminam em desfechos inadequados, levando à significativa morbidade e mortalidade (AKERS et al., 2011).

Geralmente, os agentes antineoplásicos empregados na fase de indução da remissão incluem citarabina, seguida de idarrubicina ou daunorrubicina. O tratamento pós-remissão depende da idade do paciente, das condições clínicas e, especialmente, das análises citogenéticas e moleculares (HAMERSCHLAK, 2012).

2.2.5. Leucemia mieloide crônica

A leucemia mieloide crônica (LMC) representa, provavelmente, uma das neoplasias malignas humanas mais amplamente estudadas e se destaca por ter sido a primeira a ser associada a uma anormalidade citogenética característica, o cromossomo Philadelphia (Ph). O cromossomo Ph não é restrito à LMC, sendo também encontrado em 5% das LLAs pediátricas e 25% dos adultos com LLA, estando relacionando a fatores prognósticos desfavoráveis (NOWELL; HUNGERFORD, 1960; MELO; BARNES, 2007; HAMERSCHLAK, 2012).

A alteração decorre de uma translocação recíproca e balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$. Esta translocação leva à justaposição da sequência 3' do protooncogene *ABL1* presente no cromossomo 9 e a sequência 5' do gene *BCR* presente no cromossomo 22, resultando em um gene híbrido *BCR-ABL*. O gene *BCR-ABL* codifica uma proteína com atividade tirosina quinase autônoma, que tem papel central no desenvolvimento da LMC. A proteína tirosina quinase com atividade elevada induz a medula óssea a proliferar constantemente um clone de células mieloides malignas, resultando em um número excessivo destas células (MELO; BARNES, 2007).

A LMC atípica (cromossomo Ph negativo) tem sido diagnosticada raramente e na maioria dos casos apresenta características iniciais e cursos clínicos similares à LMC típica (cromossomo Ph positivo). Entretanto, esta entidade clínico-patológica independente inclui um grupo heterogêneo de pacientes, possuindo um mau

prognóstico e em alguns casos, evoluindo de forma agressiva (KOLDEHOFF et al., 2004).

A patogênese molecular da LMC é bem compreendida, porém o mecanismo que conduz à translocação de genes é desconhecido. A exposição à radiação tem sido sugerida como uma causa provável, no entanto, seu efeito seria mínimo. A incidência da LMC é considerada relativamente baixa, representando aproximadamente 15% das leucemias em adultos. Esta neoplasia é mais comum em idosos, sendo aos 65 anos a idade média de diagnóstico. Os homens são mais afetados do que as mulheres e o sexo feminino parece ter uma vantagem de sobrevida sobre o masculino (HEHLMANN et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009).

Até o início da última década, a principal forma de tratamento para pacientes com LMC era o transplante de medula óssea, com taxas de sobrevida muito baixas. O advento do mensilato de imatinibe (Glivec®), um agente inibidor da proteína tirosina quinase, fez com que houvesse uma revolução no tratamento da LMC, sendo na grande maioria dos casos, a terapia preferencial para esta patologia. O mensilato de imatinibe atua no alvo molecular e permite controlar a progressão da doença para a fase acelerada ou blástica, estando associado a um aumento considerável da sobrevida global e a uma melhoria na qualidade de vida. Entretanto, apesar do sucesso deste agente antineoplásico, alguns pacientes não respondem de forma satisfatória ao tratamento, por intolerância ou desenvolvimento de resistência, e novos inibidores da tirosina quinase (dasatinibe, nilotinibe, entre outros) têm sido utilizados como alternativas terapêuticas nestas situações (ALMEIDA et al., 2009; HAMERSCHLAK, 2012).

2.3. Infecções bacterianas: multirresistência aos antimicrobianos

Durante a primeira metade do século XX, o desenvolvimento das sulfonamidas e penicilinas revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, levando a uma drástica redução na morbidade e mortalidade. O advento de novas classes de agentes antimicrobianos, tais como, aminoglicosídeos (1944), tetraciclina (1945), cefalosporinas (1948), macrolídeos (1949), glicopeptídeos (1956), quinolonas (1961) e carbapenêmicos (1976) durante a chamada “era de

ouro” da descoberta de fármacos antibacterianos, resultou em um uso terapêutico generalizado destes medicamentos (VON NUSSBAUM et al., 2006; SILVER, 2011).

Conseqüentemente, a quimioterapia antibacteriana tornou-se essencial na prática médica e tem contribuído significativamente para a saúde da sociedade moderna e uma maior expectativa de vida (WHITE, 2011; PIDDOCK, 2012). Apesar disso, as doenças infecciosas, tais como infecções respiratórias, doenças diarreicas, infecção pelo vírus HIV, tuberculose e malária, continuam entre as principais causas de morte segundo a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008). Somente as infecções bacterianas são responsáveis por 17 milhões de óbitos no mundo, especialmente em crianças e idosos (BUTLER; BUSS, 2006).

No início do século XXI, intensificaram-se as preocupações com a ampla emergência da resistência bacteriana aos medicamentos desenvolvidos no século XX e com o fracasso em descobrir novas classes para substituí-los. Na verdade, esta situação levou a previsões de uma catástrofe médica e um retorno à era pré-antibiótica. No entanto, a crise se estabeleceu antes do previsto e embora novos fármacos estejam em desenvolvimento, não satisfazem adequadamente as crescentes necessidades médicas. Além disso, na sua grande maioria, são derivados de classes mais antigas já utilizadas e, portanto, sujeitos aos mecanismos existentes de resistência bacteriana (APPELBAUM, 2012; CHOPRA, 2013).

A resistência crescente e inexorável de patógenos hospitalares, como o *Staphylococcus aureus*, a diversos antibióticos de primeira escolha, bem como, a rápida emergência de multirresistência em bactérias gram-negativas têm afligido a comunidade médica (BUTLER; BUSS, 2006).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados microrganismos multirresistentes, aqueles resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos de rotina. Dentre os principais patógenos multirresistentes causadores de infecções/colonizações estão: *Enterococcus* spp. resistente aos glicopeptídeos, *Staphylococcus* spp. resistente ou com sensibilidade intermediária à vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ertapenem, meropenem ou imipenem) (BRASIL, 2010).

Assim, são urgentemente necessárias novas classes de agentes antimicrobianos que possuam mecanismos de ação inovadores e que sejam eficazes frente a microrganismos multirresistentes e patógenos emergentes. Apesar

disso, muitas indústrias farmacêuticas têm optado por reduzir ou cessar completamente as pesquisas por novos antimicrobianos (BUTLER; BUSS, 2006). De acordo com Chopra (2013), se o objetivo de descobrir novas classes não for alcançado em um curto período de tempo, há a possibilidade de um retorno à era pré-antibiótica (CHOPRA, 2013).

2.4. Compostos triazenos (diazaminas): uso clínico e perspectivas

Os compostos triazenos (TZCs) são caracterizados por uma cadeia alifática composta por três átomos de nitrogênio interligados em sequência (-N=N-N-). Sua química data de 1859, quando Peter Griess sintetizou o primeiro TZC, 1,3-*bis*(fenil)-triazeno (MOORE; ROBINSON, 1986). Tais compostos têm sido estudados a mais de um século devido ao relativo interesse estrutural, propriedades reativas e biológicas de potencial aplicação em diversas áreas (KIMBALL; HERGES; HALEY, 2002; GADJEVA, 2002; HÖRNER, 2003; HANUSEK et al., 2009; DOMINGUES et al., 2010; BACK et al., 2012).

Variações na estrutura química podem conferir diferentes propriedades aos derivados TZCs, tais como: atividade antifúngica, antibacteriana, antitricomocida, herbicida, inseticida, repelente e antitumoral (NIFONTOV; BERSKAYA; SHTOKAREVA, 1994).

Classificados no grupo dos agentes antineoplásicos alquilantes monofuncionais, dacarbazina (DTIC) e temozolomida (TMZ) (Figura 2) representam compostos triazenos utilizados atualmente no tratamento clínico de diversos tipos de tumores (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007; CAPORASO et al., 2007). A fração ativa destes compostos é representada pelo grupo triazenil (-N=N-N-), responsável pelas propriedades físicas, químicas e antitumorais. O mecanismo de citotoxicidade destes TZCs envolve principalmente a metilação do DNA na posição O⁶ da guanina (MARCHESI et al., 2007). Durante a replicação do DNA, esta metilação desencadeia uma cascata de sinais intracelulares que conduzem ao bloqueio do ciclo celular e apoptose (CAPORASO et al., 2007).

A dacarbazina (5-(3,3-dimetiltriazeno)imidazol-4-carboxamida) (DTIC), um derivado imidazol-carboxamida, foi sintetizada em 1959 e após vários estudos *in*

vivo e *in vitro* foi aprovada para tratamento intravenoso de melanoma metastático, sarcoma de tecidos moles, linfomas Hodgkin e não Hodgkin, entre outros (D'INCALCI; SOUTEYRAND, 2001). Dentre todos os agentes testados em ensaios clínicos para o tratamento do melanoma metastático, DTIC mostrou-se a mais ativa (PERRY et al, 2009). Ela é considerada um pró-fármaco, pois é ativada por N-desmetilação no sistema microsomal do fígado formando 5-(3-Monometil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (MTIC), que constitui o seu metabólito ativo (MARCHESI et al, 2007).

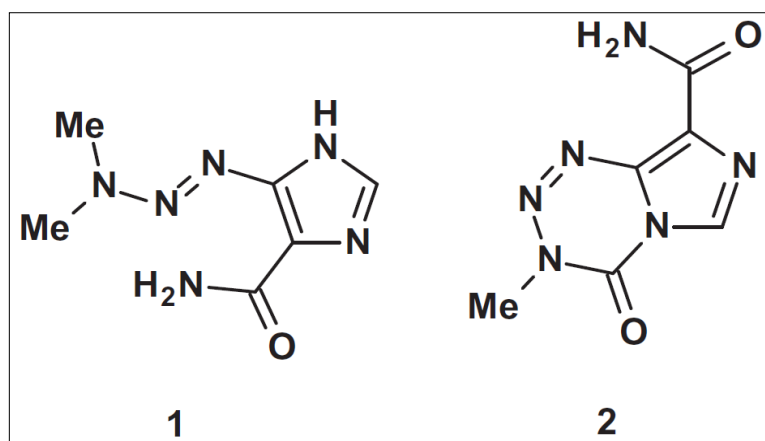


Figura 2 – Representação da estrutura molecular dos agentes antineoplásicos alquilantes dacarbazina (1) e temozolomida (2).

Fonte: Adaptado de Capucha et al. (2012).

Ao contrário da DTIC, o triazeno cíclico TMZ possui a vantagem de ser administrado por via oral, uma vez que é solúvel e estável em condições ácidas (APPEL et al., 2012). Em razão de sua facilidade em permear a barreira hematoencefálica, TMZ mostra-se potencialmente ativo contra tumores primários e metastáticos do cérebro, sendo utilizado como fármaco de primeira escolha no tratamento do glioblastoma multiforme (GBM - astrocitoma de grau IV pela OMS), melhorando relativamente as taxas de sobrevivência (STUPP et al., 2005; CAPORASO et al., 2007). Os astrocitomas são as neoplasias malignas intracranianas mais frequentes, sendo responsáveis por 60% dos casos de tumores cerebrais primários (ZHU et al., 2002). Dentre os astrocitomas, o GBM é o mais agressivo e com pior

prognóstico, ocasionando índices elevados de morbidade e mortalidade (COLMAN; ALDAPE, 2008).

De acordo com a literatura, TMZ sofre conversão espontânea no organismo para o metabólito ativo MTIC. Em condições fisiológicas, ao penetrar nas células neoplásicas, TMZ sofre hidrólise para MTIC, o qual metila as nucleobases do DNA ocasionando danos citotóxicos e, conseqüentemente, apoptose (Figura 3) (WESOLOWSKI; RAJDEV; MUKHERJI, 2010; APPEL et al., 2012).

Nos últimos anos, TMZ encontra-se em fase de ensaios clínicos para o tratamento de melanoma e outras neoplasias, incluindo metástases cerebrais, leucemias refratárias, câncer de pulmão, linfomas e tumores neuroendócrinos (CAPORASO et al., 2007; RIZZIERI et al., 2010; VON MOSS et al., 2012; TATAR et al., 2013).

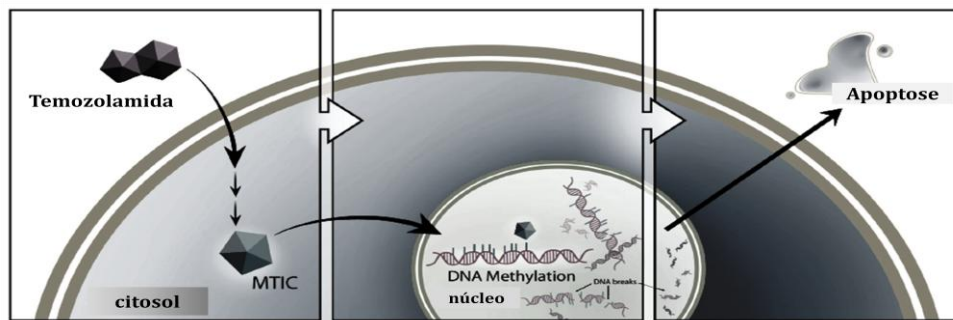


Figura 3 – Ilustração esquemática do mecanismo de ação proposto para o agente antineoplásico alquilante temozolomida.

Fonte: Adaptado de Wesolowski, Rajdev e Mukherji (2010).

Apesar da necessidade de uma maior experiência clínica quanto à utilização de TMZ no tratamento da leucemia aguda e mielodisplasia, alguns estudos têm mostrado que tanto a DTIC quanto TMZ possuem atividade antineoplásica em pacientes leucêmicos. Embora apresentem uma citotoxicidade notável na maioria das células tumorais, estes medicamentos ocasionam danos no material genético que são muitas vezes corrigidos por mecanismos de reparo do DNA. Dessa forma, fármacos capazes de inativar as diferentes vias de reparo têm sido amplamente

pesquisados como terapia de combinação (SEITER et al., 2002; SEITER et al., 2004; SEITER et al., 2009; TURRIZIANI et al., 2006; CAPORASO et al., 2007).

Tendo em vista a possível aplicabilidade dos TZCs, especialmente em leucemias agudas, Domingues et al. (2010) estudaram a atividade de alguns compostos TZCs inéditos frente a células mononucleares da medula óssea de pacientes diagnosticados com LMA. Os autores demonstraram que tanto o medicamento DTIC quanto três compostos TZCs inéditos estudados (Figura 4) apresentaram pronunciada atividade citotóxica em todas as amostras testadas. Neste mesmo estudo, foi avaliada a atividade antibacteriana dos compostos TZCs inéditos e os resultados revelaram valores promissores de concentração inibitória mínima (CIM), especialmente dos compostos 1 e 2, quando estes foram incubados com microrganismos gram-positivos.

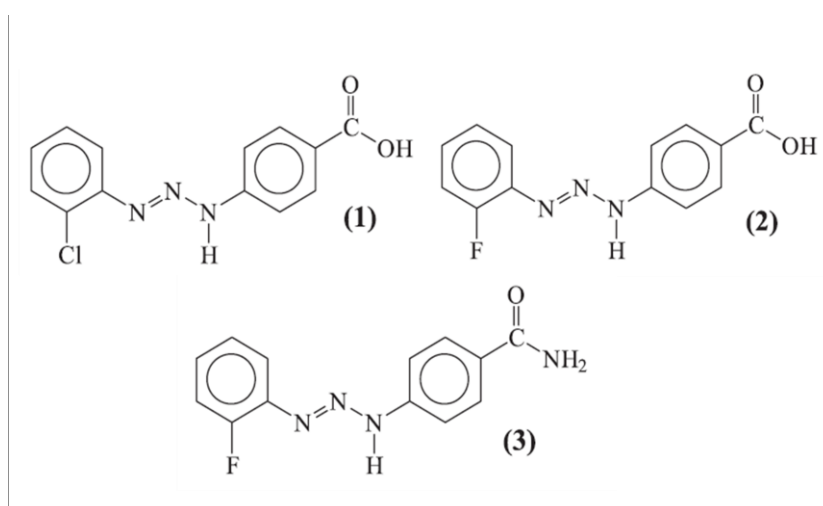


Figura 4 – Representação da estrutura molecular de três compostos triazenos com potencial atividade biológica.

Fonte: Adaptado de Domingues et al. (2010).

Recentemente, Cimborá-Zovko et al. (2011), ao investigarem a atividade biológica de 1,3-diariltriazenos, evidenciaram o potencial antitumoral de alguns derivados 4-nitro-substituídos, os quais apresentaram citotoxicidade expressiva frente a linhagens de células tumorais, sendo menos citotóxicos em células normais.

Entre os anos de 2005 e 2007, uma série de derivados potentes de 1,3,5-triazeno-2,4-diamino foram sintetizados, com uma estrutura semelhante aos antibióticos aminoglicosídeos (ZHOU et al., 2005; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2007). Estes novos compostos foram capazes de inibir a tradução bacteriana, possivelmente por interferir no sítio de codificação ribossomal. Hörner e colaboradores (2008), ao realizarem um estudo envolvendo 15 TZCs inéditos quanto à atividade antibacteriana *in vitro*, evidenciaram a efetividade de alguns compostos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Segundo os autores, o composto 1-metil-3-(p-carboxifenil)triazeno 1-óxido apresentou atividade considerável contra o patógeno *Streptococcus agalactiae*.

Além das propriedades antitumorais e antimicrobianas já descritas dos TZCs, tem sido investigada a atividade de nuclease química destes compostos, ou seja, moléculas químicas aptas a clivar o DNA superenovelado (HÖRNER, 2003; PARAGINSKI, 2007; REETZ, 2009; DOMINGUES et al., 2010; CIMBORA-ZOVKO et al., 2011). Há um grande interesse da comunidade científica por moléculas que interajam com o DNA, especialmente, aquelas capazes de clivá-lo, devido as suas promissoras aplicações clínicas e tecnológicas (COWAN, 2001; SILVA et al., 2011).

2.5. A Química Inorgânica Medicinal

A química inorgânica medicinal, apesar de relativamente jovem, corresponde a uma área de pesquisa em rápida expansão e com um enorme potencial. Numerosos íons metálicos desempenham um papel vital em sistemas biológicos e atualmente muitos sais metálicos, bem como, compostos contendo metais têm sido empregados na prática clínica para fins terapêuticos e de diagnóstico (GAYNOR; GRIFFITH, 2012).

A partir de 1978, a introdução do complexo *cis*-diaminodicloroplatina(II), conhecido comercialmente como cisplatina, na quimioterapia do câncer, representou um marco na história da química inorgânica medicinal e constituiu um importante avanço no tratamento de diversos tipos de neoplasias (GIELEN; TIEKINK, 2005). A cisplatina e seus principais análogos, carboplatina e oxaliplatina, (Figura 5) tornaram-se a base para o tratamento de tumores testiculares, ovarianos, de bexiga,

cabeça, pescoço, cólon, esôfago e pulmão (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007; WHEATE et al., 2010).

Estes antineoplásicos são também conhecidos como agentes alquilantes bifuncionais, pois são capazes de interagir com o DNA formando ligações cruzadas intrafilamentares e interfilamentares, apresentando elevada citotoxicidade (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007).

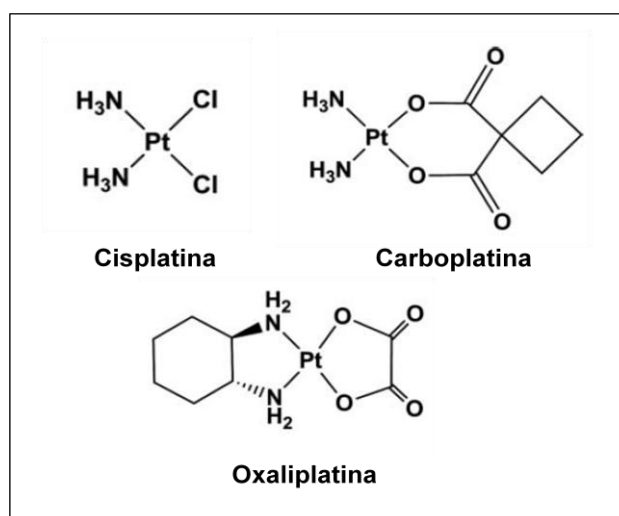


Figura 5 – Representação da estrutura molecular da cisplatina e de dois análogos importantes utilizados na prática clínica.

Fonte: Adaptado de Wheate et al. (2010).

No entanto, o uso clínico destes agentes possui alguns inconvenientes como fenômenos de resistência inerentes ou adquiridos e efeitos adversos sistêmicos graves, incluindo, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade. Assim, os pesquisadores têm continuamente buscado alternativas terapêuticas aos complexos de platina a fim de superar estas limitações. Algumas estratégias inovadoras têm sido aplicadas para a concepção de novos agentes potencialmente ativos e menos tóxicos, tais como o uso de outros metais de transição e a incorporação de diferentes ligantes orgânicos em complexos metálicos (VAN ZUTPHEN; REEDIJK, 2005; GIELEN; TIEKINK, 2005; JUNG; LIPPARD, 2007; SCHEFFLER; YOU; OTT, 2010).

Dessa forma, complexos de coordenação inorgânicos representam uma classe de compostos que têm sido amplamente visados como potenciais agentes terapêuticos (antitumorais, antimicrobianos, anti-inflamatórios, entre outros) e também de diagnóstico (GUO; SADLER, 1999; GAYNOR; GRIFFITH, 2012). Os complexos metálicos fornecem uma excelente oportunidade para a concepção racional de candidatos a fármacos. Cada metal, por exemplo, pode oferecer geometrias características, diferentes números de coordenação e estados de oxidação. A manipulação de tais variáveis, pela seleção de ligantes apropriados, pode levar ao ajuste das propriedades químicas, eletrônicas e fotofísicas. Assim, a escolha do ligante contribui muito para a diversidade estrutural e estabilidade da molécula (GAYNOR; GRIFFITH, 2012).

Uma abordagem alternativa para obtenção de novos metalofármacos com atividade antitumoral, capazes de interagir com o DNA genômico e levar à apoptose, são as chamadas "nucleases químicas" que podem clivar o DNA por diversas vias. As nucleases químicas mais eficientes contêm íons de metais de transição em seus sítios ativos. O fármaco bleomicina representa um exemplo clássico de nuclease artificial utilizada como agente antineoplásico. Sua atividade citotóxica resulta de lesão oxidativa da timidilato desoxirribose e outros nucleosídeos, ocasionando cisão do DNA (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007; GAMA et al., 2011).

2.5.1. Complexos de ouro

Os compostos de ouro têm desempenhado um papel importante na medicina desde a Antiguidade. No entanto, a base científica para a sua atividade farmacológica somente iniciou-se quando Robert Koch relatou os efeitos bacteriostáticos do composto $K[Au(CN)_2]$. Tais compostos foram amplamente utilizados ao longo dos séculos para o tratamento de diversas doenças, principalmente como agentes anti-infecciosos. Apesar da extensiva experimentação clínica realizada, compostos de ouro têm tido uma aplicação terapêutica limitada e são atualmente utilizados para o tratamento da artrite reumatoide grave, visando reduzir a inflamação e a progressão da doença (SHAW, 1999; OTT, 2009; NOBILI et al., 2010).

Dentre os medicamentos antirreumáticos contendo ouro(I), o complexo lipofílico conhecido como auranofina (Figura 6) é de fundamental importância, uma vez que pode ser administrado por via oral. Na década de 1980, evidências científicas de que a auranofina ocasionava efeitos antiproliferativos sobre células tumorais *in vitro* e algumas células leucêmicas *in vivo* conduziram a avaliação da atividade biológica de diversos complexos análogos a este fármaco (SIMON et al., 1981; MIRABELLI et al., 1986; SHAW, 1999). Apesar do espectro de atividade destes compostos ser limitado, os estudos foram determinantes para desencadear um enorme interesse na comunidade científica por novos complexos de ouro, visando a sua aplicação na terapia contra o câncer (SHAW, 1999; OTT, 2009).

Estudos científicos mais recentes têm demonstrado que diversos complexos contendo ouro no estado de oxidação +1 e +3, com características químicas e biológicas inovadoras, revelaram-se altamente citotóxicos frente a diferentes linhagens de células tumorais, incluindo linhagens resistentes à cisplatina. Dessa forma, houve um grande interesse em definir o modo específico de ação destes novos compostos citotóxicos (BINDOLI et al., 2009; CHE; SUN, 2011).

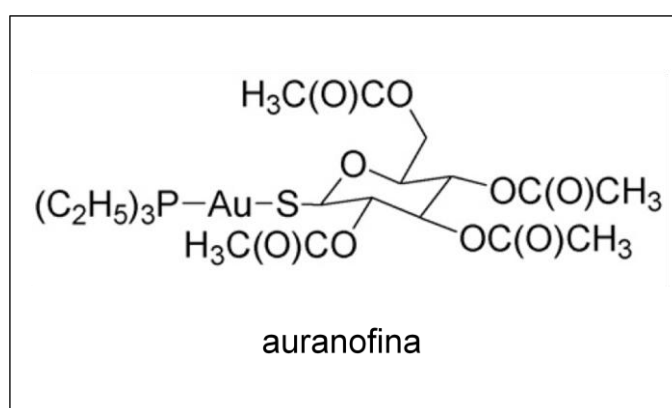


Figura 6 – Representação da estrutura molecular da auranofina.

Fonte: Adaptado de Bindoli et al. (2009).

Abordagens investigativas envolvendo mecanismos de ação evidenciaram que os complexos de ouro(I) e ouro(III) possuem uma baixa afinidade pelo DNA, ao contrário dos complexos de platina. Assim, formulou-se a hipótese de que a morte

das células tumorais por apoptose estivesse relacionada a outros fatores, ocorrendo provavelmente como consequência de uma disfunção mitocondrial grave. Por conseguinte, esta hipótese foi reforçada pelo fato de que os compostos de ouro frequentemente superavam a resistência à cisplatina (BINDOLI et al., 2009).

Estas observações levaram os investigadores a inferir que o mecanismo molecular dos complexos de ouro pode estar associado à interação com várias macromoléculas biológicas, tais como, catepsinas, tirosina fosfatases, ciclooxigenases, tioredoxina redutase, proteassomas, entre outras (RIGOBELLO et al., 2008; BINDOLI et al., 2009; LESSA et al., 2011; CHE; SUN, 2011).

Na verdade, existem inúmeros indícios científicos de que as mitocôndrias desempenham um papel notável na regulação do estado redox intracelular e do processo de apoptose. A selenoenzima tioredoxina redutase, pertencente ao sistema antioxidante, está envolvida em muitos aspectos da fisiopatologia tumoral e estudos têm evidenciado que a forte inibição desta enzima por complexos de fosfina ouro(I) conduziria a disfunções mitocondriais e conseqüentemente, ao processo de apoptose. Dessa forma, esta enzima representa um alvo atraente para a concepção de novos fármacos antitumorais (RIGOBELLO et al., 2008; RUBBIANI et al., 2010).

Além da atividade antitumoral, estudos tem investigado a atividade antimicrobiana de complexos contendo ouro(I). Em 1996, Elsome e colaboradores relataram a potencial atividade *in vitro* e *in vivo* de um complexo de ouro(I) frente a algumas bactérias gram-positivas. Mais recentemente, outros pesquisadores têm relatado as promissoras propriedades antibacterianas de diferentes complexos de ouro(I), tanto em patógenos gram-positivos quanto gram-negativos (CORBI et al., 2010; FIORI et al., 2011).

2.5.2. Complexos de cobre

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial encontrado em todos os organismos vivos, tanto na forma oxidada Cu(II) quanto reduzida Cu(I). Este biometal atua como cofator de diversas enzimas, as quais desempenham funções biológicas imprescindíveis para a sobrevivência dos seres vivos (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; LINDER, 2012). Devido ao seu importante papel

biológico, biocompatibilidade e natureza oxidativa, este metal de transição, considerado menos tóxico do que os metais não essenciais, tem despertado um grande interesse da comunidade científica (GAMA et al., 2011).

Nos últimos anos, uma série de estudos tem sido desenvolvidos, especialmente com complexos de cobre no estado de oxidação +2, visando possíveis aplicações médicas (GAMA et al., 2011). Tais pesquisas têm demonstrado que os complexos de Cu(II), sobretudo aqueles contendo ligantes diimínicos (2,2'-biperidina; 1,10-fenantrolina; 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina, entre outros), apresentam promissora atividade de nuclease química, bem como, inúmeras propriedades terapêuticas, incluindo propriedades antitumorais, antibacterianas e antifúngicas (RAMADAN, 1997; KATSAROU et al., 2008; FERNANDES et al., 2010; RAMAKRISHNAN et al., 2011; SILVA et al., 2011; GAMA et al., 2011; LI et al., 2011; QUIAO et al., 2011; DEY et al., 2012).

A maioria dos fármacos antitumorais disponíveis atualmente caracteriza-se por interagir com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético ou ocasionando lesão irreparável (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007). Dentre estes fármacos, alguns atuam por intercalação entre os pares de bases ou ligação aos sulcos menores e maiores do DNA, já outros possuem a capacidade de clivar o DNA, sendo denominados “nucleases químicas” (COWAN, 2001; ALMEIDA et al., 2005; SILVA et al., 2011).

Complexos de metais de transição capazes de induzir a clivagem do material genético, sob condições fisiológicas, são de particular interesse no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o câncer (SILVA et al., 2011; DEY et al., 2012). Neste sentido, complexos de cobre(II) são considerados uma alternativa interessante aos complexos de platina, um vez que detêm a capacidade de induzir a hidrólise ou clivagem oxidativa do DNA, sendo as nucleases químicas mais extensivamente estudadas (GAMA et al., 2011; RAMAKRISHNAN et al., 2011).

3 MANUSCRITO

Cover Letter

Editor of European Journal of medicinal Chemistry

Santa Maria, February 20 th, 2013

Dear Editor

Please find enclosed the manuscript entitled “Synthesis, X-ray structure, and in vitro biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4- acetylphenyl)triazene and related triazenide complex including the [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment” submitted for publication in European Journal of medicinal Chemistry.

Yours sincerely,

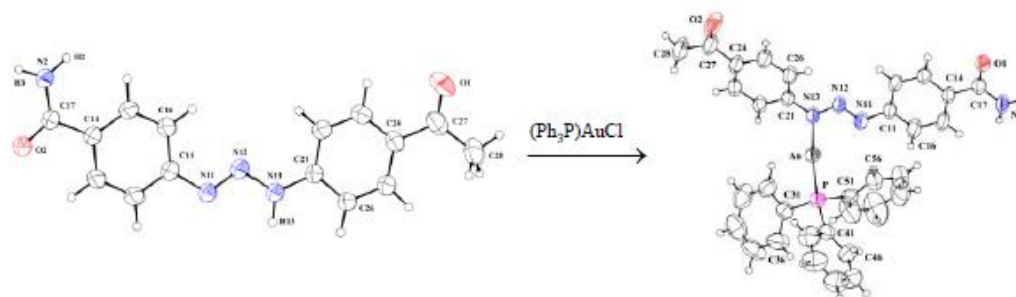
Rosmari Hörner

UFSM - Campus

97.105-970 Santa Maria, RS

Telefone 55 55 3220-8751

Graphical Abstract



Highlights

Synthesis and X-ray structure analysis of a novel triazene and related Au(I) complex.

Triazene with carbonyl substituents shows antiproliferative effect toward AML cells.

Au(I)-triazenido complex shows antitumor activity against myelodysplastic syndrome.

Au(I)-triazenido derivative shows potential for the development of antitumor agents.

Synthesis, X-ray structure, and *in vitro* biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and related triazenide complex including the [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment

*Maísa K. Tizotti^a, Augusto G. O. de Freitas^b, Rosmari Hörner^{*a}, Cláudia B. Kempfer^a, Liliana U. de Sousa^a, Jacqueline N. Rodrigues^c, Aline Locatelli^b, Gustavo L. Paraginski^b, Cristiano Giacomelli^b, and Manfredo Hörner^{*b}*

^a*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil*

^b*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil*

^c*Departamento de Hematologia-Oncologia, Hospital Universitário de Santa Maria, 97105-970 Santa Maria – RS, Brazil*

*Corresponding authors:

Rosmari Hörner - E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

T: +55 55 3220 8751; F: +55 55 3220 8018

Manfredo Hörner - E-mail: hoerner.manfredo@gmail.com

T: +55 55 3220 8645; F: +55 55 3220 8031

ABSTRACT

1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene (1) was synthesized by the coupling reaction between the diazonium salt of 4-aminobenzamide and the free 4-acetylphenylamine in acid medium at low temperature. The related complex [**1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazenido- κN^3](triphenylphosphine- κP)gold(I) (**2**) was obtained at room temperature by deprotonation of **1** in a methanol/KOH mixture in the presence of chloro(triphenylphosphine)gold(I) precursor complex. In this work, we describe the cytotoxic potential of compounds **1** and **2** on the bone marrow of patients with a clinical suspicion of leukemia without previous anticancer treatment and with a bone marrow sample from a healthy patient, for comparison. *In vitro* cytotoxicity was assayed incubating bone marrow cells with different concentrations (100 – 50 – 12.5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) of compounds **1** and **2** during 24 h using the bioassay of the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT). Antibacterial activities against 30 bacteria using the minimum inhibitory concentration (MIC), by the microdilution technique in Mueller Hinton broth were also evaluated. The compound **2** presented high level of activity against *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51288 and *S. epidermidis* ATCC 12228 (MIC = 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Furthermore, this compound has also displayed promising antiproliferative effects on different leukemic cells as well as cells from the patient diagnosed with myelodysplastic syndrome.**

Keywords: Triazene; [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment; antibacterial activity; cytotoxicity; leukemia.

1. Introduction

Despite recent advances in antineoplastic therapy, the current spectrum and efficacy of available drugs are still limited due to their multiple side effects and the development of cellular drug resistance [1,2]. Studies carried out in patients with acute leukemia have shown that most of the chemotherapy regimens used do not lead to a cure [3,4]. Therefore, efforts have focused mainly on developing novel chemotherapeutics to maximize therapeutic responses by increasing their selectivity [5].

The synthesis of molecules able to bind or react with DNA is an outstanding goal in the current development of new antitumor agents [6]. The alkylating agents exert their cytotoxic effects *via* the transfer of their alkyl groups to several cellular constituents. However, alkylations of the DNA represent the major alterations leading to cell death.

Alkylated triazenes belong to the class of alkylating agents and the major clinical use of these drugs has been conducted *via* oral administration. The triazene derivative Temozolomide[®] is one of the most commonly orally administered drugs [1]. Preclinical and clinical studies have demonstrated that this drug is active against a broad range of tumor cell lines, including L1210 and P388 leukemia [7-14]. On the other hand triazenes also present antibacterial properties [15,16].

Since 1985 in occasion of the introduction of the orally bioavailable gold compound Auranofin[®] (S-triethylphosphine-gold(I)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside), as an alternative for the arthritis treatment, a great interest in the synthesis of new bioactive gold complexes derivatives has been observed [17]. However, this promising discovery is not yet materialized in an antineoplastic drug that is approved for clinical use, despite the great efforts made toward designing new molecules with this metal [18].

Aim of the present study was the association of the triazene class of compounds with a gold(I)-phosphine derivative in the view of an evaluation of its bioactive behavior. In this context, we report the synthesis, the structure analysis by X-ray diffraction on single crystal, *in vitro* cytotoxicity, as well as the antimicrobial activity of the triazene molecule **1** and the related triazenide complex **2** including the [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry: Crystal structures

Crystal data and experimental parameters for the molecule **1** (in the following also designed as **HL**) and the complex **2** (in the following also designed as [(L)Au(PPh₃)]) are given in Table 1, and their selected bond distances and angles are listed in Table 2; Figures 1 and 2 show the molecular structure of the entities of C₁₅H₁₄N₄O₂, **HL** and [(L)Au(PPh₃)] in a thermal ellipsoid representation. Figure 3 shows the unit cell of **HL** toward plane (1 0 3) including a section of the two-dimensional self-assembly *via* secondary N-H...O and N-H...N interactions and Figure 4 shows the unit cell of [(L)Au(PPh₃)] toward the crystallographic direction [0 1 0] including a section of the one-dimensional arrangement *via* secondary N-H...O and C-H...O interactions.

Insert Table 1 here

Insert Table 2 here

Insert Figure 1 here

Insert Figure 2 here

Insert Figure 3 here

Insert Figure 4 here

2.1.1. Crystal structure of (C₁₅H₁₄N₄O₂, **HL**)

Figure 1 shows that the molecular structure of **HL** presents the characteristic *trans* stereochemistry about the N=N double bond of the N=N-N(H) diazoamino group of neutral free triazenes. Deviations observed from normal N-N and C_{aryl}-N bond lengths indicate a delocalization of the π electrons on the triazene group toward the terminal 4-amidophenyl and 4-acetylphenyl substituents of the N=N-N(H) moiety. The N11=N12 bond [1.2720(17) Å] is longer than the typical value for a double bond (1.236 Å), whereas the N12-N13 bond [1.3252(17) Å] is shorter than the typical value for a single bond (1.404 Å) [19,20]. In

addition, the C11–N11 [1.4125(18) Å] and C21–N13 [1.3873(17) Å] bonds are shorter than characteristic N–C_{aryl} single bonds (secondary amines, R₂NH, R = Csp²; 1.452 Å) [21].

The crystal structure of **HL** reveals molecules related by an axial 2₁ screw-axis parallel to the crystallographic direction [0 1 0], assembled *via* intermolecular classical hydrogen bonds N2–H3···N11'' and N13–H13···O2''', symmetry code (') 1.5-x, -0.5+y, 0.5-z; (') 1.5-x, 0.5+y, 0.5-z. These infinite chains are connected *via* intermolecular classical hydrogen bonds N2–H2···O1' along the [3 0 -1] base vector resulting in a two-dimensional network of **HL** molecules, symmetry code (') -x, -y, 1-z. Figure 3 shows a section of the 2-D assembly of **HL** molecules toward the plane (1 0 3). The geometric details that were calculated by applying the PLATON program [22] of the hydrogen bonding are listed in Table 3.

Insert Table 3 here

On the other hand, the interplanar angles between the molecular fragments of the free **HL** molecule (Table 4, Figure 5) indicates that the delocalization of the π electrons on the triazene group toward the terminal substituents of the N=N–N(H) moiety is not hindered, resulting a slight deviation of planarity of the whole molecule.

Insert Table 4 here

Insert Figure 5 here

2.1.2. Crystal structure of (C₃₃H₂₈AuN₄O₂P, [(L)Au(PPh₃)])

The crystal structure of [(L)Au(PPh₃)] shows discrete neutral asymmetric two-coordinate mononuclear Au(I) complexes. The deprotonated triazenide ion L⁻ acts *via* atom N13 as a κN^3 monodentate (two-electron donor) ligand, while one neutral triphenylphosphine molecule completes the coordination sphere of the metal ion to an almost linear arrangement (Figure 2). The Au–N13 bond distance of 2.062(6) Å is similar to the sum of the covalent radii (2.144 Å) [19,20] and corresponds to a covalent single bond.

Similar to the observed on the free HL molecule, variances observed from normal N–N and C_{aryl}–N bond lengths demonstrate a delocalization of the π electrons on the triazene group

toward the terminal aryl substituents of the deprotonated N=N-N moiety. The N11=N12 bond [1.274(8) Å] is longer than the typical value for a double-bonded N=N atoms, whereas the N12–N13 bond [1.320(8) Å] is shorter than the typical value for single-bonded N-N atoms. On the other hand the C11–N11 [1.421(8) Å] and C21–N13 [1.380(8) Å] bond distances are shorter than characteristic N–C_{aryl} single bonds as pointed out in the discussion of the structure features of HL.

The crystal structure of [(L)Au(PPh₃)] reveals centrosymmetric pairs of molecules, generated *via* classical N1–H1A···O1' intermolecular hydrogen bonding, symmetry code (') 2-x, -y, -z. In addition, these centrosymmetric pairs are within an infinite one-dimensional chain along the base vector [1 1 1] *via* intermolecular hydrogen bonds with a bifurcated geometry (D₁–H₁, D₂–H₂)···(A) (D = donor atom, A = acceptor atom), (N1–H1B, C15–H15)···O2'', symmetry code (') -1+x, -1+y, -1+z. Geometric details calculated applying the PLATON program [22] of the hydrogen bonding are found in Table 3.

In comparison with the free molecule HL, the interplanar angles between the molecular fragments of the complex [(L)Au(PPh₃)] (Table 4, Figure 5) demonstrates that the delocalization of the π electrons on the deprotonated triazenide group [N₃]⁻ toward the terminal substituents of the N-N-N triad is hindered due to the significant deviation of the planarity of the whole coordinated L⁻ ligand.

2. 2. Biological activities

2.2.1 In vitro cytotoxic studies

The widespread success of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (Cisplatin[®]) in the treatment of several types of neoplasias attracted interest in the coordination chemistry of metal-based drugs against cancer [23]. Despite its great effectiveness, the clinical drawbacks [24], and by native or acquired resistance phenomena, the cure of neoplasias with Cisplatin[®] was limited [25]. There are already studies with several novel gold(I)-phosphine complexes that display a wide spectrum of antineoplastic activity, especially in some Cisplatin-resistant cell lines [26].

These recent surveys stimulate the search for other cytotoxic metal-based agents with improved pharmacological properties. In this context complexes with transition metals, as for example, copper(I), silver(I) and gold(I) showed encouraging perspectives. In addition, the

cytotoxic activity of complexes including phosphines and diphosphines ligands were investigated and is already well established. It was found that this activity was preserved when Au(I) was coordinated by phosphine derivatives, but was generally reduced when the phenyl groups on the phosphine ligand were replaced by other substituents [2]. The mechanisms underlying the cytotoxicity of gold(I) with large lipophilic cations complexes remain unclear to be fully elucidated [27]. A major problem for the clinical use of lipophilic compound with gold metal and diphenylphosphine is that they indiscriminately interact with cancer and normal cells, resulting in high levels of toxicity in human trials [28]. Therefore, it was suggested that the hydrophilic/lipophilic balance in diphosphine ligands could provide a selective target of cancer cells over normal cells [27].

The cytotoxicity of the triazene **1** and of the related (triphenylphosphine)gold(I)-complex **2** using marrow bone cultures of four untreated patients, with a clinical suspicion of leukemia, and one control patient without leukemia was investigated through a standard bioassay, MTT. The cells of these patients were exposed to **1** and **2** during 24 h to evaluate the antiproliferative effect.

Before presenting the cytotoxic effects of the compounds, the clinical diagnoses of the patients studied are shown below: patient **1**, male, 63 years old, 15,900 leukocytes/mm³, was diagnosed with acute myeloid leukemia (AML), M2 subtype according to the French-American-British (FAB) classification, showing normal karyotype (46,XY); patient **2**, female, 35 years old, 322,800 leukocytes/mm³, was diagnosed with chronic myeloid leukemia (CML) with karyotype 46,XX,t(1;9;22)(p22;q34;q11); patient **3**, male, 9 years old, 200,000 leukocytes/mm³, was diagnosed with T-lineage acute lymphocytic leukemia (T-ALL) showing karyotype 46,XY,del(3)(q25); patient **4**, female, 54 years old, 1,200 to 135,600 leukocytes/mm³, inconclusive karyotype, was diagnosed with myelodysplastic syndrome (MDS).

The Table 5 shows the results of the cytotoxic effect of **1** and **2** on AML cells, CML cells, ALL cells, MDS cells and control patient cells of bone marrow. The percentage of cell death and the IC₅₀ values, which are calculated from the dose-survival curves, are summarized in this table.

Insert Table 5 here

Based on the concentration-response curve, the cell survival did not depend on the triazene concentration for compound **1** and **2**. The complex **2** showed better cytotoxic activity

compared to triazene molecule **1** which proved to be ineffective against most of the samples tested. The compound **1** exhibited promising antiproliferative effect only toward AML cells ($IC_{50} = 77.47 \mu\text{mol mL}^{-1}$) whereas the compound **2** demonstrated a pronounced antitumor activity, especially against bone marrow cells from patient with MDS ($IC_{50} = 7.72 \mu\text{mol mL}^{-1}$). The data also showed the small cytotoxic effect of the compound **1** and **2** on normal cells compared to Dacarbazine[®].

These results revealed that the [(triphenylphosphine)gold(I)]-fragment in compound **2** increase the antiproliferative activity of the triazenide complex derivative on bone marrow mononuclear cells analyzed in this trial. Thereby, our findings confirm that metal centers are very important for the cytotoxic activity and the classic example is Cisplatin[®], which exerts its antineoplastic activity by interacting with DNA [29]. Therefore, it is clear that a general metal-biomolecule interaction is important for the anticancer activity of a metal based-drug [30]. However, the biological properties of metal complexes are determined not only by the presence of the metal itself, but also by the number and types of ligands bound, oxidation state and the coordination geometry of the metal center in its respective complex. On the other side, many metal-based-drugs act as pro-drugs that undergo ligand substitution and redox reactions before they reach their targets [30,31].

2.2.2. Antibacterial activity

Antimicrobial resistance continues to grow quickly all around the world, mainly due to the extensive use of antibiotics. The *in vitro* results of the antibacterial activity of compound **2** were more significant against Gram-positive bacteria and showed less relevant results for Gram-negative. The MIC is the lowest concentration of the compound at which the microorganism does not present visible growth. The results demonstrate that complex **2** is more active in comparison with the free triazene **1**. Compound **2** was capable to inhibit the growth of some strains with the MIC values of $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51288 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *S. epidermidis*, *S. aureus* (1), *S. aureus* (2) and *Klebsiella oxytoca* - MDR n° 112) and $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. coli* ATCC 25922. For other microorganisms, the MIC values of compound **2** were higher than $128 \mu\text{g mL}^{-1}$. Compound **1** revealed a MIC value higher than $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ against all the bacteria assessed. It is well documented in other studies that triazenes have better activity against Gram-positive than Gram-negative bacteria [14,16]. This can be

partially explained by the fact that the outer membrane of Gram-negative species is known to present a barrier to the penetration of several antimicrobials molecules, and the appearance of mechanism of β -lactamases which are enzymes capable of hydrolyzing cephalosporins, penicillins, and carbapenems, antibiotics often used as antimicrobial therapy to treat nosocomial infections. The hydrolysis of β -lactam antimicrobial by β -lactamases is the most common mechanism of resistance for this class of antibacterial agents in clinically significant Gram-negative bacteria [32]. Although the mode of action of these alkaloids is still not detailed, some studies have shown that triazenes are able to cleave plasmid DNA [14].

3. Conclusion

This work presents one triazene derivative (compound **2**) which shows significant cytotoxic activity against three types of leukemia and MDS. Similarly to other novel gold(I)-phosphine complexes cited in the literature that display a wide spectrum of antineoplastic activity, in our case, the anticancer activity of the investigated molecules was favored by the presence of metal and by the phosphine. Both compounds **1** and **2** presented small cytotoxicity toward normal cells, with IC_{50} values significantly higher than those obtained for the anticancer drug Dacarbazine[®]. The antibacterial properties of **2** indicate that this compound presents potential activity against the most Gram-positive pathogens. The results shown herein suggest that the compound **2** could be considered potential candidate for the development of new antitumor and antibacterial bioactive agents.

4. Experimental Section

4.1. Materials and physical measurements

All the reagents and solvents used in the study were reagent grade and were used without further purification. For biological assays, water was purified by passage through a Millipore Ω water purification system with a resistance of 18 MW and sterilized by autoclave.

1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 200 instrument. IR spectra were recorded on a Bruker FT-IR Spectrometer TENSOR 27 instrument with samples embedded in KBr pellets. UV-Vis spectra were measured on a Shimadzu UV-1650-PC spectrophotometer.

4.2. Synthesis

4.2.1. Synthesis of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene (HL), **1**

Triazene **1** was synthesized based on the method of a coupling reaction between a diazonium salt and a free aromatic amine in acid pH at low temperature. 4-aminobenzamide was solubilized (1.362 g) in 30 ml of a 2:1 mixture of H₂O/HCl. Maintaining the temperature of the reaction system near to 0° C, solid sodium nitrite (0.73 g + 5% excess) was slowly added to the above solution under permanent agitation and controlled temperature. After 15 minutes stirring of the reaction mixture the free 4-acetylphenylamine dissolved in acetone was slowly added while vigorous stirring was maintained during 30 minutes. The reaction mixture was carefully neutralized with solid sodium carbonate (Na₂CO₃) resulting a yellow precipitate of the crude product of **1**. The solid, 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene, was filtered off, washed with diverse portions of cold water and dried under vacuum. Yield: 84.1% (2.3747 g) based on 4-aminobenzamide. Yellow crystals with a block shape suitable for X-ray diffraction were obtained by the recrystallization of **1** in acetone. ¹H-NMR (400 MHz, dms-*d*₆/TMS) δ = 12.81 (s, 1H, NH triazene); 8.00 (d, J=8.6Hz, 4H, ArH); 7.85 (br, 1H, NH amide), 7.57 (s, 4H, ArH), 7.26 (br, 1H, NH amide) 2.56 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, dms-*d*₆/TMS) δ = 196.16 (C=O acetone); 167.30 (C=O amide); 151.05 (Ph); 145.29 (Ph); 132.61 (Ph); 131.17 (Ph); 129.78 (Ph); 128.71 (Ph); 120.55 (Ph); 113.59 (Ph); 26.20 (CH₃) ppm. IR ν_{max}/cm⁻¹, KBr pellets: 3426, 3196 (νN-H amide), 1667 (νC=O), 1599 (νC=C aromatic), 1510 (δN-H), 1430 (νN=N), 1392 (νC-N), 1265 (νC(Ph)-N) 835 (νC-N). UV/Vis λ_{max}/nm (EtOH) 220 π-π* (C=C), 375 n-π* (N=N); ε₃₇₅ (mol⁻¹.L.cm⁻¹) 3.05 x 10⁴. More information about the NMR spectroscopy data is summarized in the supplementary material.

4.2.2. Synthesis of [1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazenido-κN³](triphenylphosphine-κP)gold(I)[(L)Au(PPh₃)], **2**

The free triazene **1** (0.1 g) was previously dissolved in 10 mL of an ethanol/pyridine 1:1 mixture. In sequence the reaction media was treated with a mixture of 10 mL of methanol including 2 pellets of KOH. To the deep-red resulting solution, 0.17 g of solid chloro(triphenylphosphine)gold(I), (Ph₃P)AuCl was added. The reaction mixture was stirred

continuously during 12h. In sequence, the solvent mixture was removed and the remaining yellow solid dried under vacuum. Yield: 92% (0.24 g) based on 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene. Yellow crystals with block shape, suitable for X-ray diffraction were obtained by recrystallization of **2** in an ethanol/pyridine 1:1 mixture. ^1H NMR spectrum of **1** (DMSO- d_6 /TMS) δ = 12.81 (s, 1H, NH triazene); 8.00 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 4H, ArH); 7.85 (br, 1H, NH amide), 7.57 (br, 4H, ArH), 7.26 (br, 1H, NH amide) 2.56 (s, 3H, CH₃) ppm. ^{13}C NMR spectrum of **1** in DMSO- d_6 /TMS. ^{13}C NMR (DMSO- d_6 /TMS) δ = 196.16 (C=O ketone); 167.30 (C=O amide); 151.05 (Ph); 145.29 (Ph); 132.61 (Ph); 131.17 (Ph); 129.78 (Ph); 128.71 (Ph); 120.55 (Ph); 113.59 (Ph); 26.20 (CH₃) ppm. More information about the NMR spectroscopy data is summarized in the supplementary material.

4.3. X-ray Crystal structure analysis

The X-ray diffraction experiments for the free triazene **1** and the related complex **2** were carried out using a single crystal fixed on a glass fiber for data collection. Data were collected at 20°C with a Bruker APEX II CCD area-detector diffractometer and graphite monochromatized Mo-K α radiation using the COSMO program [33]. No crystal decay was observed. Crystal system and space group were unequivocally determined from the data sets and reciprocal space images. Cell refinement, data reduction, and absorption correction were performed using the *SAINTE* and *SADABS* programs, respectively [33]. The structure of both compounds were solved by direct methods and refined on F^2 with anisotropic temperature parameters for all non-hydrogen atoms [34,35]. The positional parameters of the H atoms of the free triazene **1** were obtained from a difference map and refined with an isotropic displacement parameter [35]. For the complex **2**, the positional parameters of the H atoms bonded to C and N atoms were obtained geometrically, with the C–H and N–H distances fixed (0.96 Å for Csp³ methyl; 0.93 Å for Csp² phenyl; 0.86 Å for Csp² N_{amide}), and refined as riding on their respective C and N atoms, with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{Csp}^3 \text{ methyl})$, $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{Csp}^2 \text{ phenyl})$, and with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{Csp}^2 \text{ N}_{\text{amide}})$, respectively [35]. Graphical representations were drawn with the *DIAMOND* software [36].

4.4. Biological activities

4.4.1. Cell cultures

Bone marrow samples, excess of clinical trials (cytogenetic studies), were obtained at the Hematology-Oncology Laboratory of the University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil. These samples were collected from bone marrow aspirate of 4 untreated patients, with clinical suspicion of leukemia and 1 control patient without leukemia. The mononuclear cells were isolated by Ficoll density-gradient centrifugation (Ficoll-Paque PLUS – GE Healthcare). After isolation, the cells were grown at 37°C, 5% CO₂, in RPMI-1640 media (Sigma-Aldrich), supplemented with 20% fetal bovine serum (Cultilab, Brazil), penicillin G 100 U mL⁻¹, streptomycin sulfate 100 µg mL⁻¹ (Gibco, Invitrogen, Italy).

4.4.2. Cytotoxicity assay

The growth inhibitory effect toward bone marrow mononuclear cells was evaluated by means of an MTT assay [37]. Briefly, Trypan blue (1% in distilled water) and cell suspensions were mixed in 1:6 quantities. The quantity of viable cells was estimated by hemocytometry. Exponentially growing cells were added to each well of a flat-bottom in 96-well microplates (90 µL/well) at a density of 3 x 10⁶ cells mL⁻¹. The assayed compounds (**1** – **2**) were dissolved in 50% ethanol and diluted to the required concentration (12.5, 50 and 100 µmol mL⁻¹). Then, the cells were exposed to different concentrations of compounds for 24 h at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere. Control cultures received cells in the absence of assayed compounds. After 24 h of incubation, each well was treated with 10 µL of a 5 mg mL⁻¹ MTT saline solution, and the plates were incubated for 4 h at 37°C. The formazan product was dissolved by the addition of 100 µL of dimethyl sulfoxide. The inhibition of cell growth was detected by measuring the absorbance at 570 nm using a Fisher Bio-Tek BT2000 MicroKinetics reader. The percentage of cell survival was defined as the relative absorbance of treated cells vs. respective controls. The IC₅₀ value, defined as the drug concentration that reduced the mean absorbance at 570 nm to 50% of those in the untreated control wells, was calculated for each compound. The experimental data were transformed to sigmoid dose-response curves using nonlinear regression analysis (GraphPad Prizm 5), which enabled the calculation of the corresponding IC₅₀.

4.4.3. Bacterial strains

The antibacterial activities of the compounds **1** and **2** were evaluated *in vitro* against 30 microorganisms, including 10 bacteria of the American Type Culture Collection (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 51288, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Bacillus cereus* ATCC 10987). Twenty multidrug-resistant bacteria from the Microbiology Laboratory, of the University Hospital of Santa Maria, were identified by the automated system MicroScan-Siemens®: *Pseudomonas aeruginosa* (6 isolates), *Acinetobacter baumannii* (2 isolates), *Stenotrophomonas maltophilia* (1 isolate), *Klebsiella pneumoniae* (3 isolates), *Klebsiella oxytoca* (1 isolate), *Enterobacter brevis* (2 isolates) *Staphylococcus aureus* (3 isolates), *Staphylococcus epidermidis* (2 isolates). The guidelines of the Technical Note n° 1/2010, issued by the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA), were followed in the selection of multidrug-resistant bacteria (MDRs). According to them, the resistance to the different classes of antimicrobials in routine microbiological tests characterizes multidrug-resistant microorganisms [38].

4.4.4. Antimicrobial susceptibility testing

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined in cation-adjusted Mueller Hinton broth (Difco, Detroit, MI) following the standard microdilution method [39]. Inoculates were prepared in the same medium at a density adjusted to a 0.5 McFarland turbidity standard (1.5×10^8 colony forming units - CFU mL⁻¹). The assayed compounds (**1** – **2**) were dissolved in 50% of ethanol. A total of 10 concentrations of the compounds were tested in each assay (0.25 to 128 µg mL⁻¹). The 96 well microplates were incubated without agitation at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. After incubation, 10 µL of 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were added. Live microorganisms reduce TTC by enzymatic action, originating formazan kept inside granules in the cells, which become red [40]. The MIC values of the tested compounds were defined as the lowest concentration exhibiting no visible growth of microorganisms compared with compound-free control wells. All assays were performed in triplicate.

Supplementary material

Crystallographic data for the structural analyses have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre CCDC no. 898763 and 898764. Further details of the crystal structures investigations are available free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Acknowledgments

M. H. thanks CNPq (proc. 305254/2009-0), M.K.T. and A. L. thanks CAPES for grant, and C.B.K thanks CNPq for grant.

References

- [1] B.G. Katzung, *Farmacologia Básica e Clínica*, 10^a ed., Mcgraw-hill, São Paulo, 2010.
- [2] C. Santini, M. Pellei, G. Papini, B. Morresi, R. Galassi, S. Ricci, F. Tisato, M. Porchia, M. P. Rigobello, V. Gandin, C. Marzano, In vitro antitumour activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 232-240.
- [3] J.M. Rowe, G. Buck, A.K. Burnett, R. Chopra, P.H. Wiernik, S.M. Richards, H.M. Lazarus, I.M. Franklin, M.R. Litzow, N. Ciobanu, H. G. Prentice, J. Durrant, M.S. Tallman, A.H. Goldstone ECOG, MRC/NCRI Adult Leukemia Working Party: Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG2993. *Blood* 106 (2005) 3760-3767.
- [4] M. Yanada, G. Garcia-Manero, G. Borthakur, F. Ravandi, H. Kantarjian, E. Estey. Potential cure of acute myeloid leukemia: analysis of 1069 consecutive patients in first complete remission. *Cancer* 110 (2007) 2756-2760.
- [5] I. Stolic, K. Miskovic, I. Piantanida, M.B. Loncar, L. Glavas-Obrovac, M. Bajic, Synthesis, DNA/RNA affinity and antitumour activity of new aromatic diamidines linked by 3,4-ethylenedioxythiophene, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 743-755.
- [6] C. Bailly, G. Chessari, C. Carrasco, A. Joubert, J. Mann, W.D. Wilson, S. Neidle, Sequence-specific minor groove binding by bis-benzimidazoles: water molecules in ligand recognition, *Nucleic Acids Res.* 32 (2003) 1514-1524.
- [7] K. Seiter, D. Liu, A.D. Siddiqui, R. Lerner, J. Nelson, T. Ahmed. Evaluation of temozolomide in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Lymphoma* 45 (2004) 1209-1214.

- [8] P. Caporaso, M. Turriziani, A. Venditti, F. Marchesi, F. Buccisano, M.C. Tirindelli, E. Alvino, A. Garbin, G. Tortorelli, L. Toppo, E. Bonmassar, S. D'Atri, S. Amadori. Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of temozolomide, lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. *DNA Repair* 6 (2007), 79-86.
- [9] K. Seiter, S. Katragadda, D. Ponce, M. Rasul, N. Ahmed. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 2 (2009) 21.
- [10] A. Franchi, G. Papa, S. D'Atri, D. Piccioni, M. Masi, E. Bonmassar. Cytotoxic effects of dacarbazine in patients with acute myelogenous leukemia: a pilot study, *Haematologica* 77 (1992) 146-150.
- [11] M.F. Stevens, J.A. Hickman, S.P. Langdon, D. Chubb, L. Vickers, R. Stone, G. Baig, C. Goddard, N.W. Gibson, J.A. Slack. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo [5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39381), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine, *Cancer Res.* 47 (1987) 5846-5852.
- [12] L. Tentori, G. Graziani, S. Gilberti, P.M. Lacal, E. Bonmassar, S. D'Atri, Triazene compounds induce apoptosis in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient leukemia cell lines, *Leukemia* 9 (1995) 1888-1895.
- [13] M. Turriziani, P. Caporaso, L. Bonmassar, F. Buccisano, S. Amadori, A. Venditti, M. Cantonetti, S. D'Atri, E. Bonmassar, O6-(4-Bromophenyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro, *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 317-323.
- [14] V.O. Domingues, R. Hörner, L.G.B. Reetz, F. Kuhn, V.M. Coser, J.N. Rodrigues, R. Bauchspiess, W.V. Pereira, G.L. Paraginski, A. Locatelli, J. de O. Fank, V.F. Gigli, M. Hörner, In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2226-2237.
- [15] A.K. Goswami, D.N. Purohit, Synthesis and antimicrobial activities of some hydroxytriazenes: a new class o biologically active compounds, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1789-1791.
- [16] M. Hörner, V. F. Giglio, A. J. R. W. A. dos Santos, A.B. Westphalen, B.A. Iglesias, P.R. Martins, C.H. do Amaral, T.M. Michelot, L.G.B. Reetz, C. de M. Bertoncheli, G.L. Paraginski, R. Horner, Triazenos e atividade antibacteriana, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44 (2008) 441-449.
- [17] S. Tian, F.M. Siu, S.C.F. Kui, C.N. Lok, C.M. Che, Anticancer gold(I)-phosphine complexes as potent autophagy-inducing agents, *Chem. Commun.* 47 (2011) 9318-9320.
- [18] S.P. Fricker, Strategies for the biological evaluation of gold anticancer agents, *Anticancer Agents Med. Chem.* 11 (2011) 940-952.

- [19] F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson, L. Brammer, A.G. Orpen, R. Taylor, Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1987) S1-S19.
- [20] E. Teatum, K. Gschneidner, J. Waber, *Compilation of Calculated Data Useful in Predicting Metallurgical Behaviour of the Elements in Binary Alloy Systems*, LA-2345, Los Alamos Scientific Laboratory, New Mexico, USA (1960).
- [21] A.G. Orpen, L. Brammer, F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson, R. Taylor, Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 2. Organometallic compounds and co-ordination complexes of the *d*- and *f*-block metals, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1989) S1-S83.
- [22] A.L. Spek. *Acta Cryst. A* 46, C34. PLATON A Multipurpose Crystallographic Tool. Utrecht University. The Netherlands. A. L. Spek. (2005).
- [23] F. Arnesano, G. Natile, Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 2070-2081.
- [24] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481-489.
- [25] L.R. Kelland, Preclinical perspectives on platinum resistance, *Drugs* 59 (2000) 1-8.
- [26] P.J. Barnard, S.J. Berners-Price, Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1889-1902.
- [27] J.J. Liu, P. Galettis, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasingha, A.C. McGechan, B.C. Baguley, R.J. Bowen, S.J. Berners-Price, M.J. McKeage, In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 303-310.
- [28] G.D. Hoke, G.F. Rush, G.E. Bossard, J.V. McArdle, B.D. Jensen, C.K. Mirabelli, Mechanism of alterations in isolated rat liver mitochondrial function induced by gold complexes of bidentate phosphines, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11203-11210.
- [29] C. Zhu, J. Raber, L.A. Eriksson, Hydrolysis Process of the Second Generation Platinum-Based Anticancer Drug *cis*-Amminedichlorocyclohexylamineplatinum(II), *J. Phys. Chem. B*, 109 (2005) 12195- 12205.
- [30] V. Milacic, Q.P. Dou, The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: implications for breast cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1649-1660.
- [31] P.J. Sadler, The comparative evaluation of the physical and chemical properties of gold compounds, *J. Rheumatol. Suppl.* Jul-Aug 8 (1982) 71-78.
- [32] K. Bush, G.A. Jacoby, Updated Functional Classification of β -Lactamases, *Antimicrob. Agents Ch.* 54 (2010) 969-976.

- [33] Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, © 2005, *COSMO* (Version 1.48), *SAINTE* (Version 7.06°), *SADABS* (Version 2.10).
- [34] M.C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *SIR2004*: an improved tool for crystal structure determination and refinement, *J. Appl. Cryst.* 38 (2005) 381–388.
- [35] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97*, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany. (1997).
- [36] K. Brandenburg, *DIAMOND 3.1a*. 1997 - 2005, Version 1.1a. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.
- [37] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [38] ANVISA - Nota Técnica nº 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, DF, 2010.
- [39] CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- [40] V. Beloti, M.A.F. Barros, J.C. de Freitas, L.A. Nero, J.A. de Souza, E.H.W. Santana, B.D.G.M. Franco, Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk, *Rev. Microbiol.* 30 (1999) 137-140.

Captions for Figures

Figure 1. View of the molecular structure with atom-labeling scheme of **HL**. Displacement ellipsoids at the 50% level and H atoms with arbitrary radii.

Figure 2. View of the molecular structure with atom-labeling scheme of [(L)Au(PPh₃)]. Displacement ellipsoids at the 50% level and H atoms with arbitrary radii.

Figure 3. View of the supramolecular, 2-D assembling of **HL** towards the plane (103). The infinite two-dimensional arrangement occurs along to the crystallographic directions [010] and [30-1] *via* classical hydrogen bonds (indicated as dashed lines) N2-H2...O1', N2-H3...N11'' and, N13-H13...O2'''; symmetry codes ('): -x, -y, 1-z, (''): 1.5-x, -0.5+y, 0.5-z, (''''): 1.5-x, 0.5+y, 0.5-z. Atoms with arbitrary radii.

Figure 4. View of the supramolecular, 1-D assembling of [(L)Au(PPh₃)] toward the crystallographic direction [010]. The one-dimensional arrangement occurs along to the base vector [111] *via* classical hydrogen bonds N1-HA...O1' and non-classical hydrogen bonds C15-H15...O2'' (indicated as dashed lines); symmetry codes ('): 2-x, -y, -z. Atoms with arbitrary radii.

Figure 5. Molecular fragment sections of **1** (X = H) and **2** (X = PPh₃).

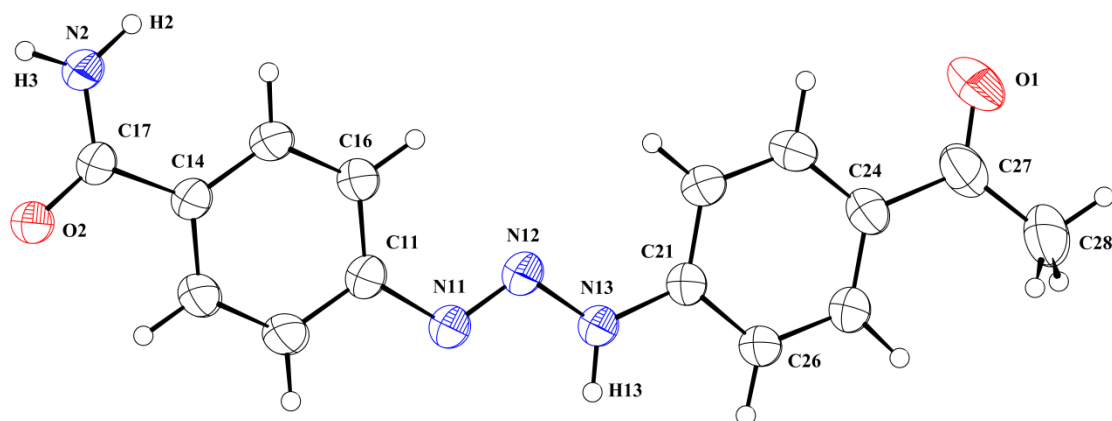


Figure 1 (Maísa K. Tizotti, et al.)

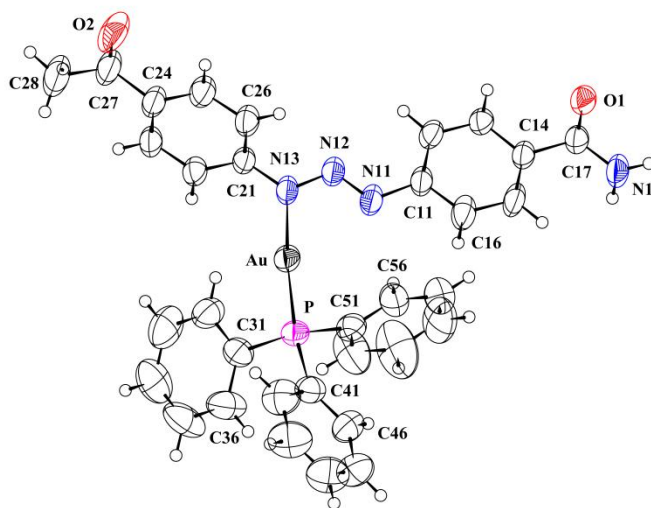


Figure 2 (Maísa K. Tizotti, et al.)

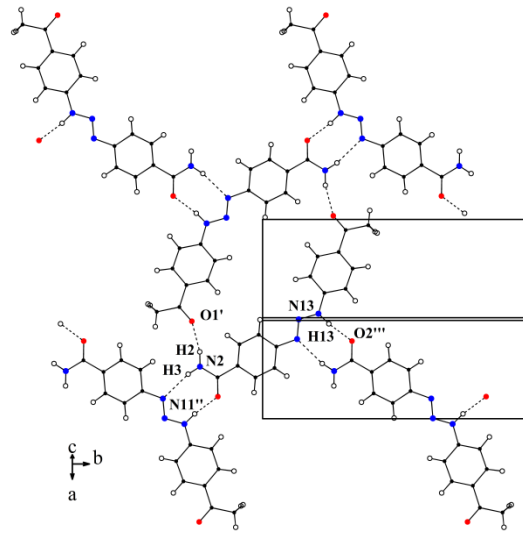


Figure 3 (Maísa K. Tizotti, et al.)

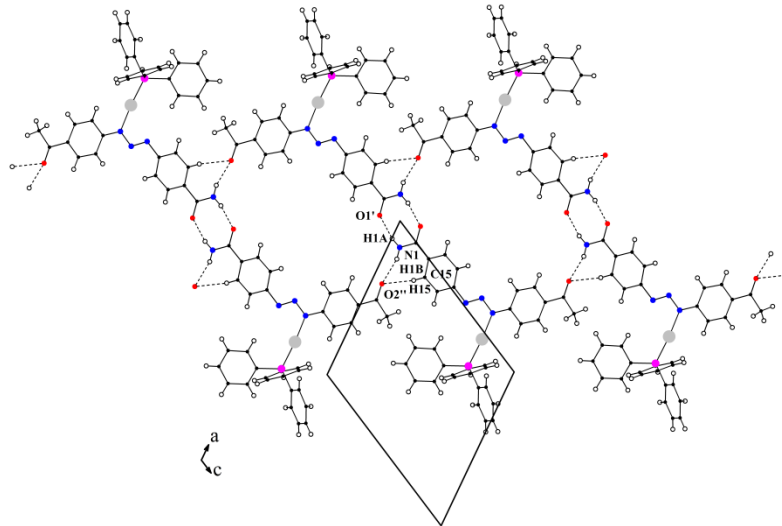


Figure 4 (Maísa K. Tizotti, et al.)

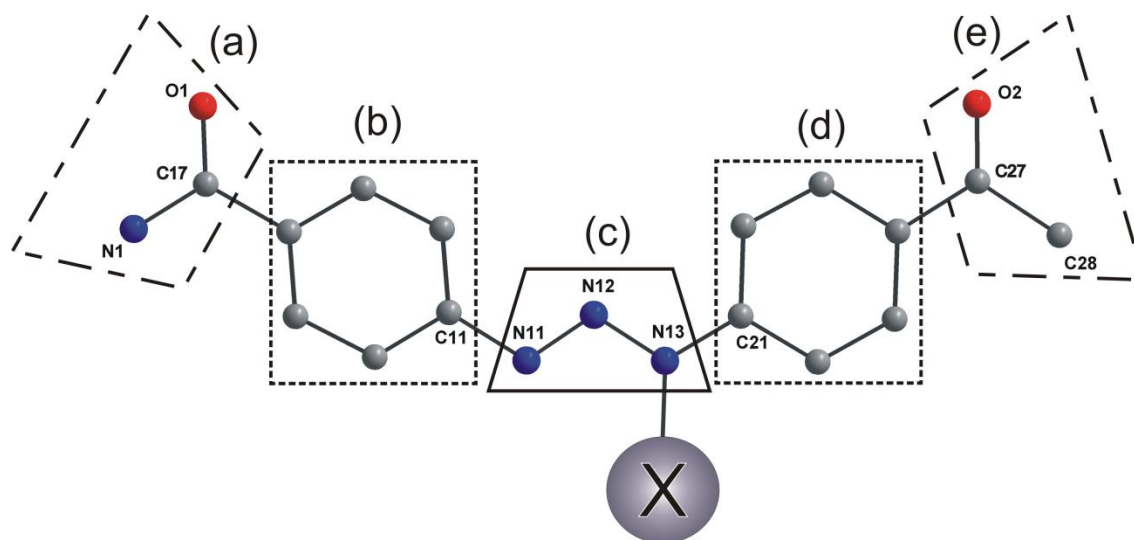


Figure 5 (Maísa K. Tizotti, et al.)

Table 1 Crystal data and structure refinement for the free triazene **1** and complex **2**.

Compound	1	2
Formula	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂	C ₃₃ H ₂₈ AuN ₄ O ₂ P
<i>M</i> (g·mol ⁻¹)	282.30	740.53
Crystal size (mm ³)	0.41 x 0.24 x 0.16	0.20 x 0.14 x 0.12
Crystal system	Monoclinic	Triclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> (-1)
<i>a</i> (Å)	7.2645(4)	12.1752(4)
<i>b</i> (Å)	17.2890(7)	12.3736(4)
<i>c</i> (Å)	11.6891(5)	14.2270(4)
<i>α</i> (°)	90	109.540(2)
<i>β</i> (°)	95.833(2)	112.488(2)
<i>γ</i> (°)	90	98.160(2)
<i>V</i> (Å ³)	1460.50(12)	1774.39(10)
<i>Z</i>	4	2
<i>D</i> (calc) (g·cm ⁻³)	1.284	1.386
<i>μ</i> (MoKα)(mm ⁻¹)	0.089	4.221
<i>F</i> (000)	592	728
Temperature (K)	293(2)	293(2)
Radiation (MoKα)(Å)	0.71073	0.71073
Index ranges	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 5 -23 ≤ <i>k</i> ≤ 21 15 ≤ <i>l</i> ≤ 15	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 16 -15 ≤ <i>k</i> ≤ 16 -17 ≤ <i>l</i> ≤ 18
Reflections collected	25958	30480
Completeness to theta (%)	99.7 (<i>θ</i> = 28.38)	99.6 (<i>θ</i> = 27.91)
Max. and min transmission (%)	0.9859 and 0.9645	0.6313 and 0.4856
Unique data, <i>R</i> (int)	3645 (0.0316)	8463 (0.0414)
<i>θ</i> range (°)	2.11 to 28.38	1.71 to 27.91
Observed data [(<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))]	2335	6150
<i>R</i>	0.0445	0.0450
<i>wR</i> ₂	0.1132	0.1463
<i>S</i> (<i>F</i> ²)	1.020	1.121
Largest diff. peak and hole [e·Å ⁻³]	0.197 / -0.182	1.826 / -0.645

Table 2 Selected geometric parameters (Å, °) for the free triazene **1** and complex **2**.

Bond lengths		Bond angles	
Triazene 1			
C11 – N11	1.4125(18)	O2-C17-N2	121.79(13)
C17-O2	1.2418(17)	O2-C17-C14	119.03(12)
C17-N2	1.3238(19)	N2-C17-C14	119.17(13)
C21-N13	1.3873(17)	O1-C27-C24	120.76(17)
C27-O1	1.215(2)	O1-C27-C28	119.41(16)
C27-C28	1.491(3)	C24-C27-C28	119.82(16)
N2-H2	0.96(2)	H2-N2-H3	121.4(18)
N2-H3	0.91(2)	N12-N11-C11	114.64(12)
N11-N12	1.2720(16)	N11-N12-N13	110.80(12)
N12-N13	1.3252(17)	N12-N13-C21	121.81(12)
N13-H13	0.93(2)	N12-N13-H13	119.7(12)
Complex 2			
C11-N11	1.421(8)	O1-C17-N1	121.2(6)
C17-O1	1.235(9)	O1-C17-C14	121.4(6)
C17-N1	1.343(9)	N1-C17-C14	117.4(6)
C21-N13	1.380(8)	O2-C27-C24	121.9(7)
C27-O2	1.202(11)	O2-C27-C28	121.8(8)
C31-P	1.821(8)	C24-C27-C28	116.0(8)
C41-P	1.823(8)	H1A-N1-H1B	120.0 (8)
C51-P	1.820(8)	N12-N11-C11	113.0(6)
N11-N12	1.274(8)	N11-N12-N13	111.8(6)
N13-Au	2.062(6)	N12-N13-C21	114.9(6)
P-Au	2.2243(19)	N12-N13-Au	117.7(4)
		N13-Au-P	174.48(15)

Table 3 Hydrogen-bonding geometric parameters (\AA , $^\circ$) the free triazene **1** and complex **2**.

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$\angle D-H\cdots A$
Triazene 1				
N2-H2 \cdots O1'	0.96(2)	2.02(2)	2.960(2)	165.5(19)
N2-H3 \cdots N11''	0.91(2)	2.25(2)	3.1471(18)	167.8(19)
N13-H13 \cdots O2'''	0.93(2)	1.86(2)	2.7794(17)	170(2)
Complex (2)				
N1-H1A \cdots O1'	0.86	2.12	2.956(9)	164
N1-H1B \cdots O2''	0.86	2.15	2.973(11)	161
C15-H15 \cdots O2''	0.93	2.50	3.419(12)	171

(D = donor atom, A = acceptor atom)

Symmetry codes: (') $-x, -y, 1-z$, (') $1.5-x, -0.5+y, 0.5-z$, (') $1.5-x, 0.5+y, 0.5-z$ for triazene **1**

Symmetry codes: (') $2-x, -y, -z$, (') $-1+x, -1+y, -1+z$ for complex **2**

Table 4 Interplanar angles ($^\circ$) between molecular fragments of the free triazene **1** and complex **2**.

Fragments	(a) / (b)	(b) / (c)	(c) / (d)	(d) / (e)	(b) / (d)
Triazene 1	7,2(2)	4,2(2)	1,4(2)	6,3(3)	3,8(1)
Complex 2	5(1)	6,8(1)	12,0(1)	8(2)	13,2(4)

Table 5 Cytotoxic activity data of compound **1**, **2** and Dacarbazine® (MTT-dye reduction assay)

Patient number and leukemia type	Compound 1			Compound 2			Dacarbazine®
	Concentration ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	% cell death	IC ₅₀ ^(a) ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	% cell death	IC ₅₀ ^(a) ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	IC ₅₀ ^(a) ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
1 AML ^(b)	100	45.33		100	66.17		Unperformed
	50	31.56	77.47	50	51.39	23.38	
	12.5	51.82		12.5	60.93		
2 CML ^(c)	100	21.07		100	52.33		Unperformed
	50	12.52	306.4	50	53.10	50.69	
	12.5	26.18		12.5	34.10		
3 ALL ^(d)	100	27.28		100	71.10		Unperformed
	50	19.25	205.2	50	57.60	35.36	
	12.5	29.08		12.5	30.12		
4 MDS ^(e)	100	23.42		100	81.92		Unperformed
	50	35.58	131.9	50	82.30	7.72	
	12.5	49.40		12.5	67.03		
CP ^(f)	100	15.78		100	21.67		132.40
	50	7.22	453.9	50	12.50	315.2	
	12.5	24.64		12.5	19.68		

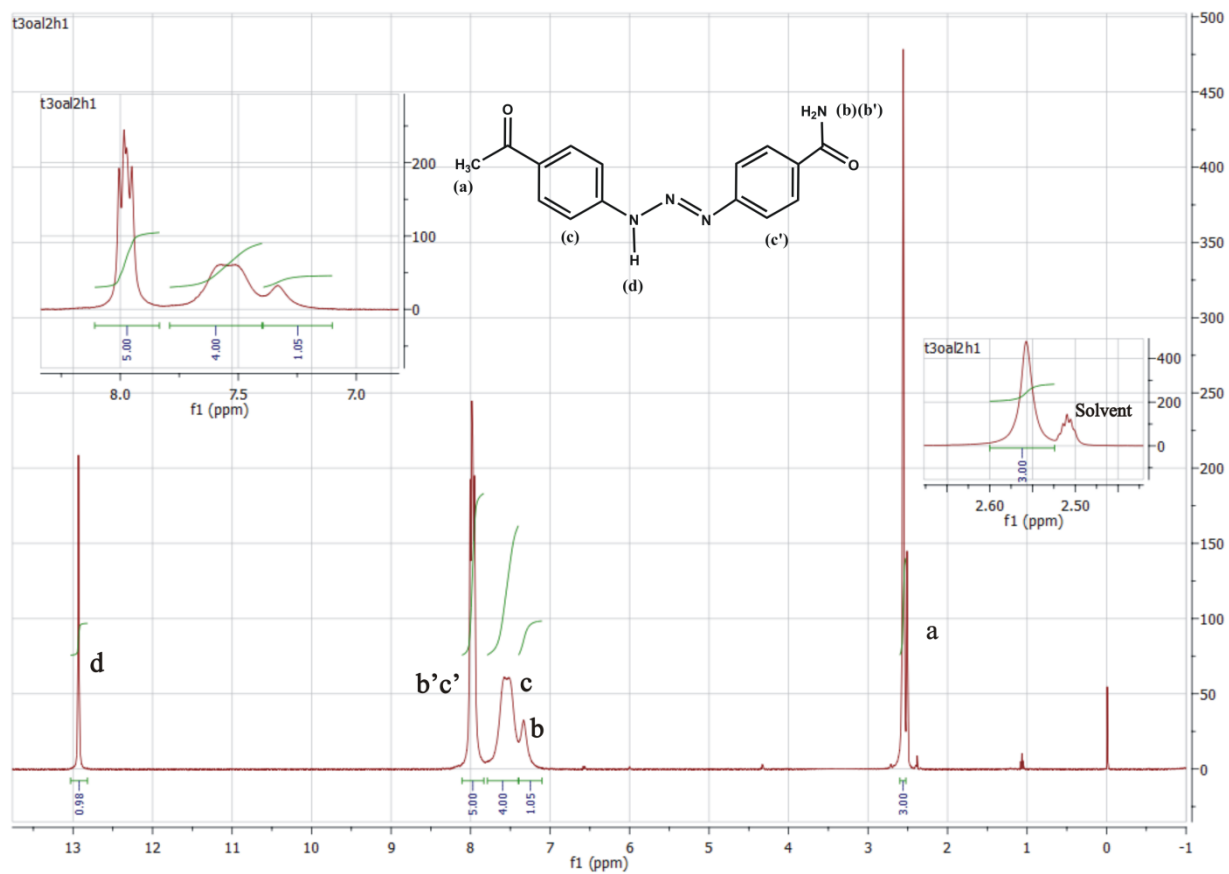
^(a) IC₅₀ (dose required to achieve 50% decrease in cell grow). ^(b) 1 AML = acute myeloid leukemia cells of patient number 1. ^(c) 1 CML = chronic myeloid leukemia cells of patient number 2. ^(d) 3 ALL = acute lymphocytic leukemia cells of patient number 3. ^(e) 4 MDS = myelodysplastic syndrome of patient number 4. ^(f) CP = control patient cells of bone marrow

Supplementary Information

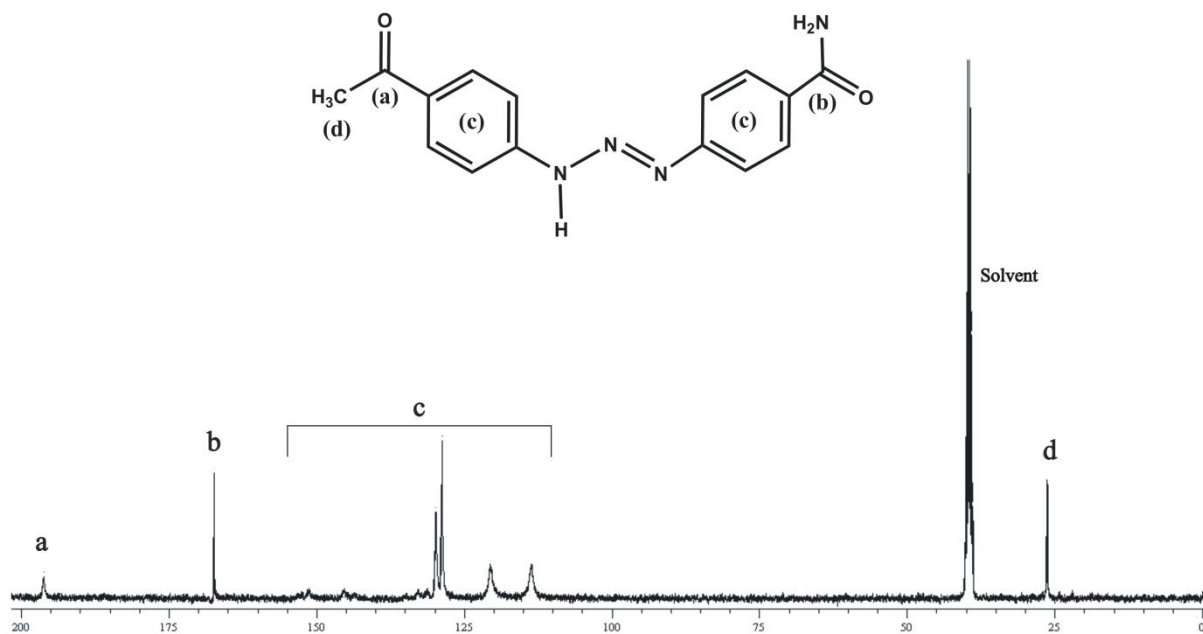
Table S1. Minimum inhibitory concentration values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for the triazene **1** and complex **2**

Bacterial strain	Compound 1	Compound 2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51288	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 35 (1)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 45 (2)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 57	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 16	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 44	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Klebsiella oxytoca</i> (MDR n° 112)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 132)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR n° 164)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 165)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 179)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 223)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR n° 224)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 236)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (MDR n° 258)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Empedobacter brevis</i> (MDR n° 285)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR n° 325)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Empedobacter brevis</i> (MDR n° 590)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR n° 707)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR n° 806)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 955)	> 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$	= 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$

MDR = multidrug-resistant



^1H NMR spectrum of **1** ($\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$) $\delta = 12.81$ (s, 1H, NH triazene); 8.00 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 4H, ArH); 7.85 (br, 1H, NH amide), 7.57 (br, 4H, ArH), 7.26 (br, 1H, NH amide) 2.56 (s, 3H, CH_3) ppm.



^{13}C NMR spectrum of **1** in $\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$.

^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6/\text{TMS}$) $\delta = 196.16$ (C=O ketone); 167.30 (C=O amide); 151.05 (Ph); 145.29 (Ph); 132.61 (Ph); 131.17 (Ph); 129.78 (Ph); 128.71 (Ph); 120.55 (Ph); 113.59 (Ph); 26.20 (CH_3) ppm.

4 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS

4.1. Ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona e complexos triazenidos de Cu(II)

Também foram investigados, quanto a sua atividade antibacteriana e antileucêmica *in vitro*, o ligante triazeno 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona (**1**) (Figura 7) e três complexos triazenidos de cobre(II) relacionados contendo ligantes diimínicos (piridina, 2,2'-biperidina e 1,10-fenantrolina).

Tanto o ligante quanto os complexos haviam sido previamente sintetizados e caracterizados no Núcleo de Investigação de Trizenos e Complexos (NITriCo) da UFSM. Após a caracterização, os complexos foram denominados: *trans-Bis*[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^{β}]bis(piridina- κN)(aquo)cobre(II) (**2**) (Figura 8); *Bis*{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^{β}](2,2'-biperidina- $\kappa N^2, N^2$)}(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^{\beta}$)cobre(II) (**3**) (Figura 9); *Bis*{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^{β}](fenantrolina- $\kappa N^1, N^{10}$)}(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^{\beta}$)cobre(II) (**4**) (Figura 10).

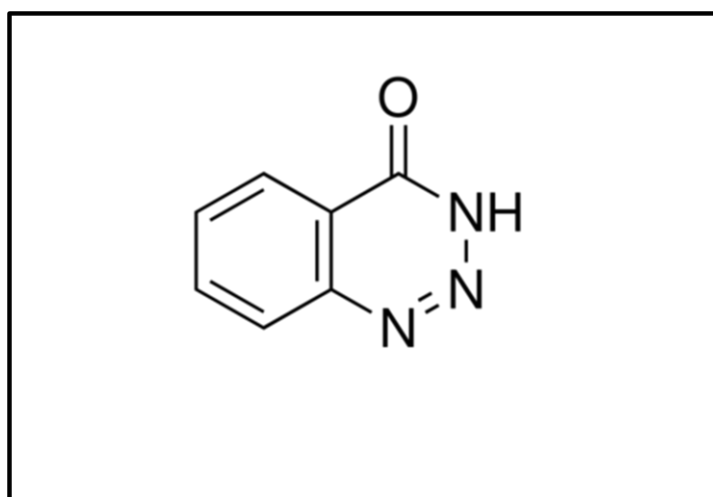


Figura 7 – Representação da estrutura molecular do ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona (**1**).

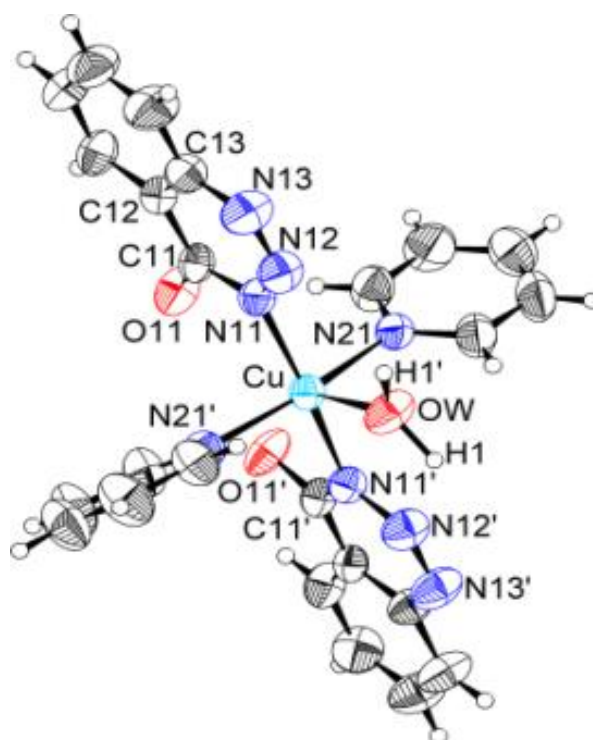


Figura 8 – Projeção da estrutura cristalina do complexo *trans*-Bis[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3]bis(piridina- κN)(aquo)cobre(II) (**2**).

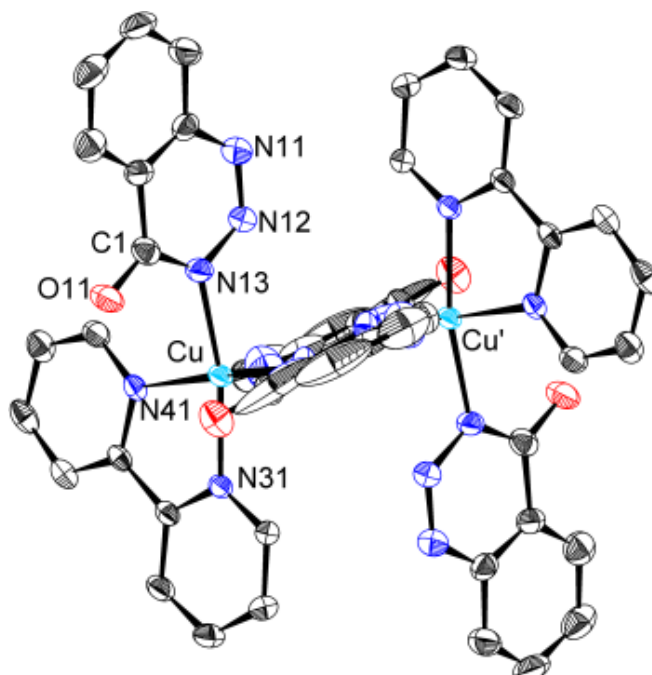


Figura 9 – Projeção da estrutura cristalina do complexo Bis{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3](2,2'-biperidina- $\kappa N^2, N^2$)}(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^3$)}cobre(II) (**3**).

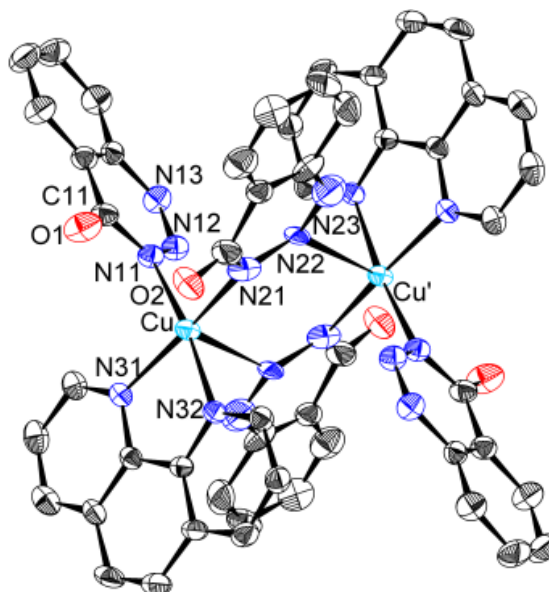


Figura 10 – Projeção da estrutura cristalina do complexo *Bis*{[1,2,3-benzotriazinido-4-ona)- κN^{β}](fenantrolina- $\kappa N^{\alpha}, N^{\gamma}$)}cobre(II) (4).

4.2. Avaliação da atividade antileucêmica *in vitro*

4.2.1. Células e condições de cultura

Durante os anos de 2011 e 2012, foram testadas sete amostras de medula óssea, excedentes da rotina laboratorial (análises citogenéticas) do Setor de Hematologia-Oncologia do HUSM. Destas, seis amostras haviam sido coletadas de pacientes com suspeita clínica de leucemia, os quais na data da coleta ainda não haviam sido submetidos ao tratamento com agentes antineoplásicos. Uma amostra foi coletada de paciente com leucocitose.

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por gradiente de densidade (Ficoll-Paque PLUS – GE Healthcare) e, então, cultivadas em frascos de poliestireno contendo o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 – Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (50 U mL⁻¹ de penicilina/50 µM de estreptomicina), a uma temperatura de 37 °C, em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂.

4.2.2. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* representa um método de referência para o *screening* inicial de novos agentes antineoplásicos. 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). 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 (MOSMAN, 1983).

Os compostos foram dissolvidos em uma mistura equivalente de água ultra pura e etanol (1:1) e, em seguida, diluídos a fim de se obter três diferentes concentrações (12,5; 50 e 100 $\mu\text{mol mL}^{-1}$). A quantidade de células viáveis (não coradas pelo corante azul de tripan) presentes na suspensão celular foi estimada por hemocitometria. Noventa microlitros desta suspensão celular (densidade de 3×10^6 células mL^{-1}) foram adicionados por poço em uma microplaca de 96 poços. As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% CO_2 . Culturas controle, contendo células na ausência dos compostos também foram realizadas.

Após 24 h de incubação, solução salina estéril de MTT (5 mg mL^{-1}) foi adicionada às amostras e as placas foram reincubadas por mais 4 horas. Após a incubação, dissolveram-se os cristais de formazan pela adição de 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, a inibição do crescimento celular foi detectada por meio da medida das absorbâncias a 570 nm utilizando leitor de microplacas (Fisher Bio-Tek BT2000).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores de CI_{50} (concentração que reduz em 50% a viabilidade celular) para cada composto foram calculados por meio de regressão não linear, utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism 5*.

4.3. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

4.3.1. Cepas bacterianas

A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* frente microrganismos padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), incluindo cepas bacterianas gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028), assim como, cepas bacterianas gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 51288, *E. faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 7468).

Também foi investigada a atividade antibacteriana dos compostos frente a isolados clínicos obtidos no Laboratório de Microbiologia do HUSM, os quais haviam sido caracterizados como resistentes a múltiplos antimicrobianos por meio de exames microbiológicos. Dentre estes isolados estão: duas cepas de *P. aeruginosa* e duas cepas de *Acinetobacter baumannii* produtoras de metalo- β -lactamase (M β L); duas cepas de *S. epidermidis* e três cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRS e MRSA); duas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) e uma cepa de *E. coli* isolada de urocultura, sensível a apenas duas classes de antimicrobianos. Todas as cepas bacterianas foram armazenadas a -20 °C no banco de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

4.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM, definida como a menor concentração do composto que impede o crescimento visível do microrganismo, foi determinada em caldo Mueller Hinton (Difco) seguindo-se o método padrão de microdiluição em caldo, recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os compostos foram

dissolvidos em quantidades equivalentes de água ultrapura estéril e etanol (1:1) e testados nas concentrações de 0,25 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Placas de 96 orifícios, contendo meio de cultura inoculado com bactérias e diferentes concentrações dos compostos, foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após o período de incubação, procedeu-se a leitura visual da CIM e os resultados foram comparados com a CIM obtida para alguns agentes antimicrobianos relevantes, comumente utilizados no tratamento de infecções por estes microrganismos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados sem que se soubesse o diagnóstico definitivo dos pacientes. Informações contidas nos prontuários médicos, assim como, resultados de exames laboratoriais revelaram que os seis pacientes com suspeita clínica de leucemia foram diagnosticados como portadores de leucemia. Houve uma grande heterogeneidade no que se refere aos tipos de leucemia diagnosticados: paciente **1** (LMC Ph+); paciente **2** (LMA subtipo FAB M2, cariótipo normal); paciente **3** (LLA-T); paciente **4** (LMC atípica Ph-); paciente **5** (LMC Ph+); paciente **6** (LLC em transformação blástica).

O paciente que apresentava leucocitose não foi diagnosticado como portador de neoplasia. Portanto, os resultados de citotoxicidade *in vitro* obtidos frente às células mononucleares da medula óssea deste paciente foram utilizados para avaliar a toxicidade dos compostos em células não tumorais. Assim, este paciente foi designado como paciente controle (**C**).

Na Tabela 1 podem ser visualizados os valores de CI_{50} obtidos para o ligante triazeno livre (**1**) e para os complexos triazenidos de Cu(II) relacionados (**2**, **3**, **4**) quando estes foram incubados por 24 horas com células mononucleares da medula óssea de pacientes leucêmicos (**1-6**) e de paciente controle (**C**).

Tabela 1 – Atividade citotóxica (CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)) do ligante triazeno livre e complexos triazenidos de Cu(II) relacionados contendo coligantes diimínicos.

Pacientes	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	Ligante (1)	Complexo (2) piridina	Complexo (3) 2,2'-bipiridina	Complexo (4) 1,10-fenantrolina
1 (LMC Ph+)	NC	NC	NC	5,389
2 (LMA M2)	182,8	189,1	344,8	148,1
3 (LLA-T)	47,32	44,53	16,77	4,684
4 (LMC Ph-)	227,1	12,30	15,08	1,205
5 (LMC Ph+)	21,63	44,51	38,56	6,168
6 (LLC)	23,81	26,76	43,08	9,460
Controle	4,752	55,77	12,41	21,72

NC (Não calculada devido ao baixo percentual de inibição do crescimento celular).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, pode-se inferir que os compostos ensaiados apresentaram uma atividade antiproliferativa bastante variável.

O ligante triazeno livre (**1**) mostrou-se mais citotóxico frente às células mononucleares da medula óssea de dois pacientes com leucemia crônica (pacientes 5 e 6), possuindo efeito antiproliferativo *in vitro* tanto sobre células de LMC Ph+ ($CI_{50} = 21,63 \mu\text{mol L}^{-1}$) quanto LLC em transformação blástica ($CI_{50} = 23,81 \mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, este ligante também foi capaz de inibir, de forma discreta, o crescimento das células de um paciente acometido por LLA-T (paciente 3) ($CI_{50} = 47,32 \mu\text{mol L}^{-1}$).

De modo geral, pode-se observar um aumento significativo nos efeitos citotóxicos quando o ligante triazeno foi coordenado a íons Cu(II) e 1,10-fenantrolina (complexo **4**). É de particular interesse a atividade potencial deste complexo frente a células de pacientes com LMC, especialmente LMC atípica Ph- (paciente 4) ($CI_{50} = 1,205 \mu\text{mol L}^{-1}$), uma vez que 25-40% dos pacientes portadores desta neoplasia evoluem para leucemia aguda, ao passo que o restante vai a óbito devido à insuficiência medular, com um tempo médio de sobrevivência de menos de 20 meses com a terapia convencional (KOLDEHOFF et al., 2004).

Vários estudos têm relatado a potencial atividade citotóxica de compostos TZCs frente a células neoplásicas de pacientes com LMA (SEITER et al., 2002; SEITER et al., 2004; TURRIZIANI et al., 2006; CAPORASO et al., 2007; SEITER et al., 2009; REETZ, 2009; DOMINGUES et al., 2010). Contudo, neste estudo os compostos não apresentaram valores de CI_{50} relevantes quando incubados com células de paciente com LMA subtipo M2, sugerindo que os mesmos podem não representar abordagens terapêuticas promissoras para este tipo de leucemia.

Outra observação importante é que todos os complexos e principalmente o triazeno livre, exibiram significativa toxicidade frente a células normais (paciente controle). Esta falta de seletividade é um fator indesejável, uma vez que pode diminuir de maneira considerável o índice terapêutico desses compostos, inviabilizando a sua possível aplicabilidade clínica.

Na Tabela 2 encontram-se descritos os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* do ligante triazeno livre (**1**) e complexos triazenidos de Cu(II) relacionados (**2**, **3**, **4**) realizada frente a diferentes espécies gram positivas e gram negativas. Podem ser visualizados os valores de CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) obtidos frente a onze cepas ATCC e doze cepas patogênicas resistentes a múltiplos antimicrobianos (MDR).

Tabela 2 – Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do ligante triazeno livre (1) e dos complexos triazenidos de Cu(II) relacionados contendo coligantes diimínicos (2, 3, 4) frente a cepas bacterianas ATCC e MDR.

Cepas bacterianas	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	(1) Ligante triazeno	(2) Complexo piridina	(3) Complexo 2,2'-bipiridina	(4) Complexo 1,10-fenantrolina
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	= 128	= 128	> 128	= 32
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 128	= 128	> 128	= 32
<i>E. coli</i> ATCC 35218	> 128	> 128	> 128	= 128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>E. faecalis</i> ATCC 51288	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	> 128	> 128	> 128	= 64
<i>M. luteus</i> ATCC 7468	> 128	= 128	> 128	= 64
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	> 128	> 128	> 128	= 128
<i>S. aureus</i> MDR 1	> 128	= 128	> 128	= 32
<i>S. aureus</i> MDR 2	> 128	= 128	> 128	= 64
<i>S. aureus</i> MDR 3	> 128	= 128	> 128	= 32
<i>S. epidermidis</i> MDR 4	> 128	> 128	> 128	= 64
<i>S. epidermidis</i> MDR 5	= 128	= 128	> 128	= 64
<i>P. aeruginosa</i> MDR 6	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>P. aeruginosa</i> MDR 7	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>A. baumannii</i> MDR 8	> 128	> 128	= 128	= 64
<i>A. baumannii</i> MDR 9	> 128	> 128	= 128	= 64
<i>K. pneumoniae</i> MDR 10	> 128	> 128	> 128	= 128
<i>K. pneumoniae</i> MDR 11	> 128	> 128	> 128	= 128
<i>E. coli</i> MDR 12	> 128	> 128	> 128	= 128

Os valores de CIM sugerem que tanto o ligante triazeno livre **1** quanto os complexos **2** e **3** não exibiram atividade significativa contra os microrganismos testados. Para a maioria das bactérias a CIM destes compostos foi maior que $128 \mu\text{g mL}^{-1}$.

De modo geral, o ligante **1** e o complexo triazenido de Cu(II) contendo o ligante diimínico piridina (**2**) foram capazes de inibir o crescimento tanto das cepas gram positivas ATCC quanto dos isolados clínicos resistentes a múltiplos antimicrobianos (CIM = $128 \mu\text{g mL}^{-1}$), especialmente *S. aureus* e *S. epidermidis*. Já o complexo triazenido de Cu(II) contendo o ligante 2,2'-biperidina (**3**) exibiu atividade frente a duas cepas de *A. baumannii* multiresistentes.

O patógeno oportunista *A. baumannii* é classificado no grupo dos bacilos gram negativos não fermentadores da glicose e é considerado atualmente um importante agente etiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde, uma vez que ocasiona infecções graves, principalmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (KARAGEORGOPOULOS; FALAGAS, 2008; MARAGAKIS; PERL, 2008).

Similarmente à atividade antileucêmica, a presença do ligante diimínico 1,10-fenantrolina favoreceu as propriedades antibacterianas do complexo **4**, o qual foi capaz de inibir de forma satisfatória o crescimento de três espécies gram positivas testadas: *S. aureus* (CIM = 32 e $64 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. epidermidis* (CIM = $64 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *M. luteus* (CIM = 64). O crescimento de *A. baumannii* também foi inibido pelo complexo **4**, apresentado CIM = $64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, este complexo apresentou discreta atividade frente a outras espécies gram negativas tais como *K. pneumoniae* (CIM = $128 \mu\text{g mL}^{-1}$), *E. coli* (CIM = $128 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. typhimurium* (CIM = $128 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Apesar do mecanismo que conduz a atividade antibacteriana dos compostos TZCs ainda não ter sido elucidado, estudos têm demonstrado que estes compostos exibem uma melhor atividade contra bactérias gram positivas do que gram negativas. Foi sugerido que estes resultados estão relacionados à maior complexidade da membrana bacteriana gram negativa, visto que ela representa uma barreira para a penetração de diversos agentes antimicrobianos. Além disso, o espaço periplasmático contém grandes concentrações de enzimas que são capazes de decompor moléculas exógenas (PARAGINSKI, 2007; HÖRNER et al., 2008; REETZ, 2009; DOMINGUES et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* revelaram os consideráveis efeitos antiproliferativos do complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) sobre células mononucleares da medula óssea de paciente com síndrome mielodisplásica, bem como, de pacientes com diferentes tipos de leucemia.
- Tanto o pré-ligante 1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazeno quanto o complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) apresentaram efeitos citotóxicos significativamente menores do que o antineoplásico dacarbazina quando testados frente a células não tumorais.
- Os valores de CIM obtidos para o complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) demonstraram a sua promissora atividade antibacteriana, especialmente frente a cepas gram positivas.
- O pré-ligante 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona foi apto a inibir o crescimento de células leucêmicas provenientes de pacientes com LMC, LLC e LLA-T. Contudo, não demonstrou efeitos citotóxicos pronunciados em LMA M2.
- A baixa seletividade de 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona e dos complexos triazenidos de cobre(II) relacionados pôde ser evidenciada em razão do efeito antiproliferativo considerável destes compostos sobre células não tumorais.
- Dentre os complexos triazenidos de cobre(II), a atividade antileucêmica mais promissora foi demonstrada pelo complexo **4**, o qual inibiu de forma satisfatória o crescimento de células leucêmicas provenientes de pacientes com LLA-T, bem com, LMC Ph+ e Ph-.
- Sugere-se que esta pronunciada atividade antileucêmica do complexo **4** pode ter sido potencializada pela presença de 1,10-fenantrolina. Além disso, este ligante também pode estar intimamente relacionado aos efeitos

antibacterianos do complexo **4**, o qual inibiu tanto o crescimento de bactérias gram positivas quanto gram negativas.

- Assim, pode-se inferir que tanto o complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)triazenido quanto o complexo *Bis*{[1,2,3-benzotriazenido-4-ona)- κN^3](fenantrolina- $\kappa N^1, N^{10}$)(μ_2 -[1,2,3-benzotriazenido-4-ona]- $\kappa N^2, N^3$)}cobre(II) representam uma estratégia alternativa na concepção de novos metalofármacos com atividade antitumoral e/ou antibacteriana.
- Ressalta-se que estudos adicionais são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa destes compostos, assim como, para a avaliação minuciosa dos seus efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

AKERS, L. J. et al. Targeting glycolysis in leukemia: a novel inhibitor 3-BrOP in combination with rapamycin. **Leukemia Research**, v. 35, p. 814-820, 2011.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, A. et al. Recomendações para o diagnóstico, tratamento e monitorização da leucemia mielóide crônica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 22, n. 5, p. 537-544, 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2012**. Atlanta, 2012.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

APPEL, E. A. et al. Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit[*n*]uril. **Chemical Communications**, v. 48, p. 9843-9845, 2012.

APPELBAUM, P. C. 2012 and beyond: potential for the start of a second pre-antibiotic era? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2062-2068, 2012.

BACK, D. F. et al. Three-dimensional triazenido layers attained through classical and non-classical hydrogen interactions and its coordination to palladium under prolific occurrence of bifurcated hydrogen bonding. **Polyhedron**, v. 31, p. 558-564, 2012.

BENEKLI, M. et al. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemia. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 2940-2954, 2003.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British Journal of Haematology**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BINDOLI, A. et al. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1692-1707, 2009.

BOWER, M.; WAXMAN, J. **Lecture Notes: Oncology**. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes**. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BROCH, F. **Supramolecularidade de triazenos assimétricos dissubstituídos 4-(etoxicarbonilfenil)-2-(halofenil) e complexos de Ni (II), Cu (II) e Hg (II)**. 2008.141f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 2007.

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

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, p. 5019-5032, 2011.

CAPORASO, P. et al. Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of temozolomide, lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. **DNA Repair**, v. 6, p. 79-86, 2007.

CAPUCHA, V. et al. Development of triazene prodrugs for ADEPT strategy: New insights into drug delivery system based on carboxypeptidase G2 activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6903-6908, 2012.

CASCIATO, D. A.; LOWITZ, B. B. **Manual of clinical oncology**: Principles, definitions and statistics. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

CASSIDY, J. et al. **Oxford handbook of oncology**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2010.

CHE, C.; SUN, R. W. Therapeutic applications of gold complexes: lipophilic gold(III) cations and gold(I) complexes for anti-cancer treatment. **Chemical Communications**, v. 47, p. 9554-9560, 2011.

CHEN, Y. et al. Persistence of cytogenetic abnormalities at complete remission after induction in patients with acute myeloid leukemia: prognostic significance and the potential role of allogeneic stem-cell transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 18, p. 2507-2513, 2011.

CHOPRA, I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 496-505, 2013.

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, p. 2971-2983, 2011.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COLMAN, H.; ALDAPE, K. Molecular predictors in glioblastoma: toward personalized therapy. **Archives of Neurology**, v. 65, p. 877-883, 2008.

CORBI, P. P. et al. Chemical, spectroscopic characterization, and in vitro antibacterial studies of a new gold(I) complex with N-acetyl-L-cysteine. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 63, p. 1390-1397, 2010.

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

CRANS, H. N.; SAKAMOTO, K. M. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 15, p. 313-331, 2001.

CURADO, M. P. et al. Leukemia mortality trends in children, adolescents, and young adults in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 29, p. 96-102, 2011.

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

DEY, R. et al. Syntheses, characterizations and biophysical studies of Cu(II) diphenylphosphate complexes: Effect of co-ligands on their biological properties. **Polyhedron**, v. 48, p. 157-166, 2012.

D'INCALCI, M; SOUTEYRAND, P. Dacarbazine. **Annales De Dermatologie Et De Venereologie**, v. 128, p. 517-525, 2001.

DOHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.115, n. 3, p. 453-474, 2010.

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.

ELSOME, A. M. et al. Antimicrobial activities in vitro and in vivo of transition element complexes containing gold(I) and osmium(VI). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 911-918, 1996.

FERLAY, J. et al. **Globocan 2008: cancer incidence and mortality worldwide**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

FERNANDES, C. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of Fe^{III}, Co^{II}, Cu^{II} and Zn^{II} complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 1214-1223, 2010.

FIORI, A. T. M. et al. Chemical, spectroscopic characterization and antibacterial activities in vitro of a novel gold(I)-ibuprofen complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v.14, p. 738-740, 2011.

GADJEVA, V G. Two spin labeled triazenes: relationship between biochemical and biological activities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 247, p. 39-45, 2002.

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, p. 637-644, 2011.

GASSER, G.; OTT, I.; METZLER-NOLTE, N. Organometallic anticancer compounds. **Journal of Medical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 3-25, 2011.

GAYNOR, D.; GRIFFITH, D. M. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. **Dalton Transactions**, v. 41, p. 13239-13257, 2012.

GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine**. West Sussex: Wiley and Sons, 2005.

GINSBURG, G. S.; WILLARD, H. F. **Genomic and personalized medicine**. 2nd ed. New York: Elsevier, 2012

GONZALEZ, V. M. et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001.

GUO, Z.; SADLER, P. J. Metals in Medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 1512-1531, 1999.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, nov/dez, p. 20-23, 2012

HANUSEK, J. et al. Acid-catalyzed decomposition of stable 1-(2,1-benzisothiazol-3-yl)-3-phenyltriazenes. **Dyes and Pigments**, v. 80, p. 136-140, 2009.

HEHLMANN, R. et al. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 370, p. 342-350, 2007.

HORN, J. R. A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models or purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 339-351, 2005.

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

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

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 82-89, 2008.

JAFFE E. S. et al. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC Press, 2001.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 1387-1407, 2007.

KARAGEORGOPOULOS, D. E.; FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p.751-762, 2008.

KATSAROU, M. E. et al. Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. **Journal of Medical Chemistry**, v. 51, p. 470-478, 2008.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic and clinical pharmacology**. 11th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2009.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573-584, 2007.

KIMBALL, D. B.; HERGES, R.; HALEY, M. M. Two unusual, competitive mechanisms for (2-ethynylphenyl)triazene cyclization: pseudocoarctate versus pericyclic reactivity. **Journal of American Chemistry Society**, v. 8, p. 1572, 2002.

KOLDEHOFF, M. et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukemia. **Bone Marrow Transplantation**, v. 34, p. 1047-1050, 2004.

LESSA, J. A. et al. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1729-1739, 2011.

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.

LINDER, M. C. The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. **Mutation Research**, v. 733, p. 83-91, 2012.

MARAGAKIS, L. L.; PERL T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Antimicrobial Resistance**, v. 46, p.1254-1263, 2008.

MARCHESI, F. et al. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. **Pharmacological Research**, v. 56, p. 275-287, 2007.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature**, v. 7, p. 441-453, 2007.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA**. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MIRABELLI, C. K. et al. Correlation of the in vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of gold(I) coordination complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 218-223, 1986.

MOORE, D. S.; ROBINSON, S. D. Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. **Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry**, 30, p. 1-68, 1986.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAEIM, F.; RAO, N. P.; GRODY, W. W. **Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular approaches**. 1st ed. San Diego: Academic Press, 2008.

NIFONTOV, V. I.; BERSKAYA, N. P.; SHTOKAREVA, E. A. The reactivity and mechanism of action of triazenes. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 28, p. 687-706, 1994.

NOBILI, S. et al. Gold Compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 550-580, 2010.

NOOR, S. M.; BELL, R.; WARD, A. C. Shooting the messenger: Targeting signal transduction pathways in leukemia and related disorders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 78, p. 33-44, 2011.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global status report on non-communicable diseases (2010)**. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/>. Acesso em: 02 dez. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The 10 leading causes of death by broad income group (2008)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 02 dez. 2012.

OTT, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1670-1681, 2009.

PAES, R. A. P. et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 237-239, 2002.

PARAGINSKI, G. L. **Triazenos: clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach**. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PERRY, M. J. et al. Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: Activation by tyrosinase and implications for prodrug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3228, 2009.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, p. 249-253, 2012.

PILLER, G. J. Leukaemia: a brief historical review from ancient times to 1950. **British Journal of Haematology**, v. 112, p. 282-292, 2001.

QIAO, X. et al. Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 728-737, 2011.

RAMADAN, A. M. Structural and biological aspects of copper (II) complexes with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 65, p. 183-189, 1997.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Ternary dinuclear copper(II) complexes of a hydroxybenzamide ligand with diimine coligands: the 5,6-dmp ligand enhances DNA binding and cleavage and induces apoptosis. **Inorganic chemistry**, v. 50, p. 6458-6471, 2011.

REETZ, L. G. B. **Avaliação da atividade de nuclease química, antibacteriana e citotoxicidade de compostos triazenos**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RIGOBELLO, M. P. et al. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 582, p. 26-34, 2008.

RIZZIERI, D. et al. Phase I study of temozolomide and laromustine (VNP40101M) in patients with relapsed or refractory leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 10, p. 211-216, 2010.

RODAK, B. F.; FRITSMA, G. A.; DOING, K. **Hematology: clinical principles and applications**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2007.

ROEDER, I. et al. New experimental and theoretical investigations of hematopoietic stem cells and chronic myeloid leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 43, p. 88-97, 2009.

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

RUBBIANI, R. et al. Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8608-8618, 2010.

SANTINI, C. et al. In vitro antitumour activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 232-240, 2011.

SCHEFFLER, H.; YOU, Y.; OTT, I. Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. **Polyhedron**, v. 29, p. 66-69, 2010.

SEITER, K. et al. Phase I study of temozolomide in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 3249-3253, 2002.

SEITER, K. et al. Evaluation of temozolomide in patients with myelodysplastic syndrome, **Leuk Lymphoma**, v. 45. p. 1209-1214, 2004.

SEITER, K. et al. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 2, p. 21, 2009.

SHAW, C. F. Gold-based therapeutic agents. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2589-2600, 1999.

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.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 71-109, 2011.

SIMON, T. M. et al. Screening trial with the coordinated gold compound auranofin using mouse lymphocyte leukemia P388. **Cancer Research**, v. 41, p. 94-97, 1981.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 987-996, 2005.

SWERDLOW, S. H. et al. **World Health Organization classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 386-398, 2003.

TATAR, Z. et al. Temozolomide and unusual indications: Review of literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, p. 125-135, 2013.

TURRIZIANI, M. et al. O6-(4-Bromothienyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 317-323, 2006.

VAN ZUTPHEN, S.; REEDIJK, J. Targeting platinum anti-tumour drugs: overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 2845-2853, 2005.

VON MOOS, R. et al. First-line temozolomide combined with bevacizumab in metastatic melanoma: a multicentre phase II trial (SAKK 50/07). **Annals of Oncology**, v. 23, p. 531-536, 2012.

VON NUSSBAUM, F. et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 5072-5129, 2006.

WESOLOWSKI, J. R.; RAJDEV, P.; MUKHERJI, S. K. Temozolomide (Temodar). **American Journal of Neuroradiology**, v. 31, p.1383-84, 2010

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, p. 8113-8127, 2010.

WHITE, A. R. Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1948-1953, 2011.

ZHOU, Y. et al. Structure-guided discovery of novel aminoglycoside mimetics as antibacterial translation inhibitors. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 4942-4949, 2005.

ZHOU, Y. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors: 3,5-diamino-piperidinyl triazenes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 5451-5456, 2006.

ZHOU, Y. et al. Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p. 1206-1210, 2007.

ZHU, Y.; PARADA, L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nature Reviews**, v. 2, p. 616-626, 2002.