

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTIBACTERIANA DE UM COMPOSTO
TRIAZENIDO COMPLEXADO COM ÍON OURO (I)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Melise Silveira Nunes

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

SILVEIRA NUNES, MELISE
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE
UM COMPOSTO TRIAZENIDO COMPLEXADO COM ÍON OURO (I) /
MELISE SILVEIRA NUNES.-2015.
69 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, 2015

1. TRIAZENOS 2. ÍON OURO 3. RESISTÊNCIA BACTERIANA 4.
CITOTOXICIDADE I. HÖRNER, ROSMARI II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Melise Silveira Nunes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: melisesnunes@hotmail.com

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que sempre esteve ao meu lado, iluminando e confortando todos os momentos difíceis durante esta caminhada.

Aos meus pais, **Pedro** e **Marlise**, que deixaram de lado muito dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Meu infinito agradecimento, pelo carinho, incentivo e confiança depositada. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu namorado **Rogério** pela paciência, amor, carinho, incentivo, motivação e colaboração durante os momentos de estudo.

A minha colega e amiga **Litiérri**, com quem divido metade desta conquista. Muito obrigada por tudo amiga!!

As colegas e amigas do **Laboratório de bacteriologia (Labac)** pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

Aos **meus amigos** e **minha família**, pessoas queridas, que mesmo sem estarem perto, estiveram muito presentes.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner** pela oportunidade e confiança depositada, durante os tempos de iniciação científica e este período.

Ao **Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da UFSM (NITriCO)**, pela síntese e caracterização do composto investigado nesta dissertação.

À **UFSM**, mais especificamente ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM**, pela oportunidade oferecida.

Aos membros da **Comissão Examinadora**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

Ninguém vence sozinho... **MUITO OBRIGADA À TODOS!**

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

José de Alencar

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE UM COMPOSTO TRIAZENIDO COMPLEXADO COM ÍON OURO (I)

AUTORA: MELISE SILVEIRA NUNES

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

Santa Maria, 15 de maio de 2015.

O câncer representa uma das principais causas de óbito no mundo e esforços para descobrir terapias antineoplásicas mais eficazes têm conduzido à síntese de inúmeras moléculas. Outro grande desafio é o tratamento anti-infeccioso, pois apesar do grande arsenal de substâncias ativas disponíveis, muitas mostram-se ineficazes devido ao rápido aparecimento de estirpes bacterianas resistentes. Em razão disso, surge a necessidade da descoberta de novas substâncias ativas, com propriedades mais eficazes e direcionadas, tanto nos tratamentos de neoplasias como de resistência microbiana. Notoriamente, os compostos Triazenos (TZCs) vêm afirmando-se como uma classe promissora de metalofármacos com relevante atividade antimicrobiana e antiproliferativa. Além disso, a associação do radical farmacofórico TZC com íons metálicos, como o ouro, leva a um aumento significativo na atividade biológica. Em virtude dessa ampla versatilidade farmacológica, este estudo teve como objetivo a avaliação *in vitro* da atividade biológica de um composto TZC complexados com íon ouro (I). A atividade antibacteriana foi realizada pelo método convencional da microdiluição em caldo, através da técnica da concentração inibitória mínima (CIM), frente às cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), isolados clínicos com resistência a múltiplas drogas (RMD) e isolados clínicos produtores de biofilme. A citotoxicidade foi analisada através do ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT), frente às células da linhagem padrão K562 (Leucemia Mieloide Crônica). Os resultados obtidos demonstram que o composto em estudo apresentou estreito espectro de ação, sendo ativo somente frente aos microrganismos classificados como Gram positivos, além disso, mostrou-se ativo frente a todos os isolados produtores de biofilme, quando comparado às cepas não produtoras de biofilme. Também demonstrou notável atividade citotóxica, tendo a IC₅₀ 4.96 µM. Sendo assim, esses resultados demonstram uma alternativa para a concepção de uma nova classe de metalofármacos com atividade antibacteriana e antitumoral.

Palavras-chave: Triazenos. Íon ouro. Resistência bacteriana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Pos graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A COMPOUND TRIAZENIDE COMPLEXED WITH GOLD ION (I)

AUTHOR: MELISE SILVEIRA NUNES

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Santa Maria, May 15th, 2015

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. Another major challenge is the anti-infective treatment, because despite the large arsenal of active substances available, many show inefficiency due to the rapid emergence of resistant bacterial strains. As a result, arises the necessity of finding new active substances, more effective and targeted properties in both treatments of neoplasms as microbial resistance. Notably, the Triazenes compounds (TZCs) have been asserting itself as a promising class of metallodrugs with relevant antimicrobial and antiproliferative activity. Moreover, the association of pharmacophoric radical TZC with metal ions, such as gold, leads to a significant increase in biological activity. Because of this wide pharmacological versatility, this study aimed the evaluating *in vitro* of the biological activity of a compound TZC complexed with ion gold (I). The antibacterial activity was carried out by the conventional method of broth microdilution, through the technique of the minimum inhibitory concentration (MIC), against bacterial strains reference standard American Type Culture Collection (ATCC), clinical isolates with multidrug resistance (MDR) and clinical isolates biofilm producers. Cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay based on the reduction of bromide of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) against the standard cell line K562 (Chronic Myeloid Leukemia). The results obtained demonstrate that the compound in study present a narrow spectrum of action, being active only against microorganisms classified as Gram positive, moreover, proved to be active against all isolates producing biofilm when compared to non-producing strains of biofilm. Also showed remarkable cytotoxic activity, with IC₅₀ 4.96 µM. Thus, these results demonstrate an alternative to the design of a new class of antibacterial and antitumor metallodrugs with activity.

Keywords: Triazenes. Ion gold. Bacterial resistance. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação estrutural genérica de um triazeno..	17
Figura 2 -	Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Dacarbazina®.....	18
Figura 3 -	Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Temozolomida®.....	19

ARTIGO

Figura 1 -	Projeção estrutural do complexo {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro (I)} ..	32
------------	---	----

MANUSCRITO

Figura 1 -	Estrutura do complexo triazenídico de ouro (I): {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)}..	44
Figura 2 -	Projeção estrutural do complexo triazenídico de ouro (I). Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50 %. Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização.....	52
Figura 3 -	Projeção dos fragmentos envolvidos nas ligações de hidrogênio não-clássicas aromática C–H···Ph dos dímeros dos complexos C31–C36/C51'–C56'. [Código de simetria 1-x, 2-y, -z]. Os átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização do esquema. M = Ponto centroide do anel aromático	53
Figura 4 -	Projeção dos dímeros centrossimétricos do complexo, na direção cristalográfica do eixo <i>a</i> , formados por ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas C–H···M (onde M representa o ponto centróide do anel aromático C51'–C56'). Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização apresentado conteúdo parcial de cela. [Código de simetria ('): 1-x, 2-y, -z].	54
Figura 5 -	Projeção dos fragmentos envolvidos nas ligações de hidrogênio não-clássicas aromática C–H···Ph no complexo C41–C46/C51''–C56''. [Códigos de simetria (''): -1+x, y, z]. Os átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização do esquema. M = Ponto centroide do anel aromático..	55
Figura 6 -	Projeção do arranjo supramolecular do complexo, na direção cristalográfica do eixo <i>b</i> , formados por ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas C54–H54···M'' (onde M representa o ponto centróide do anel aromático C51''–C56''). Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização apresentado conteúdo parcial de cela. [Código de simetria ('): -1+x, y, z]	56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 - Perfil de atividade antibacteriana do composto {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)} frente às cepas ATCC e isolados bacterianos RMD	34
---	----

MANUSCRITO

Tabela 1 - Perfil de atividade antibacteriana do complexo TZC {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)} frente aos isolados de SCoN produtores de biofilme	47
Tabela 2 - Percentual de morte celular do complexo {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)} frente às células da linhagem K562	49
Tabela 3 - Dados da coleta de intensidade e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do complexo triazenídico de ouro (I)	51
Tabela 4 - Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas (C–H···Ph) dos dímeros do complexo	53
Tabela 5 - Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas (C–H···Ph) do arranjo 1-D do complexo	55

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Carta de aceite da Revista Cubana de Farmácia.....	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
Å	Ângstrom (10^{-10} m)
µg	Microgramas
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
<i>a b c</i>	Eixos Cristalográficos
$\alpha \beta \gamma$	Ângulo entre eixos cristalográficos
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Au	Ouro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTIC	Dacarboniza
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
g	Gramas
GN	Gram negativa
GP	Gram positiva
H	Hidrogênio
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mL	Mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Nitrogênio

NITriCo	Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos
nm	Nanômetros
O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ph	Grupamento Fenila
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RMD	Resistência a Múltiplas Drogas
RPMI	<i>Roswel Park Memorial Institute Medium</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SCoN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
TMZ	Temozolomida
TSA	Meio Ágar de soja e Trypticaseína
TZCs	Triazenos
U/mL	Unidades por mililitro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VRE	<i>Enterococcus</i> sp. Vancomicina Resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Compostos triazenos.....	17
1.2 Íon ouro	20
1.3 Câncer e aspectos relevantes sobre as leucemias.....	22
1.4 Resistência bacteriana.....	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo principal.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	28
4.1 ARTIGO - Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos.....	29
RESUMO	30
RESUMEN	30
INTRODUÇÃO	31
MÉTODOS	32
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO.....	36
AGRADECIMENTOS	37
REFERÊNCIAS	37
4.2 MANUSCRITO - Síntese e avaliação da atividade biológica de um composto triazeno complexado com íon ouro (I) frente às células de leucemia mieloide crônica e microrganismos produtores de biofilme.....	40
RESUMO	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO.....	56
AGRADECIMENTOS	56
REFERÊNCIAS	57

5 DISCUSSÃO GERAL	60
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A descoberta e a utilização de fármacos para o tratamento das neoplasias e atividade antibacteriana é considerada uma das maiores contribuições para a humanidade, permitindo o controle e cura dessas doenças (CALIXTO; JUNIOR, 2008). Nos tempos atuais, essas patologias têm demonstrado elevada resistência aos fármacos disponíveis, motivando o grande interesse na obtenção de novos fármacos, mais eficientes e direcionados para esses tratamentos (KUMAR et al., 2014; SIDORYK et al., 2014).

O câncer é uma doença neoplásica que atinge milhões de pessoas no mundo, causando danos devastadores em todas as classes sociais. Com o passar dos anos as doenças neoplásicas tornaram-se um problema de saúde pública mundial. Apesar dos avanços na terapia antineoplásica, para muitos pacientes as opções terapêuticas ainda são limitadas (YAP; WORKMAN, 2012). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que no ano de 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos incidentes de câncer e 13,2 milhões de mortes no mundo. No Brasil, as estimativas este ano são de aproximadamente 576 mil novos casos, sendo que 3,3 % serão de diagnósticos de leucemias (BRASIL, 2014).

Além dos antineoplásicos, outro grande desafio é o tratamento anti-infeccioso, pois apesar do grande arsenal de substâncias ativas disponíveis, muitas dessas mostram-se ineficazes tornando a resistência bacteriana uma preocupação ainda maior (DOMINGUES et al., 2010). Reforçando a magnitude do problema, recentemente a OMS divulgou estudo no qual relata que a resistência aos antimicrobianos é uma ameaça global à saúde pública, pois estamos nos aproximando de uma era pós-antibiótica em que pessoas morrerão de simples infecções (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). O uso indiscriminado desses antimicrobianos em terapias empíricas tem sido o grande contribuinte para o aumento da resistência (OLIVEIRA et al., 2013). Embora novos fármacos estejam em desenvolvimento, nenhuma nova classe de antimicrobianos foi descoberta para uso clínico nos últimos anos (CHOPRA, 2013).

Devido ao aumento dessas doenças e a carência de novas terapias, a necessidade por medicamentos inovadores torna-se urgente. Os compostos triazenos (TZCs) demonstram ser uma classe promissora de fármacos potencialmente ativos. Tais compostos caracterizam-se pelo grupo diazoamina (N=N-N) (MOORE; ROBINSON, 1986), responsável por suas propriedades biológicas (MARCHESI et al., 2007).

Compostos TZCs possuem ampla versatilidade farmacológica, tais como atividades antibacteriana (HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al., 2010; OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI, 2012; PARAGINSKI et al., 2014), antifúngica (OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI, 2012), antileucêmica (MATHESON et al., 2004; DOMINGUES et al., 2010; BONMASSAR et al., 2013) e de nuclease sintética (DOMINGUES et al., 2010). A associação do radical farmacofórico TZC com íons metálicos que possuem atividade biológica como íon ouro pode produzir moléculas mais ativas e estáveis (SREEDHARA; COWAN, 2001). Além disso, a toxicidade relativamente baixa da família do ouro permite o consumo humano de fármacos com esse elemento (ABDOU et al., 2009; CUI et al., 2012).

1.1 Compostos triazenos

O primeiro composto TZC, 1,3-bis(fenil)-triazeno surgiu no ano de 1859, sintetizado por Peter Griess (MOORE; ROBINSON, 1986). Esses compostos resultam do acoplamento de um sal de diazônio com uma amina aromática livre. São espécimes pertencentes à família dos sistemas nitrogenados de cadeia aberta, que identificam-se por conterem uma cadeia alifática constituída de três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N), grupo diazoamina (Figura 1) (NIFONTOV; BEL'SKAYA; SHTOKAREVA, 1994).

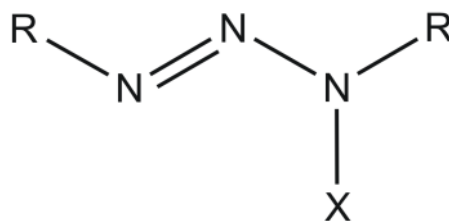


Figura 1 - Representação estrutural genérica de um triazeno.
Fonte: Adaptado de FREITAS (2012).

O grupo diazoamina é a fração ativa dessas moléculas, responsável pelas propriedades biológicas (MARCHESI et al., 2007). Seu mecanismo de ação citotóxica ocorre através da

metilação da posição O⁶ da base guanina do DNA, mediada pelo íon metildiazônio (CH₃N⁺N), um derivado altamente reativo desses compostos. Devido a isso, a guanina perde a capacidade de se ligar à citosina, gerando um par de bases incorreto, pois a guanina metilada liga-se preferencialmente à timina, desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que conduzem ao bloqueio do ciclo celular e apoptose (MARCHESI et al., 2007).

Tais compostos têm sido estudados há mais de um século, devido ao interesse estrutural e sua potencial aplicação biológica (DOMINGUES et al., 2010). Sendo que a Dacarbazina[®] 5-(3,3 dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxiamida (DTIC) (Figura 2), foi o primeiro TZC a apresentar atividade biológica comprovada, sendo datada em 1962, por Shealy e colaboradores (SHEALY; KRAUTH; MONTGOMERY, 1962). A DTIC é considerada um antineoplásico de referência, indicado no tratamento de melanoma maligno metastático, além disso, é indicada na doença de Hodgkin como uma terapia de segunda linha quando em combinação com outros agentes eficazes (D'INCALCI; SOUTEYRAND, 2001). Ela é considerada um pró-fármaco, pois exige ativação inicial pelo citocromo P-450, através de uma reação de N-desmetilação que ocorre no fígado, formando o seu metabolito ativo 5-(3-Monometil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) (TSANG et al., 1991).

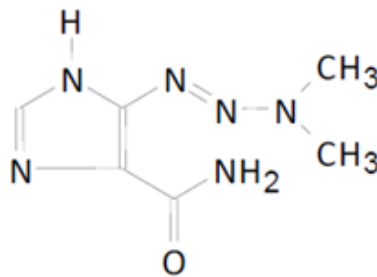


Figura 2 - Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Dacarbazina[®].
Fonte: Adaptado de ADIBI et al. (2013).

Após a descoberta da DTIC, novas pesquisas foram desencadeadas, levando ao surgimento de novos compostos TZCs biologicamente ativos, a exemplo do Temozolomida[®] (TMZ) 3-metil-4-oxo3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,4,5]tetrazina-8-carboxamina, (Figura 3), um agente antineoplásico derivado da DTIC (FREITAS, 2012). Ao contrario da DTIC, após a ingestão, o TMZ é convertido no seu metabolito ativo, sem necessidade de

desmetilação enzimática por hidrólise no fígado, sendo o medicamento de primeira linha no tratamento de gliomas de alto grau (PARISI et al., 2014).

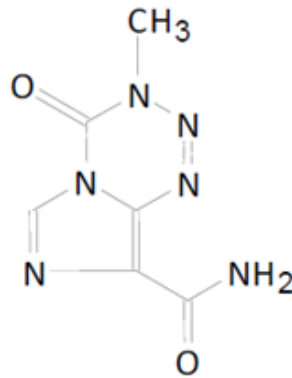


Figura 3 - Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Temozolomida®.
Fonte: Adaptado de ADIBI et al. (2013).

Os TZCs são alvo de muitas pesquisas científicas uma vez que alterando a sua estrutura química, os derivados podem adquirir diferentes propriedades, entre elas: atividade antimicrobiana (HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al., 2010; OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI, 2012; PARAGINSKI et al., 2014), antifúngica (OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI, 2012), mutagênica e carcinogênica (MATHESON et al., 2004; DOMINGUES et al., 2010; BONMASSAR et al., 2013) e de nuclease sintética (DOMINGUES et al., 2010). Uma estratégia é complexá-los com íons metálicos, como ouro, platina, cobre, entre outros, no intuito de aumentar a sua atividade biológica (SREEDHARA; COWAN, 2001). Segundo Paraginski e colaboradores (2014), a obtenção de compostos TZCs contendo íons metálicos, como ouro (I) pode fornecer potente atividade antibacteriana (PARAGINSKI et al., 2014).

Apesar da necessidade de maior investigação na utilização de TZCs nas leucemias e resistência bacteriana, alguns estudos comprovam que eles possuem atividade antineoplásica e antimicrobiana. Esses possuem atividade relatada desde 1966 frente a *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei* (SHEALY et al., 1966). Entre os anos de 2005 e 2007, uma série de compostos TZCs foram sintetizados, com uma estrutura semelhante aos antibióticos aminoglicosídeos, sendo

evidenciado que estes foram capazes de inibir a tradução bacteriana (ZHOU et al., 2005; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2007).

Domingues e colaboradores relataram a atividade de alguns compostos TZCs inéditos frente às células de leucemia mieloide crônica, evidenciando que tanto DTIC quanto três compostos TZCs inéditos apresentaram pronunciada atividade citotóxica. Neste mesmo estudo, foi avaliada a atividade antibacteriana desses compostos, sendo observada elevada atividade antimicrobiana (DOMINGUES et al., 2010). Hörner e colaboradores em estudo envolvendo quinze TZCs inéditos evidenciaram que doze desses compostos apresentaram potencial atividade antibacteriana frente às bactérias Gram positivas (GP) e Gram negativas (GN) (HÖRNER et al., 2008). Estudos sugerem que o mecanismo de ação antibacteriana dos TZCs ocorre devido à atividade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular das bactérias, dificultando sua síntese e conduzindo à morte celular (HÖRNER et al., 2008; OMBAKA; MUGUNA; GICHUMBI, 2012).

Em um estudo recente compostos TZCs foram testados *in vitro* frente às linhagens celulares cancerosas, incluindo a leucemia mieloide crônica, demonstrando propriedades antiproliferativas, sugerindo investigações mais profundas quanto ao seu potencial antitumoral (ADIBI et al., 2013). Segundo Bonmassar e colaboradores, os compostos TZCs apresentam grande potencial frente às células de pacientes leucêmicos (BONMASSAR et al., 2013).

1.2 Íon ouro

O ouro foi um dos primeiros metais a serem descobertos pela humanidade, sendo considerado até hoje o mais nobre dos elementos químicos, desempenhando um papel importante na medicina desde os tempos antigos (BERTRAND; CASINI, 2014). Os primeiros estudos utilizando esse elemento surgiram no final do século XIX por Robert Koch, quando este observou os efeitos bacteriostáticos do cianeto de ouro frente ao bacilo da tuberculose (SUTTON, 1986). Já Forestier em 1935, relatou um estudo de seis anos, no qual foi possível observar que sais de ouro foram capazes de retardar a evolução da artrite reumatoide (FORESTIER, 1935). Em um grande estudo realizado em 1960, utilizando duzentos pacientes com essa doença, foi observado que a terapia com esse íon, proporcionou melhorias nas condições clínicas (HART; FANING, 1960).

Atualmente compostos dessa natureza são uma alternativa para o tratamento da artrite reumatoide, visando reduzir a inflamação e a progressão da doença. Dentre os medicamentos antirreumáticos contendo íon ouro, o complexo lipofílico conhecido como Auranofina® é de fundamental importância, uma vez que pode ser administrado por via oral (SILVA et al., 2003). Na década de 80, estudos observaram que a Auranofina® foi capaz de aumentar o período de vida de ratos portadores de leucemia (SIMON et al., 1981; MIRABELLI et al., 1985). Compostos organometálicos de ouro ocupam um lugar importante na química medicinal, sendo essas pesquisas determinantes para desencadear um enorme interesse na comunidade científica, por novos complexos desse metal, visando a sua aplicação na terapia antitumoral (BERTRAND; CASINI, 2014), artrite reumatoide, doenças virais e parasitárias (PRICE; FILIPOVSKA, 2011).

A exploração do potencial antitumoral desses compostos é um fenômeno relativamente recente. Na prática clínica as drogas ligadas ao íon ouro têm sido especialmente estudadas em sistemas de células cultivadas, nas quais é possível avaliar o seu potencial citotóxico (GOUVEA et al., 2012; BERTRAND; CASINI, 2014).

Além da atividade antitumoral, estudos utilizando o íon ouro têm sido investigados frente a vários microrganismos. Pesquisadores relatam promissoras propriedades antibacterianas de diferentes compostos contendo esse metal (FIORI et al., 2011; CUI et al., 2012). Em um estudo utilizando nanopartículas de ouro frente às bactérias GN multirresistentes, foi possível observar que estas exercem atividade antibacteriana, alterando o potencial de membrana e diminuindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP), causando um declínio geral no metabolismo bacteriano (CUI et al., 2012).

Apesar de sua utilização na clínica ainda ser limitada, compostos contendo esse íon são uma classe de metalofármacos com alto potencial biológico, sendo que evidências experimentais sugerem que os efeitos antiproliferativos ocorrem a partir de mecanismos de ação inovadores (BERTRAND; CASINI, 2014). Como exemplo podemos citar a inibição da enzima tioredoxina redutase, a qual é fundamental para sobrevivência celular (BINDOLI et al., 2009). A toxicidade relativamente baixa da família do ouro permite o consumo humano de fármacos contendo esse elemento (ABDOU et al., 2009), além disso, uma descoberta surpreendente mostrou que nanopartículas com esse metal, não induzem qualquer processo relacionado com a formação de radicais livres (CUI et al., 2012).

1.3 Câncer e aspectos relevantes sobre as leucemias

O câncer é um conjunto de doenças neoplásicas, tendo em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. As neoplasias são responsáveis pela morte de uma a cada oito pessoas no mundo. As principais causas de seu desenvolvimento estão relacionadas com fatores externos (tabaco, microrganismos, produtos químicos e radiação) e fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações decorrentes do metabolismo) (BRASIL, 2014).

O tratamento pode ser realizado por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, transplante de medula óssea, entre outras (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Apesar dos avanços na terapia antineoplásica, para muitos pacientes as opções terapêuticas ainda são limitadas (YAP; WORKMAN, 2012), sendo que grande parte dos fármacos não possui especificidade, causando lesões irreparáveis nas células normais (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007; HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012).

Dentre as neoplasias, a leucemia é um tipo de câncer que acomete os leucócitos, desenvolvidos dentro da medula óssea e responsáveis por grande parte do sistema imunológico. Essa neoplasia é caracterizada pela proliferação descontrolada de células do sistema hematopoiético (HAMERSCHLAK, 2012). Estimativas indicam a ocorrência de 9370 casos de leucemia no Brasil, neste ano, sendo 5050 casos em homens e 4320 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,20 casos novos para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2014).

A leucemia se subdivide em dois grandes grupos, a primeira divisão está em suas formas agudas e crônicas. A leucemia aguda se caracteriza por um aumento rápido nos números de células imaturas do sangue, fazendo com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis. Já a sua forma crônica caracteriza-se pelo aumento excessivo no número de células maduras anormais da série branca do sangue, esse aumento de células não impede a produção de células normais, levando meses ou até anos para a progressão da doença (ABRALE, 2011; BRASIL, 2014;).

A segunda divisão diz respeito ao tipo de célula afetado pelas alterações, sendo assim caracterizada como do tipo linfóide, quando surge nos linfoblastos ou mieloide, quando tem origem nas células granulocíticas e monocíticas (ABRALE, 2011; BRASIL, 2014). Assim as leucemias são classificadas em leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC)

(HAMERSCHLAK, 2012; BRASIL, 2014).

Dentre as leucemias, a LMC foi a primeira doença neoplásica em que se caracterizou uma alteração genética adquirida, chamado de cromossomo *Philadelphia* (Ph). Essa alteração decorre da translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, t(9;22)(q34; q11.2), resultando no gene anormal *BCR-ABL* (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008; CHAUFFAILLE; BANDEIRA; SILVA, 2014). Esse oncogene codifica a produção de uma proteína quimérica com atividade de tirosino quinase elevada, a qual está diretamente relacionada com a patogênese da LMC (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008). Essa atinge principalmente adultos, diferindo da LMA, que acomete todas as faixas etárias. Já a LLA é mais comum em crianças e adolescentes, enquanto a LLC geralmente afeta adultos com idade acima de 50 anos e praticamente não ocorre em crianças (HAMERSCHLAK, 2012).

Normalmente o diagnóstico das leucemias é realizado através da clínica do paciente, sendo os principais sinais e sintomas clínicos a astenia, palidez, infecções, dores nos ossos, febre e hemorragias. Outros parâmetros de diagnóstico são a análise microscópica do sangue e medula óssea, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

1.4 Resistência bacteriana

A descoberta dos antibióticos revolucionou a história da medicina em vários aspectos. Desde então, estes fármacos têm contribuído para diminuir o número de mortes por infecções bacterianas em todo o mundo (SILVER, 2011; CHOPRA, 2013). A penicilina foi o primeiro antibiótico para uso clínico, descoberto em 1928 por Alexandre Fleming, biólogo e farmacologista escocês. No entanto, em 1940, Abraham e Chain, um ano antes da primeira publicação sobre o uso clínico da penicilina, demonstraram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, à qual denominaram penicilinase (DAVIES; DAVIES, 2010).

Após o surgimento da penicilina, foram desenvolvidas novas classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos (1944), tetraciclina (1945), cefalosporinas (1948), macrolídeos (1949), glicopeptídeos (1956), quinolonas (1961) e carbapenênicos (1976) durante a chamada “era de ouro” da descoberta de fármacos antibacterianos (SILVER, 2011). Infelizmente, a introdução destes agentes antimicrobianos na prática clínica sempre foi

acompanhada pelo rápido aparecimento de estirpes bacterianas resistentes, que ameaçam todas as áreas da prática médica, pondo em risco a saúde, aumentando a mortalidade e conferindo elevados custos à sociedade (LEUNG et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Ao longo dos anos, inúmeros estudos tem demonstrado que o aumento do consumo de antibióticos contribui para o surgimento da resistência antimicrobiana. Alguns exemplos de ligação entre o uso de antibióticos e desenvolvimento de resistência são o aumento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* sp. vancomicina . resistente (VRE). O aparecimento inicial do MRSA foi em 1960, enquanto que os primeiros isolados de VRE ocorreram há cerca de 20 anos (ALLEN et al., 2010).

Patógenos multirresistentes, incluindo bactérias GP e GN, estão espalhando-se numa velocidade exacerbada, preocupando os profissionais da saúde (BRASIL, 2010). Algumas bactérias GN, em especial *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* desenvolveram resistência à maioria ou a todos os antibióticos disponíveis (THEURETZBACHER, 2013). Um estudo realizado na África entre 1955 e 2008 demonstrou que as taxas de resistência são alarmantes para quase todos os patógenos (VLIEGHE et al., 2009). O biofilme bacteriano está entre os principais fatores de virulência desenvolvidos pelas bactérias, comumente associado às infecções crônicas, pois resistem aos sistemas de defesa do hospedeiro, bem como, apresentam maior tolerância aos antibióticos e desinfetantes químicos (HØIBY et al., 2010).

A resistência aos antibióticos foi evoluindo como uma resposta natural das bactérias à exposição a estes fármacos, e pode ser definida pela capacidade de resistir às concentrações clínicas recomendadas. É dividida em resistência intrínseca e adquirida (HAWKEY, 1998; PINA, 2012).

A resistência intrínseca ocorre naturalmente e é uma característica de toda a espécie. Já a resistência adquirida ocorre através de mutações espontâneas, que surgem naturalmente durante o crescimento bacteriano e/ou aquisição de ácido desoxirribonucleico (DNA) exógeno, por transferência de genes de organismos resistentes para os sensíveis. Sendo por isso a mais preocupante, devido à possibilidade de disseminação dos genes de resistência. Além disso, existem quatro mecanismos que conferem essas resistências, sendo eles: alteração da permeabilidade da membrana externa, alterações do sitio de ação do antimicrobiano, bomba de efluxo e mecanismo enzimático (HAWKEY, 1998; PINA, 2012).

Estudo recente da OMS analisou dados de 114 países e relatou que a resistência bacteriana frente aos antibióticos está ocorrendo em todo o mundo, incluindo no Brasil. Esse fato se torna uma ameaça global à saúde pública, a passos curtos para uma era pós-antibiótica

em que pessoas morrerão de simples infecções. No entanto, novos antibióticos devem ser desenvolvidos, enquanto governos e indivíduos devem tomar medidas para cercear o processo de resistência das bactérias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Se novas classes de antimicrobianos não forem descobertos, há uma grande possibilidade de voltarmos à era pré-antibiótica (CHOPRA, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o aumento das doenças neoplásicas e a dificuldade no seu tratamento, além da crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos existentes, torna-se necessário a busca por novos compostos com capacidade mais seletiva e eficaz para essas doenças. Devido às diversas propriedades demonstradas pelos TZCs, bem como pelos complexos organometálicos, nosso grupo de pesquisa tem investido na síntese e avaliação da atividade biológica de compostos TZCs complexados com íons metálicos, no intuito de descobrir novas moléculas potencialmente ativas para uso clínico.

3 OBJETIVOS

Para a realização deste trabalho foram executadas diversas atividades e avaliações. Este capítulo está dividido nos seguintes itens: objetivo geral e objetivos específicos.

3.1 Objetivo principal

Avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica *in vitro* de um composto TZC complexado com íon ouro no estado de oxidação I, sintetizado e caracterizado pelo Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* do complexo {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} frente a diferentes cepas bacterianas padrão referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência a múltiplas drogas (RMD), provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do complexo {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} frente a isolados bacterianos de *Staphylococcus coagulase negativa* (SCoN) identificados como produtores de biofilme, obtidos de uma pesquisa que investigou a contaminação em concentrados plaquetários;
- Verificar os efeitos antiproliferativos *in vitro* do complexo {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} frente às células da linhagem padrão K562 de LMC, utilizando o ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Para a apresentação dos resultados da dissertação de mestrado, optou-se pelo formato de publicações científicas, o que é permitido institucionalmente, conforme o Manual de Estrutura de Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses (MDT) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2012). Considerando os aspectos estruturais de uma dissertação, serão apresentados um artigo e um manuscrito que foram elaborados a partir dos resultados da pesquisa como requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

O Artigo, intitulado **“Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos”**, foi aceito para publicação na Revista Cubana de Farmácia (ISSN: 0034-7515) em 7 de março de 2014.

O Manuscrito, intitulado **“Síntese e avaliação da atividade biológica de um composto triazeno complexado com íon ouro (I) frente às células de leucemia mieloide crônica e microrganismos produtores de biofilme”**, foi redigido de acordo com as normas de publicação do periódico Biometals (ISSN: 0966-0844). Após apreciação da banca examinadora, o manuscrito será finalizado, traduzido para o idioma exigido (inglês) e submetido para avaliação dos editores e revisores do periódico.

4.1 ARTIGO

Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos

Actividad antibacteriana de un triazenido compuesto de oro frente las cepas bacterianas y los aislados clínicos

MELISE SILVEIRA NUNES¹, LITIÉRRRI RAZIA GARZON¹, ROSIÉLI MARTINI²,
ROBERTA FILIPINI RAMPELOTTO¹, ALINE LOCATELLI³, ROSMARI HÖRNER^{4*},
MANFREDO HÖRNER⁵.

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Brasil (BR).

²Doutoranda do PPGCF, UFSM, SM, RS, BR.

³Professora Doutora em Química, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo fundo (PF), RS, BR.

^{4*}Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM, SM, RS, BR.

⁵Professor Titular do Departamento de Química, UFSM, SM, RS, BR.

RESUMO: Introdução: De uma forma alarmante, estudos demonstraram que nos últimos anos ocorreu um grande aumento na resistência bacteriana frente aos antibióticos. Conseqüentemente, há uma grande necessidade de descoberta de novas substâncias ativas, e entre essas, os compostos Triazenos (TZCs) vêm afirmando-se como uma classe promissora de metalofármacos, com significativa atividade antimicrobiana. Além do mais, a associação do radical farmacofórico TZC com metais, como o ouro, favorece a produção de moléculas com maior atividade biológica. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do composto TZC inédito complexado com ouro no estado de oxidação I {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)}, frente a cepas bacterianas padrões de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência a múltiplas drogas (RMD). **Métodos:** A atividade antibacteriana do composto TZC foi determinada através do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM), baseado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2012. A CIM foi caracterizada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição. **Resultados:** O composto em estudo apresentou pronunciada atividade antibacteriana, sendo ativo em 43,4% (10/23) das bactérias testadas, mostrando-se seletivo frente a cepas Gram positivas (GP). **Conclusão:** O complexo TZC apresentou estreito espectro de ação, sendo ativo somente frente aos microrganismos classificados como GP, demonstrando assim uma alternativa para a concepção de uma nova classe de metalofármacos com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Triazenos, Atividade Antibacteriana, Ouro, Resistência.

RESUMEN: Introducción: En una manera alarmante, los estudios han demostrado que en los últimos años hubo un gran aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Por consiguiente, hay una gran necesidad para el descubrimiento de nuevas sustancias activas, y entre estos, los compuestos triazenos (TZCs) se muestran como una clase prometedora de metalodrugs con actividad antimicrobiana significativa. Por otra parte, la asociación de TZC farmacóforo radical con metales como el oro favoreciendo la producción de moléculas con actividad biológica superior. **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del compuesto sin precedentes TZC complejo con oro en el estado en que la oxidación I {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)}, en contra de las cepas de las normas bacterianas cepas de referencia *American Type Culture Collection* (ATCC) y aislados clínicos con resistencia múltiple a los medicamentos (RMD). **Métodos:** La actividad antibacteriana de la TZC compuesto se determinó por el método de la Concentración

Inibitória Mínima (MIC), sobre a base de *Estándares Clínicos y de Laboratorio* (CLSI), de 2012. El MIC se caracteriza visualmente como la menor concentración que inhibió completamente el crecimiento de microorganismos en los pocillos de dilución. **Resultados:** El compuesto de ensayo mostró actividad antibacteriana pronunciado, siendo activo en 43,4% (10/23) de las bacterias ensayadas, siendo selectiva contra las cepas Gram positivos (GP). **Conclusión:** El complejo TZC mostró estrecho espectro de acción, siendo activo sólo frente a los microorganismos clasificados como GP, demostrando una alternativa para el concepción de una nueva clase de metallodrugs con actividad antibacteriana.

Palabras clave: Triazenos, Actividad antibacteriana, Oro, Resistencia.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos em terapias empíricas tem sido o grande contribuinte para o aumento da resistência bacteriana, diminuindo assim o arsenal de drogas disponíveis.¹ Embora novos fármacos encontrem-se em desenvolvimento, de acordo com a literatura nenhuma nova classe de antimicrobianos foi descoberta nos últimos anos.² A busca por novos fármacos tem sido uma importante meta da química medicinal, principalmente por fármacos inovadores, que possam ser mais eficientes para o tratamento das infecções, com novos mecanismos de ação e que não sejam reconhecidos pelas bactérias.³ Em razão disso, os compostos triazenos (TCZs) são descritos como uma classe de substâncias químicas com promissora atividade antibacteriana.^{4,6}

Os TCZs constituem uma classe de compostos caracterizados pela presença do grupo triazenídico, que contém uma cadeia alifática com três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N).⁵ Compostos desta classe são capazes de interagir com a molécula de Ácido Desoxirribonucléico (DNA), conferindo diferentes propriedades biológicas já comprovadas, tais como antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, citotóxicas e de nuclease química através da clivagem do DNA.^{4,6,7} Além do mais, possuem atividade antimicrobiana relatada desde 1966 contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei*.⁸

Ao associar o radical farmacofórico TZC com metais que possuem atividade biológica como o ouro, pode-se ampliar a atividade biológica, na medida em que muitas metalodrogas

imitam a função biológica das enzimas humanas clivando, dessa forma, o DNA sob condições fisiológicas.⁹

Em vista disso, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo *in vitro*, avaliando a atividade antibacteriana de um composto TZC inédito complexado com ouro, frente a cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência a múltiplas drogas (RMD), obtidos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MÉTODOS

a) Complexo triazeno

O composto triazeno complexado com ouro no estado de oxidação I {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} (Figura1), foi previamente sintetizado e caracterizado no Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

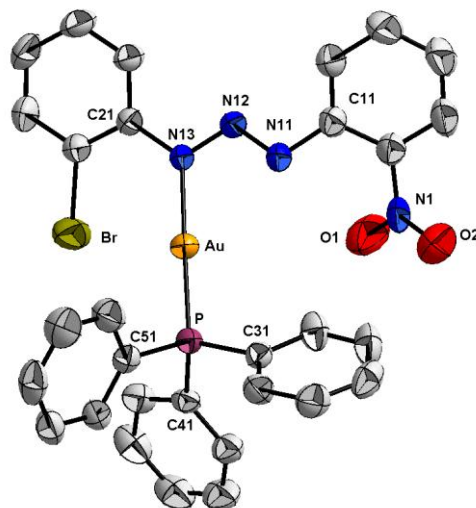


Figura 1 - Projeção estrutural do complexo {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro (I)}.

Fonte: Tese Aline Locatelli 2012 UFSM

b) Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* do composto TZC foi avaliada frente a 12 cepas bacterianas ATCC, sendo elas Gram negativas (GN): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. Gram positivas (GP): *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.

Também foram avaliados 11 isolados clínicos RMD, obtidos no Laboratório de Microbiologia do HUSM, sendo eles, GN: *Acinetobacter baumannii* RMD 34, *A. baumannii* RMD 47, *E. coli* RMD 329, *K. pneumoniae* RMD 806, *K. pneumoniae* RMD 983 e *P. aeruginosa* RMD 64. GP: *S. aureus* RMD 27, *S. aureus* RMD 28, *S. aureus* RMD 31, *S. epidermidis* RMD 27, *S. epidermidis* RMD 102.

c) Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A ativação das bactérias desse estudo foi realizada utilizando o meio ágar de soja e tripticaseína (TSA), por 24 horas (h) a 35 ± 2 °C. A atividade antibacteriana do composto TZC foi determinada através do método de microdiluição em caldo, baseado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2012.¹⁰ O composto estudado foi diluído em etanol e água (1:1) na concentração 2560 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. As placas contendo os microrganismos e o composto foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

d) Conceitos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 0169.0.243.000-08.

RESULTADOS

Dentre o total de cepas e isolados bacterianos testados, 10 de 23 (43,48 %) apresentaram valores significativos de CIM, apenas em bactérias GP (Tabela 1). Analisando os resultados obtidos para o gênero *Staphylococcus*, 7 das 9 cepas (77,78 %) apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que o melhor potencial antibacteriano do composto em estudo foi evidenciado frente ao isolado RMD de *S. aureus* 27 com valor de CIM de 16 µg/mL.

A cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, apresentou pronunciada atividade, possuindo uma CIM de 32 µg/mL. O composto mostrou concordância frente às três cepas de *S. epidermidis*, tendo valor de CIM de 64 µg/mL, sendo uma ATCC e duas RMD. O composto também foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *B. cereus* ATCC 14579, *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. saprophyticus* ATCC 15305, com valor de CIM de 64 µg/mL. Para os demais, o composto obteve valores de CIM > 128 µg/mL.

Tabela 1 - Perfil de atividade antibacteriana do composto {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro (I) , frente às cepas ATCC e isolados bacterianos RMD.

Cepas ATCC e Isolados Bacterianos RMD	CIM (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	64
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	32
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	64
<i>Staphylococcus aureus</i> RDM 27	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RDM 27	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RDM 102	64

DISCUSSÃO

O composto TZC em estudo demonstrou estreito espectro de ação, entretanto, apresentou pronunciada atividade antibacteriana frente a bactérias GP, em cepas ATCC e isolados RMD, registrando valores de CIM entre 16 - 64 µg/mL. Esses resultados podem ser explicados devido à diferença na estrutura da parede celular das bactérias GP, as quais possuem uma estrutura celular menos complexa, composta de espessa camada de peptidoglicano. Como as bactérias GP necessitam do peptidoglicano para sua proteção e manutenção da pressão osmótica, os resultados podem estar relacionados com a inibição da síntese do mesmo, conduzindo assim à morte celular.¹¹ Barreiro e colaboradores relatam que o metal ouro age inibindo a proliferação bacteriana, ocasionando o bloqueio da citocinese celular.¹²

O composto em estudo mostrou-se mais efetivo frente o isolado clínico designado como *S. aureus* RMD 27. Resultados relevantes, visto que esse isolado trata-se de um *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), gene *mecA* positivo e que apresentou sensibilidade somente a daptomicina, linezolida e vancomicina, antimicrobianos de uso intravenoso. Sem dúvida, esse é o patógeno mais importante entre os *Staphylococcus*, caracterizado como causador de uma variedade de processos infecciosos, que incluem desde infecções cutâneas benignas até doenças potencialmente fatais.¹³ Em um estudo realizado com a finalidade de comparação de compostos análogos com prata e ouro evidenciou-se que o ouro, geralmente apresenta melhor atividade do que os análogos da prata, principalmente frente ao *S. aureus*.¹² Além disso, outra pesquisa também efetuada em 2012, utilizando o metal ouro complexado com rimantadina, demonstrou a capacidade desse composto em inibir o *S. aureus*, relatando valores de CIM entre 6.25 - 100 µg/mL.¹⁴

Em relação à espécie de *S. epidermidis* o composto apresentou-se eficaz frente a todas às cepas e isolados testados, tendo extrema relevância, uma vez que os isolados multirresistentes foram oriundos da corrente sanguínea de pacientes internados no HUSM. Esses isolados tratavam-se de *S. epidermidis* meticilina resistente, genes *mecA* e *icaD* positivos. Além disso, apresentou sensibilidade apenas a vancomicina, clindamicina, tigeciclina e teicoplanina. Resultados semelhantes foram encontrados por Hörner e colaboradores, que estudaram 15 compostos TZC e um deles apresentou resultado semelhante ao encontrado em nossa análise, demonstrando eficácia frente a dois isolados de *S. epidermidis* RMD.⁴ Roymahapatra e colaboradores, em sua pesquisa com complexos de ouro

com pirazina, evidenciaram que esses compostos quando associados ao ouro, são capazes de inibir a formação de biofilme em bactérias GP, em razão da possibilidade de um aumento na permeabilidade da membrana celular bacteriana.¹⁵

Em relação à atividade frente ao *B. cereus*, dados semelhantes ao nosso foram reportados em uma pesquisa realizada em 2010, no qual averiguaram compostos TZC e destacaram uma melhor atividade antibacteriana frente à cepa de *B. cereus*, com CIM de 32 µg/mL.⁷ Esse microrganismo tem sua patogenicidade relacionada às infecções alimentares, ou até mesmo infecções cutâneas acompanhadas de bacteremia, septicemia entre outras.¹⁶

O gênero *Enterococcus* também se mostrou susceptível ao composto TZC do nosso estudo, dentre duas cepas de *E. faecalis* testadas, ambas apresentaram valores significativos de atividade antimicrobiana, sendo que uma delas com CIM de 32 µg/mL. Esses resultados são de extrema importância, pois as bactérias testadas tratam-se de *Enterococcus* sp. vancomicina resistente (VRE), importante patógeno que vem sendo isolado com elevada frequência nos hospitais. Pesquisas demonstram a alta incidência de isolamento de bactérias caracterizadas como VRE, uma análise realizada no Hospital Universitário de Uberaba, em Minas Gerais, constatou que as duas cepas de *E. faecalis* isoladas expressaram alto nível de resistência à vancomicina, com CIM > 256 µg/mL.¹⁷ Nossos resultados são semelhantes ao estudo efetuado por Yeo e colaboradores em 2013, no qual relataram que três dos compostos trifetilfosfina ouro, foram capazes de inibir a cepa de *E. faecalis* testada.¹¹

Sugere-se que compostos TZCs, como o desse estudo, atuam como quelantes, inibindo etapas da síntese bacteriana^{4,11} e clivando o DNA,⁸ conduzindo assim a morte celular. Além disso, a toxicidade relativamente baixa da família do ouro permite que fármacos com esse elemento sejam utilizados para consumo humano.¹⁸

CONCLUSÃO

O composto TZC complexado com o metal ouro mostrou-se seletivo e com espectro de ação reduzido, sendo ativo frente a cepas e isolados GP, demonstrando ser uma alternativa na concepção para nova classe de metalofármacos com atividade antibacteriana. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados, para a avaliação de outros parâmetros biológicos, bem como a sua toxicidade e a eficácia terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar sua gratidão a CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Azevedo CP, Silva JD. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. Rev Multidiscip Saúde. 2012;4(7):2-17.
2. Chopra, I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. J Antimicrob Chemother. 2013;68:496-505.DOI:10.1093/jac/dks436.
3. Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP, et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburanacearensis* A. C. Smith and *Anadenantheramacrocarpa* (Benth.) Brenan. Biomed Res Int. 2013;1-5.
4. Hörner M, Giglio VF, Santos AJRWAS, Westphalen AB, Iglesias BA, Martins PB, et al. Triazeno e atividade antibacteriana. Rev Bras Ciênc Farm. 2008;44(3):441-449.
5. Moore DS, Robinson SD. Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. Adv Inorg Chem. 1986;30:1-68.
6. Bonmassar L, Marchesi F, Pascale E, Franzese O, Margison GP, Bianchi A. et al. Triazene Compounds in the Treatment of acute Myeloid Leukemia : a Short Review and a Rase report. Curr Med Chem. 2013;19:2389-2401.
7. Domingues VO, Hörner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN, et al. *In vitro* evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. J Braz Chem Soc. 2010;21(12):2226-2237.

8. Shealy YF, Krauth CA, Pittillo RF, Hunt DE. A new antifungal and antibacterial agent, methyl 5(or4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4(or 5)-carboxylate. *J Pharm Sci.* 1966;56(1):147-148. DOI:10.1002/jps.2600560133.
9. Sreedhara A, Cowan JA. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J Biol Inorg Chem.* 2001;6(4):337-347. DOI:10.1007/s007750100209.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart – Ninth Edition.* CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2012.
11. Yeo CY, Sim JH, Khoo CH, Goh ZJ, Ang KP, Cheah YK et al. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphanegold(O-alkylthiocarbamates), Ph₃PAu[SC(OR)=N(p-tolyl)] (R=Me, Et and iPr). *Gold Bull.* 2013;46:145–152. DOI:10.1007/s13404-013-0091-z.
12. Barreiro E, Casas JS, Couce MD, Sánchez A, Seoane R, Estévez AP, Sordo J. Synthesis and antimicrobial activities of gold(I) sulfanylcarboxylates. *Gold Bull.* 2012;45:23-34.
13. Wood JB, Smith DB, Baker EH, Brecher SM, K. Has the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Increased Trimethoprim-Sulfamethoxazole Use and Resistance?: a 10-Year Time Series Analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5655-5660. DOI:10.1128/AAC.01011-12.
14. Sucenaa SF, Paivaa REF, Abbehausena C, Ives B. Mattos IB, Lancellotti M. Chemical, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial activities in vitro of a new gold(I) complex with rimantadine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012;89:114-118.
15. Roymahapatra G, Mandal SM, Porto WF, Samanta T, Giri S, Dinda J, et al. Pyrazine functionalized Ag(I) and Au(I)-NHC complexes are potential antibacterial agents. *Curr Med Chem.* 2012;19(24):4184-4193.
16. Bottone JE. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):382-392. DOI: 10.1128/CMR.00073-09.

17. Conceição N, Darini ALC, Palazzo ICVP, Oliveira CCHB, Oliveira AG. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais State. Braz J Microbiol. 2010;41:34-36.

18. Abdou HE, Mohamed AA, FacklerJr, Burini JP, Galassi A, Luzuriaga RL, et al. Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. Coord Chem Rev. 2009;253:1661-1669. DOI:10.1016/j.ccr.2009.02.010.

4.2 MANUSCRITO

Síntese e avaliação da atividade biológica de um composto triazeno complexado com íon ouro (I) frente às células de leucemia mieloide crônica e microrganismos produtores de biofilme

MELISE SILVEIRA NUNES^a, LITIÉRRY RAZIA GARZON^a, ROSIÉLI MARTINI^a,
ROBERTA FILIPINI RAMPELOTTO^a, MAÍSA KRÄULICH TIZOTTI^a, ALINE
LOCATELLI^b, MANFREDO HÖRNER^c, ROSMARI HÖRNER^{a*}

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

^bDepartamento de Química, Universidade de Passo Fundo, 99052-900 Passo Fundo – RS, Brasil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

RESUMO

O aprimoramento da terapia antileucemia, bem como o tratamento de infecções ocasionadas por patógenos multirresistentes representa um dos grandes desafios na área da saúde. Embora haja um grande arsenal de fármacos disponíveis, muitos desses mostram-se ineficazes. Em razão disso, a descoberta de novas substâncias ativas, capazes de desempenhar uma ação inovadora e direcionada constitui uma necessidade nos dias atuais. Notoriamente, os trizenos (TZCs) vêm consolidando-se como uma promissora classe de compostos, caracterizada pela expressiva atividade biológica, especialmente propriedades antiproliferativas e antimicrobianas. Compostos desta classe identificam-se por conterem uma cadeia alifática constituída de três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N), responsável pelas propriedades biológicas. Além disso, tais compostos possuem ampla versatilidade química, podendo ser coordenados a diferentes íons metálicos, o que pode resultar em complexos altamente ativos. Em virtude disso, este estudo teve como objetivo a síntese e caracterização de um complexo triazenido de ouro (I), bem como a avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa frente à linhagem celular K562 (Leucemia Mieloide Crônica) e da atividade antibacteriana frente a isolados bacterianos de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN) identificados como produtores de biofilme. O composto mostrou-se ativo frente a todos os isolados produtores de biofilme, demonstrando uma considerável atividade antibacteriana. Também apresentou notável atividade citotóxica ($IC_{50} = 4.96 \mu M$). Assim, estes resultados indicam que a coordenação de pré-ligantes TZCs a metais de transição como o íon ouro pode representar uma alternativa na concepção de novos metalofármacos com propriedades antitumorais e antibacterianas. É do nosso conhecimento que este estudo representa o primeiro relato da atividade de um TZC complexado com íon ouro no estado de oxidação (I) frente à microrganismos produtores de biofilme e células K562.

Palavras - chave: Trizenos, Íon ouro, Leucemia mieloide crônica, Atividade antibacteriana.

INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela excessiva proliferação mieloide e pela presença de uma anormalidade citogenética conhecida como cromossomo *Philadelphia* (Ph), estando presente em 90 % das LMCs, 20 % das leucemias linfocíticas agudas (LLAs) em adultos, 5 % das LLAs pediátricas e 1 % das leucemias mieloides agudas (LMAs) (Heim and Mitelman 2009). Essa alteração decorre da translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34; q11.2)$, resultando no gene anormal *BCR-ABL* (Gora-Tybor and Robak 2008; Chauffaille et al. 2014). Esse oncogene codifica a produção de uma proteína quimérica com atividade de tirosino quinase elevada, a qual está diretamente relacionada com a patogênese da LMC (Gora-Tybor and Robak 2008).

Um grande avanço no tratamento da LMC foi conquistado com o surgimento dos inibidores seletivos de tirosino quinase, como Mesilato de Imatinibe (Glivec®) e seus derivados. Apesar dos bons resultados obtidos por estes fármacos, a ausência de resposta da doença ao tratamento que ocorre quando as células neoplásicas desenvolvem mecanismos de resistência, representa um problema impactante no desfecho desta doença (Yun et al. 2014; Wang et al. 2015).

Similarmente, a terapia antimicrobiana constitui-se num desafio, devido à facilidade com que as bactérias adquirem os genes de resistência transmitidos por elementos genéticos móveis (Brown-Jaque et al. 2015). A formação de biofilme está entre os principais fatores de virulência desenvolvidos pelas bactérias. O biofilme está comumente associado às infecções crônicas, pois resiste aos sistemas de defesa do hospedeiro e apresenta maior tolerância aos antibióticos e desinfetantes químicos (Høiby et al. 2010).

Os compostos triazenos (TZCs) caracterizam-se pelo grupo diazoamina (N=N-N) (Moore and Robinson 1986), responsável por suas propriedades biológicas (Marchesi et al. 2007). Apresentam ampla versatilidade farmacológica, tais como atividades antibacteriana (Hörner et al. 2008; Domingues et al. 2010; Ombaka et al. 2012), antifúngica (Ombaka et al. 2012), antileucêmica (Matheson et al. 2004; Domingues et al. 2010; Bonmassar et al. 2013) e de nuclease sintética (Domingues et al. 2010). Dacarbazina® e Temozolomida® são exemplos de compostos TZCs amplamente utilizados no tratamento clínico de diversas neoplasias (Bonmassar et al. 2013).

A associação do radical farmacofórico TZC com íons metálicos que possuem atividade biológica como íon ouro pode produzir moléculas mais ativas e estáveis (SREEDHARA; COWAN, 2001). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi a síntese e caracterização de um composto triazenido complexado com íon ouro (I), bem como a avaliação da atividade antiproliferativa e antibacteriana *in vitro*, frente à linhagem celular K562 (LMC) e isolados bacterianos de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN), identificados como produtores de biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Composto triazenido de ouro (I)

O composto triazenídico de ouro no estado de oxidação I {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} (Figura 1), foi previamente sintetizado e caracterizado quimicamente no Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Para a síntese do complexo dissolveu-se 0,10 gramas (g) do pré-ligante triazeno 1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazeno em uma mistura de 20,0 mL de metanol e tetrahidrofurano (1:1). Em seguida, desprotonou-se o pré-ligante com aproximadamente 5 gotas de solução alcalina de metóxido de potássio (1,0 g de hidróxido de potássio em 10,0 mL de metanol). Posteriormente, adicionou-se ao pré-ligante desprotonado 0,168 g (0,361 mmol) de cloreto de trifenilfosfina de ouro (I). Observou-se a alteração da cor do meio reacional com formação de precipitado, o qual foi dissolvido com adição de 15,0 mL de piridina. Cristais alaranjados, aptos para a difração de Raios-X, foram obtidos após 48 horas (h), pela evaporação lenta dos solventes da solução.

Análises: Temperatura de fusão 140 °C; Análise Elementar % C₃₀H₂₃N₄O₂PClAu.

Calculado: C 49,03/ H 3,15/ N 7,62; Experimental: C 49,42/ H 2,98/ N 7,67

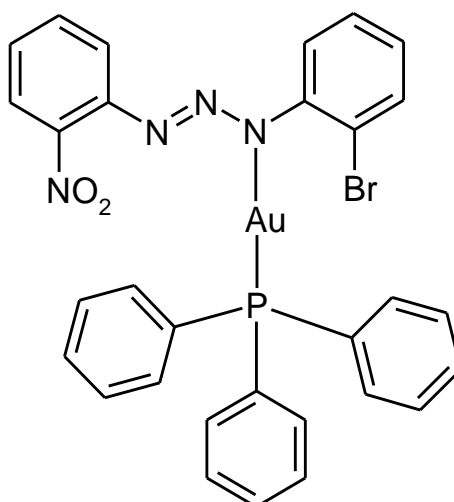


Figura 1 – Estrutura do complexo triazenídico de ouro (I): {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)}.

b) Atividade antiproliferativa *in vitro*

Cultura de células

A linhagem celular padrão K562 de Leucemia Mieloide Crônica foi adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, Associação Técnico Científica Paul Erlich – APABCAM. As células foram cultivadas em meio *Roswel Park Memorial Institute Medium* (RPMI) 1640, suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF-Gibco®), 100 UI/ml de penicilina G e 100mg/ml de estreptomicina, por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de Dióxido de Carbono (CO₂).

Ensaio de citotoxicidade

O efeito citotóxico do composto TZC sobre a linhagem celular K562 foi realizado utilizando o ensaio colorimétrico, baseado na redução do sal diazônico brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann 1983). O composto foi dissolvido em uma mistura de água ultra pura e dimetilsulfóxido DMSO (1:1) e, em seguida, diluído nas concentrações de 100 micromolar (μM), 50 μM, 25 μM, 12 μM, 6 μM, 3 μM, 1,5 μM, e 0,75 μM. No ensaio da citotoxicidade foram utilizadas 3 x 10⁶ células/poço, em placa de 96 poços

expostas a diferentes concentrações do composto e incubadas por 20 h. Cultura controle, contendo células na ausência do composto também foi realizada. Mesilato de Imatinibe (Glivec®) foi o antineoplásico utilizado como referência. Após 20 h, cada poço foi tratado com 20 microlitros (μL) de MTT e as placas foram reincubadas por mais $4 \text{ h} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e 5 % de CO_2 . Após incubação, os cristais de formazana foram dissolvidos pela adição de DMSO e a inibição do crescimento celular detectada por meio da medida das absorbâncias a 570 nanômetros (nm) utilizando um leitor de microplacas Epoch® (Fisher Bio-Tek BT2000). Cada teste foi efetuado em triplicata, sendo realizados três ensaios independentes. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa SISVAR (Ferreira 1988). Para os valores de morte celular (%) foi realizada a análise da variância dos dados e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro. Os valores de IC_{50} , que correspondem à concentração do composto capaz de inibir o crescimento de 50 % das células, foi estimado pelo *GraphPad Prism 5*.

c) Atividade antibacteriana *in vitro*

Isolados e cepas bacterianas

A atividade antibacteriana *in vitro* do composto TZC foi avaliada frente a sete isolados bacterianos de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN), obtidos a partir de uma investigação da contaminação em concentrados plaquetários. Estes microrganismos foram caracterizados como produtores de biofilme por métodos fenotípicos de aderência em tubo de borossilicato e pelo ágar vermelho congo (Christensen et al. 1982; Freeman et al. 1989) e através da pesquisa dos genes *icaADC* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Arciola et al. 2005). Os isolados são: dois *Staphylococcus epidermidis*, um *Staphylococcus saprophyticus*, três *Staphylococcus haemolyticus* e um *Staphylococcus warneri*. Também foram utilizadas duas cepas padrão de referência internacional (*American Type Culture Collection* - ATCC) não produtoras de biofilme (padrão negativo): *Staphylococcus epidermidis* 12228 e *Staphylococcus saprophyticus* 15305.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os isolados bacterianos e às cepas ATCC, armazenadas em glicerol 15 % em temperatura de $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ foram ativados previamente utilizando o meio ágar de soja e

tripticaseína (TSA), por 24 h a 35 ± 2 °C. A atividade antibacteriana do composto foi realizada utilizando o método convencional da microdiluição em caldo, através da técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), baseado no documento *Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012)*. O composto em estudo foi diluído em DMSO e água ultra pura (1:1) na concentração de 2560 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 128 a $0,25 \mu\text{g/mL}$. O inóculo bacteriano foi preparado utilizando a escala de 0,5 de McFarland, de maneira que em cada poço contivesse 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e após esse período a CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição, sendo que cada ensaio foi realizado em triplicata.

d) Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFSM, sob o número certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) 0285.0.243.000-09.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) Atividade biológica

O biofilme, quando produzido pelos microrganismos confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, impedindo ou dificultando a difusão dos antimicrobianos (Høiby et al. 2010). A concentração de antimicrobianos necessária para combater infecções causadas por microrganismos produtores de biofilme chega a ser até mil vezes maior, quando comparada às ocasionadas por seus homólogos planctônicos (não produtores de biofilme) (Musk and Hergenrother 2006; Høiby et al. 2010).

Através disso podemos observar que o composto em estudo apresentou pronunciada atividade antibacteriana, quando comparado com as cepas não produtoras de biofilme. Os resultados desta atividade são mostrados na Tabela 1. Pode-se observar que dentre os sete

isolados clínicos produtores de biofilme, todos apresentaram valores de CIM menor ou igual ao das cepas não produtoras de biofilme.

Tabela 1 - Perfil de atividade antibacteriana do complexo TZC {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} frente aos isolados de SCoN produtores de biofilme.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	=32
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	=32
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	=32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	=64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	=32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	=64
<i>Staphylococcus warneri</i>	=64
* <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	=64
* <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	=64

*Cepas ATCC não produtoras de biofilme - padrão negativo.

Um estudo realizado por Presterl e colaboradores (2009), evidenciou que isolados bacterianos de *S. epidermidis* produtores de biofilme apresentam uma maior resistência aos antibióticos. Estes pesquisadores avaliaram a combinação de azitromicina numa concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$ com altas concentrações de ceftriaxona, comprovando um efeito bactericida significativo (Presterl et al. 2009). Já o TZC em estudo mostrou-se mais ativo, quando comparado a esses antimicrobianos, sendo capaz de inibir todos os isolados de *S. epidermidis* produtor de biofilme, em concentração quatro vezes menor (32 $\mu\text{g/mL}$).

Várias pesquisas utilizando compostos TZCs frente a microrganismos demonstram que esses possuem ampla atividade antimicrobiana (Hörner et al. 2008; Domingues et al. 2010; Ombaka et al. 2012; Paraginski et al. 2014). Estudos sugerem que o mecanismo de ação antibacteriana dos TZCs ocorre devido à atividade quelante a íons metálicos constituintes da parede celular das bactérias, dificultando sua síntese e conduzindo a morte celular (Hörner et al. 2008; Ombaka et al. 2012). Segundo Paraginski e colaboradores (2014), a obtenção de compostos TZCs contendo metais como ouro (I) pode fornecer potente atividade

antibacteriana (Paraginski et al. 2014). No entanto, a utilização desses compostos complexados com metais, como o ouro, frente a microrganismos produtores de biofilme isolados de concentrados plaquetários é um fenômeno recente, sendo este o primeiro estudo.

A utilização do metal ouro tem sido investigada frente a vários microrganismos e são descritas promissoras propriedades antibacterianas de diferentes compostos contendo esse metal (Fiori et al. 2011; Cui et al. 2012). Em um estudo utilizando nanopartículas com ouro frente a bactérias multirresistentes, foi possível observar que estas exercem atividade, alterando o potencial de membrana e diminuindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP), causando um declínio geral no metabolismo bacteriano (Cui et al. 2012). Já Barreiro e colaboradores (2012) relatam que este metal atua inibindo a proliferação bacteriana, dessa forma, ocorre o bloqueio da citocinese celular (Barreiro et al. 2012).

Domingues e colaboradores (2010), utilizando compostos TZCs não complexados com metais, obtiveram valores de CIM > 128 $\mu\text{g/mL}$ frente ao isolado clínico de *S. epidermidis*, bem como, à cepa de *S. epidermidis* ATCC 12128 (Domingues et al. 2010). Além disso, outra pesquisa utilizando 15 compostos TZCs, não associado a metais, demonstraram valores de CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$ para isolados hospitalares de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Hörner et al. 2008). Em ambas as pesquisas, os compostos revelaram uma menor atividade quando comparadas com o TZC em estudo complexado com ouro. Dessa forma, acreditamos que parte da pronunciada atividade antibacteriana demonstrada ocorre devido à complexação do TZC com o metal, o qual potencializa a sua ação.

Quanto à atividade antiproliferativa, podemos verificar a porcentagem de morte celular obtida pelo composto, conforme a Tabela 2. Observamos que o composto não se mostrou dose dependente, sendo mais ativo na concentração de 50 μM , o que também foi evidenciado por Domingues e colaboradores (2010) em ensaios realizados com TZCs frente às células de LMA (Domingues et al. 2010). Além disso, analisando os resultados estatisticamente, as concentrações de 50, 25 e 12 μM não demonstraram diferença significativa, da mesma forma que as concentrações de 100, 3 e 1.5 μM . Quanto ao IC₅₀, verificamos que o composto TZC apresentou valor de citotoxicidade inferior ao Mesilato de Imatinibe (Glivec®), uma vez que este é o medicamento padrão utilizado para o tratamento da LMC.

Tabela 2 – Atividade antiproliferativa do complexo {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)(trifenilfosfina)ouro(I)} frente às células da linhagem K562.

Células	Complexo TZC			Mesilato de Imatinibe
	Concentração (µM)	% Morte celular	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
K562	100	49.77ab	4.96	3.83
	50	60.18c		
	25	58.16c		
	12	57.71c		
	6	52.12b		
	3	50.00ab		
	1.5	48.99ab		
	0.75	47.54 ^a		
	Média	53.06		
CV (%)	2.66			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade de erro ($p < 0.05$). Coeficiente de variação (CV).

Segundo Marchesi e colaboradores (2007), o mecanismo de ação citotóxica dos TZCs ocorre através da metilação da posição O⁶ da base guanina do DNA, mediada pelo íon metildiazônio (CH₃N⁺N), um derivado altamente reativo desses compostos. Devido a isso, a guanina perde a capacidade de se ligar à citosina, gerando um par de bases incorreto, pois a guanina metilada liga-se preferencialmente à timina (Marchesi et al. 2007).

Estudos primários demonstraram que os compostos TZCs, podem ter sua atividade relacionada com a inibição da enzima tirosino quinase (Matheson et al. 2004), a qual está diretamente relacionada com a malignidade da LMC (Gora-Tybor and Robak 2008). Além disso, sabe-se que a resistência frente a esta enzima é um problema encontrado por muitos pacientes portadores desta neoplasia (Yun et al. 2014; Wang et al. 2015).

Em um estudo recente, vários compostos TZCs não complexados com metais foram testados *in vitro* frente às linhagens celulares cancerosas, incluindo a LMC, e demonstraram propriedades antiproliferativas, sugerindo investigações mais profundas quanto ao seu potencial antitumoral (Adibi et al. 2013). Segundo Bonmassar e colaboradores (2013), compostos TZCs apresentam grande potencial frente às células de pacientes leucêmicos (Bonmassar et al. 2013).

A exploração do potencial antitumoral do metal ouro é um fenômeno relativamente recente. Na prática clínica, drogas ligadas a este metal têm sido especialmente estudadas em sistemas de células cultivadas, onde é possível avaliar o seu potencial citotóxico (Gouvea et al. 2012; Bertrand and Casini 2014). Compostos organometálicos de ouro ocupam um lugar importante na química medicinal, sendo essas pesquisas determinantes para desencadear um enorme interesse na comunidade científica, por novos complexos desse metal, visando a sua aplicação na terapia antitumoral (Bertrand and Casini 2014), artrite reumatoide, doenças virais e também parasitárias (Berners-Price and Filipovska 2011).

b) Difração de raios-x em monocristal

Um monocristal da amostra fixado em um fio de vidro foi submetido à coleta de dados de difração à temperatura ambiente (20–22 °C) com um difratômetro Bruker APEX II CCD, com detector de área e radiação Mo–K α monocromatizada com monocromador de grafite (Bruker 2004). A redução de dados e a correção de absorção foram executados com os programas SAINT (Bruker 2004) e SADABS (Sheldrick 1996), respectivamente. As estruturas foram resolvidas com métodos diretos (Burla et al. 2005) e refinadas utilizando fatores estruturais ao quadrado (F^2) e matrizes completas, empregando-se parâmetros térmicos anisotrópicos para todos os átomos não hidrogenóides (Sheldrick 1997). As coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio dos anéis fenila foram obtidas geometricamente (C–H = 0,93 Å para os átomos C sp^2) e refinadas na forma atachada aos respectivos átomos de carbono e parâmetros térmicos isotrópicos, com valores U_{iso} (H) relacionados a $1,2U_{eq}Csp^2$. Tabelas com parâmetros cristalográficos e detalhes referentes às coletas de dados foram gerados com o programa WinGX (Farrugia 1999) e as representações gráficas das estruturas e/ou de detalhes estruturais discutidos, foram geradas com o programa DIAMOND (Brandenburg 2004-2005).

Os dados cristalográficos de todas as estruturas serão depositados junto ao Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), sob os números ainda a serem atribuídos respectivamente. Detalhes podem ser obtidos, sem custos, 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).

Cristais vítreos, com hábito prismático alaranjados foram obtidos a partir da evaporação lenta da solução-mãe da reação. Os valores dos parâmetros de cela unitária foram

conseguidos com base no refinamento das reflexões obtidas em quadrantes distintos da Esfera de Ewald, relacionados à região angular e refinadas pelo método dos mínimos quadrados ao final da coleta de dados de intensidades. Parâmetros cristalográficos e detalhes adicionais referentes à coleta de dados e refinamento do complexo estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados da coleta de intensidade e do refinamento da estrutura cristalina/molecular do complexo triazenídico de ouro (I).

Parâmetros Cristalográficos	Complexo triazenídico de íon ouro (I)
Fórmula Molecular	[Au(C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₂ Br)(C ₁₈ H ₁₅ P)]
Massa molecular (g)	779,37
Cor / Forma	Laranja / Prisma
Dimensões (mm)	0,18X 0,15 X 0,08
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P2₁/n</i> (n ^o . 14) ^a
Parâmetros de Cella Unitária	<i>a</i> = 8,7887(10) Å <i>b</i> = 11,2594(2) Å <i>c</i> = 28,3257(4) Å <i>α</i> = 90° <i>β</i> = 92,9570(10) ° <i>γ</i> = 90°
Volume	2799,25(7) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,849 mg/m ³
<i>F</i> (000)	1504
Comprimento de onda / Radiação	0,71073 Å / Mo-K _α
Coefficiente de absorção	6,775 mm ⁻¹
Região angular de varredura angular <i>θ</i>	2,39 a 28,29 °
Região dos índices	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11 -15 ≤ <i>k</i> ≤ 12 -36 ≤ <i>l</i> ≤ 37
Solução da Estrutura	Métodos Diretos (SIR-2004)
Refinamento da Estrutura	SHELXL-97
Métodos de Refinamento	Mínimos-quadrados, matriz completa incluindo <i>F</i> ²
Reflexões coletadas	26152
Reflexões independentes	6939 [<i>R</i> (_{int}) = 0,0460]
Reflexões observadas	4912
Dados / restrições / Parâmetros	6939 / 0 / 352
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1,040
Final <i>R</i> _{índices} [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0333 <i>wR</i> ₂ = 0,0656

Índices finais de discordância (todas as reflexões)	$R_1 = 0,0587$ $wR_2 = 0,0729$
Densidade eletrônica residual (máxima e mínima)	$1,116^b$ e $-1,198^c$ e.Å ³

^e (1,12 e.Å³) para 0,9867; 0,0787; 0,2291 [1.01 Å do Br]
^f (-1,20 e.Å³) para 0,7871; 0,1271; 0,2339 [0.84 Å do Br]

A geometria do íon ouro (I) é linear, sendo que o átomo de íon ouro é constituído por um ligante triazenido [Au–N13 = 2,075(3) Å] e uma molécula neutra de trifetilfosfina [Au–P = 2,224(11) Å] com ângulo [N13–Au–P = 178,72(9)°], próximos a 180°, confirmando a linearidade, conforme pode ser observado na Figura 2.

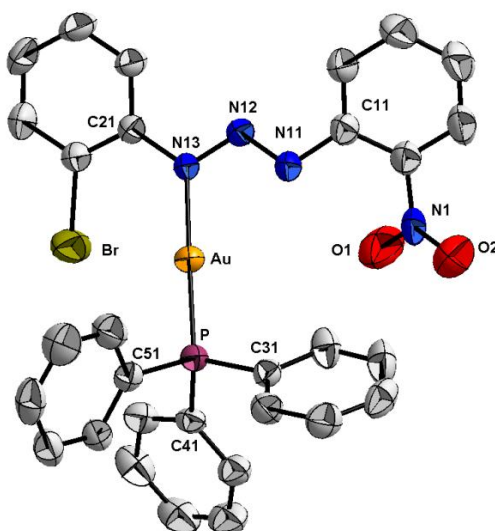


Figura 2 - Projeção estrutural do complexo triazenídico de ouro (I). Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50 %. Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização.

No estado sólido, a estrutura do complexo é constituída por ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas, do tipo C–H...M (onde M representa o ponto centróide do anel aromático). Estas interações envolvem um átomo de hidrogênio polarizado de um grupo doador C–H de um anel fenila da trifetilfosfina, de uma unidade molecular de um complexo e um anel aceptor de outra fenila da trifetilfosfina, resultando na formação de dímeros

centrossimétricos. Esses dímeros se reproduzem por esse mesmo tipo de interação, formando um arranjo supramolecular 1-D.

Neste complexo os fragmentos que envolvem a determinação destas interações são C31–C36/C51'–C56' para formação dos dímeros centrossimétricos conforme representação na Figura 3.

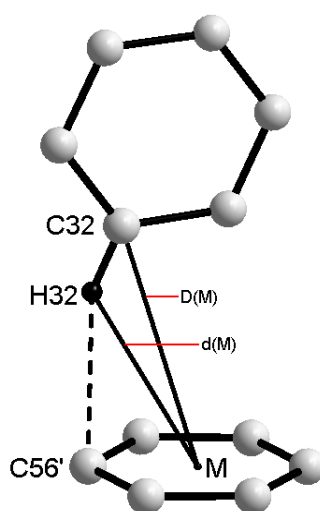


Figura 3 - Projeção dos fragmentos envolvidos nas ligações de hidrogênio não-clássicas aromática C–H...Ph dos dímeros dos complexos C31–C36/C51'–C56'. [Código de simetria 1-x, 2-y, -z]. Os átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização do esquema. M = Ponto centroide do anel aromático.

Além das definições anteriores são necessárias as determinações de ângulos e distâncias entre os dois anéis. Estas distâncias e ângulos estão listados na Tabela 4. Na Figura 4 estão projetados os dímeros centrossimétricos do complexo, formados pelas interações aromáticas.

Tabela 4 - Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas (C–H...Ph) dos dímeros do complexo.

D–H...A	D...A (Å)	H...A (Å)	<D–H...A (°)	D(M) (Å)	d(M) (Å)	<Ph–H–M (°)
C32–H32...C56'	C32...C56'	H32...C56'	C32–H32...C56'	C32...M	H32...M	C32–H32...M
	3,836	3,076	140,06	3,946	3,363	122,61

M = ponto centróide do anel aromático.

[Código de Simetria: ('): 1-x, 2-y, -z].

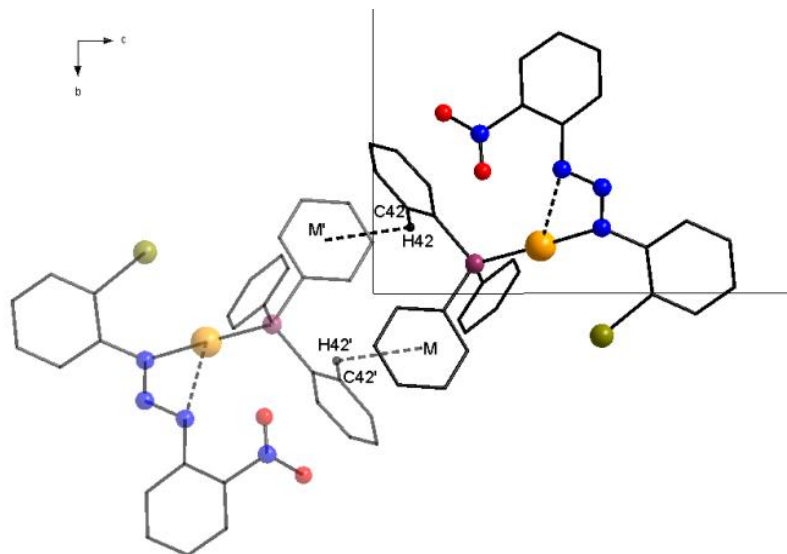


Figura 4 - Projeção dos dímeros centrossimétricos do complexo, na direção cristalográfica do eixo *a*, formados por ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas C–H···M (onde M representa o ponto centróide do anel aromático C51'–C56'). Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização apresentado conteúdo parcial de cela. [Código de simetria ('): 1-*x*, 2-*y*, -*z*].

Estes dímeros centrossimétricos, na estrutura do complexo, se reproduzem por interações aromáticas (C–H···Ph), resultando em arranjos supramoleculares 1-D via ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas centrossimétricas C–H···M (M = centróide do anel) entre as fenilas da trifenilfosfina, ambos na direção cristalográfica [100].

Os fragmentos considerados nessas interações são: C41–C46/C51''–C56'' [Códigos de simetria (''): -1+*x*, *y*, *z*]. A Figura 5 apresenta os fragmentos considerados com todas as denominações, estas indispensáveis para a determinação das interações, sendo que estes valores são descritos na Tabela 5.

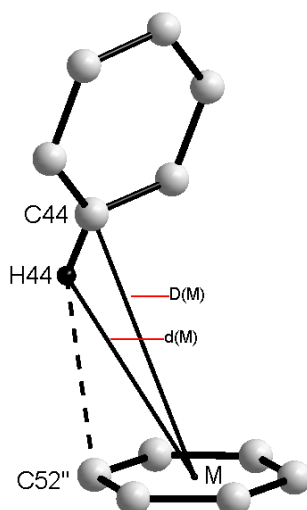


Figura 5 - Projeção dos fragmentos envolvidos nas ligações de hidrogênio não-clássicas aromática C–H...Ph no complexo C41–C46/C51''–C56''. [Códigos de simetria (''): -1+x, y, z]. Os átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização do esquema. M = Ponto centroide do anel aromático.

Tabela 5 - Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas (C–H...Ph) do arranjo 1-D do complexo.

D–H...A	D...A (Å)	H...A (Å)	<D–H...A (°)	D(M) (Å)	d(M) (Å)	<Ph–H–M (°)
C44–H44...C52''	C44...C52''	H44...C52''	C44–H44...C52''	C44...M	H44...M	C44–H44...M
	3,658	2,821	150,43	3,911	3,291	126,03

M = ponto centróide do anel aromático.

[Código de Simetria: (''): -1+x, y, z].

Na Figura 6 está representada a projeção do arranjo supramolecular do complexo, formados pelos dímeros centrossimétricos reproduzidos em uma cadeia 1-D via ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas centrossimétricas (C–H...Ph) na direção cristalográfica [100].

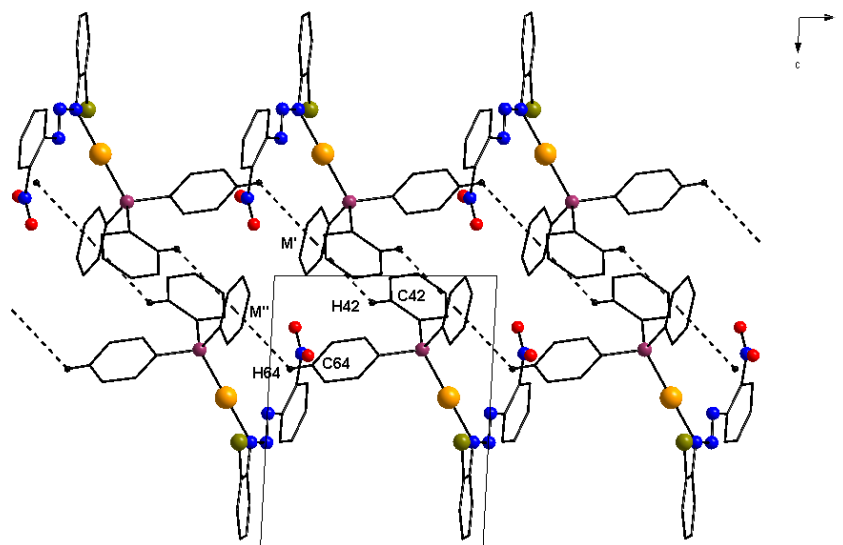


Figura 6 - Projeção do arranjo supramolecular do complexo, na direção cristalográfica do eixo *b*, formados por ligações de hidrogênio não-clássicas aromáticas C54–H54···M'' (onde M representa o ponto centróide do anel aromático C51''–C56''). Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização apresentando conteúdo parcial de cela. [Código de simetria ('): $-1+x, y, z$].

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos sugerimos que a pronunciada atividade biológica demonstrada pelo complexo TZC em estudo deva-se à presença do íon ouro, o qual potencializa a ação do grupo diazoamina. Além disso, esta pesquisa faz parte de um estudo inicial, sendo a primeira investigação a utilizar TZC complexado com íon ouro frente às células K562 e bactérias formadoras de biofilme. Em vista disso, outras análises estão sendo realizadas através da síntese de novos compostos TZCs complexados com metais, bem como a elucidação dos seus possíveis mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar sua gratidão a CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Adibi H, Majnooni MB, Mostafaie A, Mansouri K, Mohammadi M (2013) Synthesis, and *In-vitro* cytotoxicity studies of a series of triazene derivatives on human cancer cell lines. *Iran J Pharm Res* 12:695-703
- Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, Montanaro L (2005) A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res* 75:408-413
- Barreiro E, Casas JS, Couce MD, Sánchez A, Seoane R, Estévez AP, Sordo J (2012) Synthesis and antimicrobial activities of gold(I) sulfanylcarboxylates. *Gold Bull* 45:23-34
- Berners-Price SJ, Filipovska A (2011) Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics* 3:863-873
- Bertrand B, Casini A (2014) A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans* 43:4209-4219
- Bonmassar L, Marchesi F, Pascale E, Franzese O, Margison GP, Bianchi A, D'Atril S, Bernardini S, Lattuada D, Bonmassar E, Aquino A (2013) Triazene compounds in the treatment of acute myeloid leukemia: a short review and a case report. *Curr Med Chem* 20:2389-2401
- Brandenburg K. DIAMOND. 2004-2005, Version 3.1. Crystal impact GbR, Bonn, Germany
- Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M (2015) Transfer of antibiotic resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* 79:1-7
- Bruker (2004) APEX2 (Version 1.0.22), COSMO (Version 1.48), SAINT (Version 7.06A). Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Burla MC, Caliendo R, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, De Caro L, Giacovazzo C, Polidori G, Spagna R (2005) SIR2004 – an improved tool for crystal structure determination and refinement. *J Appl Cryst* 38:381-388
- Chauffaille MLLF, Bandeira ACA, Silva ASG (2014) Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 37:17-20
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37:318-326
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, USA

Cui Y, Zhao W, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X (2012) The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 33:2327-2333

Domingues VO, Hörner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN, Bauchspiess R, Pereira WP, Paraginski GL, Locatelli A, Fank JO, Giglio VF, Hörner M (2010) *In vitro* evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *J Braz Chem Soc* 21:2226-2237

Farrugia LJ (1999) WinGX – An integrated system of windows programs for solution, refinement and analysis of single crystal x-ray diffraction data, vers. 1.64.04. *J Appl Cryst* 32: 837-838

Ferreira DF (1988) SISVAR - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 19 p.

Fiori ATM, Lustri WR, Magalhães A, Corbi PP (2011) Chemical, spectroscopic characterization and antibacterial activities *in vitro* of a novel gold(I)–ibuprofen complex. *Inor Chem Commun* 14:738-740

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. *J Clin Pathol* 42:872-874

Gouvea LR, Garcia LS, Lachter DR, Nunes PR, Pereira FC, Silveira-Lacerda EP, Louro SRW, Barbeira PJS, Teixeira LR (2012) Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. *Eur J Med Chem* 55:67-73

Gora-Tybor J, Robak T (2008) Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. *Curr Med Chem* 15:3036-3051

Heim S, Mitelman F (2009) *Cancer Cytogenetics*. 3ed. New Jersey: Wiley-Blackwell.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Ag* 35:322-332

Hörner M, Giglio VF, Santos AJRWA, Westphalen AB, Iglesias BA, Martins PR, Amaral CH, Michelot TM, Reetz LGM, Bertoncheli CM, Paraginski GL, Horner R (2008) Triazenes and antibacterial activity. *Rev Bras de Ciênc Farm* 44:441-449

Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, Vecchis L (2007) Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res* 56:275-287

Matheson SL, McNamee JP, Wang T, Alaoui-Jamali MA, Tari AM, Jean-Claude BJ (2004) The combi-targeting concept: dissection of the binary mechanism of action of the combi-triazene SMA41 *in vitro* and antitumor activity *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1163-1170

Moore DS, Robinson SD (1986) Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. *Adv Inorg Chem Radiochem* 30:1-68

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method* 65:55-63

Musk DJ Jr, Hergenrother PJ (2006) Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. *Curr Med Chem* 13:2163-2177

Ombaka AO, Muguna A T, Gichumbi JM (2012) Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. *J Environ Chem Ecotoxicol* 4:133-136

Paraginski GL, Berticelli CR, Zambiasi PJ, Paraginski VTK, Hörner M, Santos AJRWA, Hörne R (2014) *In vitro* antibacterial activity and toxicity toward *Artemia salina* Leach. of some triazene compounds. *Quím Nova* 37:1138-1444

Presterl E, Hajdu S, Lassnigg AM, Hirschl AM, Holinka J, Graninger W (2009) Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline, and ceftriaxone on *staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 53:3205-3210

Sheldrick GM (1996) SADABS, Program for empirical absorption correction of area detector data, University of Göttingen, Germany

Sheldrick GM (1997) SHELXL-97, Program for crystal structure refinement, University of Göttingen, Germany

Sreedhara A, Cowan JA (2001) Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J Biol Inorg Chem* 6:337-347

Yun SM, Jung KE, Kim SJ, Fang Z, Son MK, Yan HH, Lee H, Kim J, Shin S, Hong S, Hong SS (2014) HS-438, a new inhibitor of imatinib-resistant BCR-ABL T315I mutation in chronic myeloid leucemia. *Cancer Lett* 348:50-60

Wang W, Jianfeng Z, Li Y, Yang X, Ele Y, Tingting L, Ren F, Zhang J, Lin R (2015) Divalproex sodium enhances the anti-leukemic effects of imatinib in chronic myeloid leukemia cells partly through SIRT1. *Cancer Lett* 356:791-799

5 DISCUSSÃO GERAL

Analisando os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibacteriana *in vitro*, nota-se que o complexo TZC de ouro (I) foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos GP, sendo ativo frente a cepas ATCC, isolados RMD e isolados bacterianos de SCoN produtores de biofilme. Em relação à atividade em microrganismos GP, pode ser explicada devido à diferença na estrutura da parede celular das bactérias GP, as quais possuem uma estrutura celular menos complexa, composta de espessa camada de peptidoglicano. Como as bactérias GP necessitam do peptidoglicano para sua proteção e manutenção da pressão osmótica, os resultados podem estar relacionados à inibição da síntese do mesmo, conduzindo assim a morte celular (YEO et al., 2013). Além disso, estudo relata que o íon ouro age inibindo a proliferação bacteriana, dessa forma, ocorre o bloqueio da citocinese celular (BARREIRO et al., 2012).

Dentre os isolados RMD e cepas ATCC testados, o gênero *Staphylococcus* foi o que apresentou maior susceptibilidade ao composto, dos nove microrganismos testados, sete tiveram atividade de crescimento inibida. Sendo que a melhor atividade antibacteriana foi obtida frente ao isolado clínico de *S. aureus* RMD 27 (CIM = 16 µg/mL) visto que esse isolado trata-se de um *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Sem dúvida, esse é o patógeno mais importante entre os *Staphylococcus*, caracterizado como causador de uma variedade de processos infecciosos, que incluem desde infecções cutâneas benignas até doenças potencialmente fatais (WOOD et al., 2012).

Dentre duas cepas de *E. faecalis* testadas, ambas foram inibidas pelo composto (CIM de 32 e 64 µg/mL). Esses resultados são de extrema importância, quando comparados com a CIM da fosfomicina, antimicrobiano comercialmente disponível, utilizado clinicamente para o tratamento de infecções do trato urinário (CIM ≤ 64 µg/mL (sensível), 128 µg/mL (intermediário) e ≥ 256 µg/mL (resistente)) (CLSI, 2015). Portanto, o complexo do nosso estudo possui potencial atividade no tratamento clínico deste tipo de infecção, frente a esta bactéria.

Quanto aos isolados bacterianos de SCoN produtores de biofilme, os resultados obtidos foram muito promissores, dentre os sete isolados clínicos, todos apresentaram valores de CIM menor ou igual ao das cepas não produtoras de biofilme. Visto que a formação de biofilme está entre os principais fatores de virulência desenvolvidos pelas bactérias (HØIBY

et al., 2010). Este, quando produzido pelos microrganismos confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, impedindo ou dificultando a difusão dos antimicrobianos (HØIBY et al., 2010) em concentrações até mil vezes maiores, quando comparado aos seus homólogos planctônicos (não produtores de biofilme) (MUSK; HERGENROTHER, 2006; HØIBY et al., 2010).

Quanto à atividade antiproliferativa, o composto em estudo não se mostrou dose dependente, o que também foi evidenciado por Domingues e colaboradores (2010) em ensaios realizados com TZCs frente às células de LMA (DOMINGUES et al., 2010). Quanto ao IC₅₀, verificamos que o composto TZC apresentou valor de citotoxicidade (IC₅₀ = 4.96 µM) inferior ao Mesilato de Imatinibe, uma vez que este é o medicamento padrão utilizado para o tratamento da LMC.

Em vista dos resultados obtidos e confrontando-os com os relatos da literatura sugerimos que a pronunciada atividade biológica demonstrada pelo composto TZC estudado deva-se à presença do íon ouro, o qual potencializa a ação do grupo diazoamina.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos demonstram que o complexo TZC em estudo, possui ampla atividade biológica, apresentando relevante atividade antibacteriana e antiproliferativa.
- Os resultados de CIM revelaram que o complexo apresentou estreito espectro de ação, sendo ativo somente frente aos microrganismos GP.
- O complexo apresentou pronunciada atividade antibacteriana frente aos isolados produtores de biofilme de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCoN), dentre os sete isolados, todos apresentaram valores de CIM menor ou igual ao das cepas não produtoras.
- O resultado obtido no ensaio de citotoxicidade *in vitro* frente às células K562 apresentou notável atividade antiproliferativa ($IC_{50} = 4.96 \mu\text{M}$), além disso, o complexo não se mostrou dose dependente, sendo mais citotóxico na concentração de $50 \mu\text{M}$.
- Sugere-se que a pronunciada atividade biológica demonstrada pelo complexo TZC, deva-se à presença do íon ouro, o qual potencializa a ação do grupo diazoamina.
- Ressalta-se que estudos adicionais são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa e antimicrobiana deste composto.

REFERÊNCIAS

ABRALE, Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **Doenças e Tratamentos**. São Paulo, 2011.

ABDOU, H. E. et al. Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1661-1669, 2009.

ADIBI, H. et al. Synthesis, and *in-vitro* cytotoxicity studies of a series of triazene derivatives on human cancer cell lines. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 695-703, 2013.

ALLEN, H. K. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 251-259, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2014**. Atlanta, 2014.

BARREIRO, E. et al. Synthesis and antimicrobial activities of gold(I) sulfanylcarboxylates. **Gold Bull**, v. 45, p. 23-34, 2012.

BERTRAND, B.; CASINI, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. **Dalton Transactions**, v. 43, 4209-4219, 2014.

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

BONMASSAR, L. et al. Triazene compounds in the treatment of acute myeloid leukemia: a short review and a case report. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2389-2401, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota técnica N° 1/2010: 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 José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

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.

CALIXTO, J. B.; JUNIOR, J. M. S. The Drug development in Brazil: Challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

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. 1179-1186, 2007.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F., BANDEIRA, A. C. A., SILVA, A. S. G. Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 37, p. 17-20, 2014.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CUI, Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. **Biomaterials**, v. 33, p. 2327-2333, 2012.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-473, 2010.

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

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.

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.

FORESTIER, J. Rheumatoid arthritis and its treatment with gold salts - results of six years experience. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 20, p. 827-840, 1935.

FREITAS, A. G. O. **Síntese, nanoencapsulamento e atividade biológica de compostos triazenos**. 2012. 156f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GOUVEA, L. R. et al. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 67-73, 2012.

GORA-TYBOR, J.; ROBAK, T. Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3036-3051, 2008.

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

HART, F. D.; FANING, E. L. Gold therapy in rheumatoid arthritis, report of a multi-centre controlled trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 2, p. 95-119, 1960.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **Brazilian Medical Journal**, v. 317, n. 17, p. 657-660, 1998.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**, v. 6, p. 155-176, 2012.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agent**, v. 35, p. 322-332, 2010.

HÖRNER, M. et al. Triazenes and antibacterial activity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

KUMAR, V. et al. Synthesis and biological evaluation of some 2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-1-arylethanones: Antibacterial, DNA photocleavage, and anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 267-276, 2014.

LEUNG, E. et al. O pacote de política da OMS para combater a saúde. **Boletim da Organização Mundial da Saúde**, p. 1-6, 2011.

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

MATHESON, S. L. et al. The combi-targeting concept: dissection of the binary mechanism of action of the combi-triazene SMA41 *in vitro* and antitumor activity *in vivo*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 3, p. 1163-1170, 2004.

MIRABELLI, C. K. et al. Evaluation of the *in vivo* antitumor activity and *in vitro* cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. **Cancer Research**, v. 45, p. 32-39, 1985.

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**, v. 30, p. 1-68, 1986.

MUSK, D. J. J. R., HERGENROTHER, P. J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2163-2177, 2006.

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

OLIVEIRA, A. C. et al. Desafios e perspectivas para a contenção da resistência bacteriana na óptica dos profissionais de saúde. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 747-754, 2013.

OMBAKA, A. O.; MUGUNA, A. T.; GICHUMBI, J. M. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, n. 7, p. 133-136, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. Genebra: Suíça, 2014.

PARAGINSKI, G. L. et al. *In vitro* antibacterial activity and toxicity toward *Artemia salina* Leach of some triazene compounds. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1144-1144, 2014.

PARISI, S. et al. Temozolomide and Radiotherapy versus Radiotherapy Alone in High Grade Gliomas: A Very Long Term Comparative Study and Literature Review. **BioMed Research International**, 2014.

PINA, E. **Mestrado em farmacologia aplicada 2012**. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/22414/1/TESE.pdf>> Acesso em: 27 março. 2015.

PRICE, S. J. P.; FILIPOVSKA, A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. **Metalomics**, v. 3, n. 9, p. 863-873, 2011.

SHEALY, Y. F.; KRAUTH, C. A.; MONTGOMERY, J. A. Imidazoles. I. Coupling reactions of 5-diazoimidazole-4-carboxamide. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 2150-2154, 1962.

SHEALY, Y. F.; KRAUTH, C. A.; PITTILLO, R. F.; HUNT, D. E. A new antifungal and antibacterial agent, methyl 5(or4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4(or 5)-carboxylate. **J Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n.1, p. 147-148, 1966.

SIDORYK, K. et al. Searching for new derivatives of neocryptolepine: Synthesis, antiproliferative, antimicrobial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 304-313, 2014.

SILVA, R. G. et al. Rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 60, n. 8, p. 554-577, 2003.

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.

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

SUTTON, B. M. Gold Compounds for Rheumatoid Arthritis. **Gold Bull**, v. 19, n. 1, p. 15-16, 1986.

THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 2013.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e pesquisa. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses**: MDT. 8. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2012.

VLIEGHE, E. et al. Antibiotic resistance among bacterial pathogens in Central Africa: a review of the published literature between 1955 and 2008. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 295-203, 2009.

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.

YAP, T. A.; WORKMAN, P. Exploiting the cancer genome: strategies for the discovery and clinical development of targeted molecular therapeutics. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 549-573, 2012.

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

WOOD, J. B. et al. Has the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Increased Trimethoprim-Sulfamethoxazole Use and Resistance?: a 10-Year Time Series Analysis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5655-5660, 2012.

ANEXOS

Anexo A - Carta de aceite da Revista Cubana de Farmácia

revista cubana de FARMACIA

La Habana, 7 de marzo de 2014

A quién pueda interesar:

Hacemos constar que el artículo **Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos**, de Melise Silveira Nunes, Ileri Razia Garzon, Rosiéli Martini, Roberta Filipini Rampelotto, Aline Locatelli, Rosmari Hörner, Manfredo Hörner, de la Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, debe salir publicado en la Revista Cubana de Farmacia Vol. 48, No. 4, oct-dic 2014.

Atentamente,



Manuel Cue Bruguera

Editor

<http://www.sld.cu/sitios/revfarmacia/index.php>