

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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E  
ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS TRIAZENOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Liliana Urdangarin de Sousa**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

# **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS TRIAZENOS**

**Liliana Urdangarin de Sousa**

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

**Orientadora: Professora Rosmari Hörner**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

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

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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA  
DE COMPOSTOS TRIAZENOS**

elaborada por  
**Liliana Urdangarin de Sousa**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Rosmari Hörner, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

**Luiz Carlos Rodrigues Júnior, Dr. (UNIFRA)**

**Virgínia Maria Cóser, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 13 de dezembro de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

**Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmã  
que, apesar da distância, sempre estiveram presentes na minha vida.  
Obrigada por todo o amor, apoio, incentivo e dedicação!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida e por sempre estar ao meu lado iluminando o meu caminho;

Aos meus eternos amores: Aristeu (pai) e Regina (mãe), pelo amor, educação, ensinamentos, dedicação inigualável e pelo apoio de sempre nas minhas escolhas de vida;

À minha amada irmã Juliana, pela ajuda nos momentos mais difíceis e pelas injeções de ânimo para prosseguir nas minhas escolhas e lutar sempre por mais conquistas;

Ao meu namorado Maicon Elias Kroth pelo incentivo, carinho e principalmente pela paciência nos dias de estresse;

À minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner, pela oportunidade desde o estágio até o mestrado, pelos ensinamentos, orientação, paciência e por contribuir para o meu amadurecimento profissional;

À mestra Priscilla Jussiane Zambiasi, pela cooperação desde a síntese dos compostos e posterior ajuda na escrita da parte química do manuscrito;

As alunas de iniciação científica, Taíse, Litiérri e Melise pela ajuda grandiosa na realização das práticas deste trabalho;

À minha colega e grande amiga Lívia Gindri, que me acompanha desde a graduação. Obrigada pela amizade sincera e por estar sempre do meu lado me apoiando e dando conselhos;

Às colegas de laboratório e hoje grandes amigas Cláudia, Maísa e Mônica, pelo incentivo, amizade, descontrações e pelos auxílios e direcionamentos sempre que precisei;

À mestranda Silvana e à mestra Jacqueline pelas diversas ajudas nos momentos difíceis;

Ao Doutor Thiago Machado Ardenghi pelas incansáveis ajudas nos cálculos estatísticos;

Ao Laboratório de Hematologia-Oncologia do HUSM, principalmente à Dr<sup>a</sup> Virgínia Maria Coser e à mestra Jacqueline Nunes Rodrigues, pela colaboração;

Ao Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos, especialmente ao Professor Manfredo Hörner pela ajuda e cooperação;

Ao meu chefe do trabalho, Walter Blaya Perez e meu vice-chefe Renésio Armindo Grehs, por compreender e incentivar meus estudos, permitindo que eu me afastasse para as minhas aulas;

Aos meus colegas de trabalho, João, Janu e Marta pelo apoio e por “segurar as pontas” no trabalho a fim de que eu pudesse me ausentar e cursar o mestrado;

A todos os professores do curso de Farmácia e da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pelos seus ensinamentos.

Às amigas que indiretamente também me ajudaram e sempre torceram por mim.

Muito obrigada a todos por esta conquista!!!!

## EPÍGRAFE

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,  
Ou que seus planos nunca vão dar certo,  
Ou que você nunca vai ser alguém...  
...Confie em si mesmo.  
Quem acredita sempre alcança.*

*Renato Russo*

## RESUMO

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

### AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS TRIAZENOS

AUTORA: LILIANA URDANGARIN DE SOUSA  
ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de dezembro de 2013.

As neoplasias constituem uma das principais causas de morte no mundo e vêm preocupando a comunidade médica e científica, visto que a maioria dos antineoplásicos não age de forma vetorizada nas células cancerosas, desencadeando inúmeros efeitos colaterais e, em determinados casos, refratariedade ao tratamento. Não menos preocupante, são as resistências adquiridas pelas bactérias, as quais culminam em cepas com fenômeno de multirresistência aos fármacos disponíveis comercialmente. Neste contexto, muitos grupos de pesquisas os quais adotam a química medicinal, voltam seus estudos para a descoberta de novas moléculas que possam constituir abordagens terapêuticas mais seletivas e com menos efeitos colaterais que as existentes atualmente. Os compostos triazenos representam uma classe de compostos com ampla versatilidade farmacológica com comprovadas atividades antitumorais e antimicrobianas. De maneira semelhante, considerando os resultados de vários estudos relevantes, complexos de Paládio(II) vêm sendo considerados como promissores agentes terapêuticos. Em vista disso, foram sintetizados dois compostos inéditos, sendo um ligante triazeno e um complexo triazenido com paládio(II), os quais de acordo com as normas de nomenclatura da IUPAC, foram assim denominados, respectivamente: 1,3-Bis(4-sulfonamidafenil)triazeno (**1**) e  $\{trans-bis-[1,3-bis-(4-sulfonamidafenil)triazenido-\kappa N^1]bis(piridina-\kappa N)-paládio(II)\}\{tetra(piridina-\kappa N)paládio(II)\}bis(potássio)\cdot monohidratado$  (**2**). Avaliamos o potencial citotóxico desses compostos através do ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células mononucleares de diferentes tipos de leucemia e a amostra controle, foram incubadas durante 24 horas com os compostos nas concentrações 12,5, 50 e 100  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . Para analisar a atividade antimicrobiana dos compostos, utilizou-se a metodologia quantitativa microdiluição em caldo, com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), frente à bactérias gram positivas e gram negativas. Os resultados demonstraram que os compostos apresentaram citotoxicidade importante nas amostras testadas, porém o composto **2** obteve menores  $IC_{50}$  que o **1**. Diferenças significativas entre os compostos foram observadas nas amostras de LMC e nas concentrações 12,5 e 50  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . A atividade antibacteriana encontrada foi de estreito espectro, voltada às cepas gram positivas.

**Palavras-chave:** Triazenos. Paládio. Citotoxicidade. Atividade antibacteriana. Leucemia.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### ACTIVITIES EVALUATION CYTOTOXIC AND ANTIBACTERIAL OF COMPOUND TRIAZENES

AUTHOR: LILIANA URDANGARIN DE SOUSA

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Presentation date: Santa Maria, December 13<sup>th</sup>, 2013.

Neoplasms are a major cause of death worldwide and have been worrying about the medical and scientific community, as most anticancer vector does not act on cancer cells, triggering numerous side-effects and, in some cases, resistance to treatment. No less worrying is the resistance acquired by bacteria, which culminate in strains with the phenomenon of multi-drug resistance commercially available. In this context, many research groups that adopted the medicinal chemistry, turn their studies to the discovery of new molecules that may be more selective therapeutic approaches with fewer side effects than currently exist. Triazenes compounds represent a class of compounds having wide versatility with proven pharmacological antimicrobial and antitumor activities. Similarly, considering the results from several studies relevant complexes of palladium (II) have been considered as promising therapeutic agents. As a result, two novel compounds were synthesized, and a binder, and a triazene triazenido complex with palladium (II), which according to the IUPAC nomenclature rules were so named, respectively: 1,3-Bis(4-sulfonamidephenyl)triazene (**1**) and {*trans*-Bis-[1,3-bis-(4sulfonamidephenyl)triazenide]bis(piridine)palladium(II)} {piridine)<sub>4</sub>palladium(II)} {potassim(I)}.water (**2**). We assess the cytotoxic potential of such compounds by colorimetric assay bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Mononuclear cells from different types of leukemia and control samples were incubated for 24 hours with the compounds at concentrations 12.5, 50 and 100  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . To examine the antimicrobial activity of the compounds we used the measurement method of broth microdilution by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against the gram positive and gram negative bacteria. The results showed that the compounds showed significant cytotoxicity in the tested samples, but the compound **2** had lower  $\text{IC}_{50}$  than **1**. Significant differences were observed between the compounds in the samples of CML and at concentrations 12,5 e 50  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . The antibacterial activity was found narrow spectrum, focused on gram-positive strains.

**Keywords:** Triazenes. Palladium. Cytotoxicity. Antibacterial activity. Leukemia.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Modelo simplificado do processo de diferenciação das células hematopoiéticas .	16
Figura 2 – Sítio de ação dos agentes citotóxicos .....	20
Quadro 1 – Classificação FAB das leucemias mielóides agudas .....	23
Figura 3 – Estrutura química de um composto químico .....	30
Figura 4 – Representação da estrutura molecular dos antineoplásicos Dacarbazina (1) e Temozolomida (2) .....	31
Figura 5 – Mecanismo de <i>Chemical Xenogenization</i> e parada do ciclo celular/ morte celular induzida por compostos triazenos em proliferação celular .....	32

### MANUSCRITO

Figura 1- Síntese dos compostos triazenidos (1) e (2) .....	39
Tabela 1 - Dados de coleta de intensidades e refinamento das estruturas cristalina/molecular dos compostos (1) e (2) .....	40
Tabela 2 - Comprimentos de ligações (Å) e ângulos de ligações (°) selecionados no pré-ligante (1) e no complexo (2) .....	41
Figura 2 - Projeção estrutural de: (a) pré-ligante triazeno (1) incluindo o solvato de cristalização DMSO; e (b): complexo (2) incluindo uma molécula de água como solvato de cristalização. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50% .....	42
Tabela 3 - Atividade antibacteriana in vitro dos compostos triazenos 1 e 2 frente a cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos MDR .....	47
Tabela 4 – Comparação da citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) em relação aos diferentes tipos de leucemia .....	49
Figura 3 - Espectro com comparação de espectro UV-Vís do ligante 1 e do complexo 2 nas concentrações de 145,6 e 60,9 µM, respectivamente .....	55
Figura S.1 - Projeção no eixo cristalográfico b dos dímeros centrossimétricos formando synthons supramoleculares por ligações de hidrogênio clássicas (1.a) N2–H4•••O3 e (2.a) N1–H5•••O1. Em (1.b) e (2.b) são destacados os anéis designados R22(8) formados pelas ligações de hidrogênio. Códigos de simetria: (‘): [-x, 2-y, -z] (1.a) e [½-x, ½+y, -½-z] (2.a) .....	56
Figura S.2 - Projeção no eixo cristalográfico b dos dímeros centrossimétricos formando synthons supramoleculares por ligações de hidrogênio clássicas C12–H12•••O2. Destaque	

para o anel formado designado R22(12) formado por ligações de hidrogênio. Códigos de simetria: (‘):  $1-x, 5-y, -z$  ..... 57

Figura S.3 - Projeção do arranjo com destaque do anel formado por ligações de hidrogênio do grupamento sulfonamida. Átomos de hidrogênio aromáticos foram omitidos para melhor visualização. Códigos de simetria: (‘):  $1,33+y, 0,66-x+y, -0,33-z$ ; (‘’):  $2-x+y, -x, z$ ; (‘’’):  $1,33-x, -1,33-y, -0,33-z$ ; (‘’’’):  $-y, -2+x-y, z$ ; (‘’’’’):  $-0,66+x-y, -1,33+x, -0,33-z$  ..... 58

Figura S.4 - Projeção dos túneis hexagonais gerados pelo empacotamento de moléculas com visualização no plano cristalográfico ab. Destaque das interações intermoleculares  $K\cdots O\cdots HW$  responsáveis pela formação de cavidades hexagonais. Códigos de simetria: (‘):  $0,333+x, -0,333+y, -0,333+z$ ; (‘’):  $1,333-x+y, -0,333-x, -0,333+z$ ; (‘’’):  $0,333-y, -1,333+x-y, -0,333+z$ ; (#):  $2-x+y, -x, z$ ; (##):  $-y, -2+x-y, z$  ..... 59

Quadro 1 – Perfil de sensibilidade, espécime clínico e genes de resistência dos isolados clínicos ..... 60

Quadro 2 – Perfil das amostras, citogenética, viabilidade celular e  $IC_{50}$  dos compostos (1) e (2) ..... 61

Tabela 5 - Análise da viabilidade celular (VC) e  $IC_{50}$  entre os compostos 1 e 2 em pacientes de diagnóstico ..... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  – microgramas

$\mu\text{g mL}^{-1}$  – micrograma por mililitro

$\mu\text{L}$  - microlitros

$35 \pm 2^\circ \text{C}$  – trinta e cinco graus Celsius, podendo variar em dois graus Celsius para mais ou para menos

Acetonitrila/Py – acetonitrila/piridina

ATCC – *American Type Culture Collection*

BA – Bastonete de Auer

*BCR-ABL* – gene quimérico encontrado na leucemia mieloide crônica, decorrente da translocação dos genes 9 e 22 (t9:22).

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTHs – Transplante de Células Tronco-Hematopoiéticas

CTT – 2,3,5-trifeniltriazólio

CX – *Chemical Xenogenization*

DCZ - Dacarbazina

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio-padrão

DTIC – Dacarbazina

$F^2$  - fatores estruturais ao quadrado

FAB – classificação French-American-British das leucemias

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

$\text{IC}_{50}$  – concentração que inibe 50% do crescimento celular

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INF- $\alpha$  – Interferon  $\alpha$

IT – índice terapêutico

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

$\text{K}^+$  - íons de potássio

KBr – Brometo de potássio

KOH – hidróxido de potássio

LA – leucemias agudas

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LLA-B - Leucemia Linfóide Aguda de linfócitos B

LLA-T – Leucemia Linfóide Aguda de linfócitos T

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMA-M3 - Leucemia Mielóide Aguda subtipo M3 (leucemia promielocítica)

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

LMC ph+ - Leucemia Mielóide Crônica com cromossomo Philadelphia positivo

MDR – *Multidrug Resistance*

mg mL<sup>-1</sup> – miligramas por mililitro

MGMT – Metil Guanina Metil Transferase

MI – Mesilato de Imatinibe

mL – mililitros

mmol mL<sup>-1</sup> – milimol por mililitro

MMR – *Mismatch repair* - Sistema de reparo

MO – medula óssea

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazolio

nm - nanometros

O<sup>6</sup>-MeG – Oxigênio na posição 6 da Metil Guanina

°C – graus Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pd – Paládio

Pd(II) – Paládio no estado de oxidação 2

Pd/Cl<sub>2</sub> – Cloreto de paládio

Ph – Cromossomo Philadelphia

*PML-RARA* – gene quimérico encontrado na leucemia promielocítica aguda (LMA-M3), resultante da quebra e translocação dos genes *PML* localizado no cromossomo 15 e *RARA* localizado no cromossomo 17, t(15:17), encontrado em mais de 90% nesse tipo de leucemia.

Proporção 1:1 – proporções iguais

Pt – Platina

RC – Remissão Completa

RCp – Remissão Completa com exceção das contagens plaquetárias

RMN – espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RP – Remissão Parcial

RPMI 1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

SMD – síndrome mielodisplásica

TK – Tirosina Kinase

TMZ – Temozolomida

TZC – Triazenos

UFC mL<sup>-1</sup> – Unidade Formadora de Colônias por mililitro

UV-Vis – Ultravioleta-visível

$\lambda$  - comprimento de onda, representado pela letra grega lambda ( $\lambda$ )

$\pi$  – constante matemática denominada de pi

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Câncer</b> .....	14
1.1.1 Considerações básicas e epidemiologia .....	14
<b>1.2 Leucemias</b> .....	15
1.2.1 Considerações gerais e epidemiologia .....	16
1.2.2 Abordagens terapêuticas .....	19
1.2.3 Leucemias agudas .....	21
1.2.3.1 Leucemia linfóide aguda .....	21
1.2.3.2 Leucemia mielóide aguda .....	22
1.2.4 Leucemias crônicas .....	25
1.2.4.1 Leucemia linfóide crônica .....	25
1.2.4.2 Leucemia mielóide crônica .....	26
<b>1.3 Experimentos <i>in vitro</i> e a cultura de células</b> .....	27
<b>1.4 Infecções bacterianas</b> .....	28
1.4.1 Fenômeno de multirresistências aos antimicrobianos .....	28
<b>1.5 Compostos Triazenos</b> .....	30
1.5.1 Aplicações clínicas e perspectivas .....	30
<b>1.6 Química medicinal</b> .....	33
1.6.1 Compostos de paládio .....	34
<b>1.7 Justificativa</b> .....	35
<b>1.8 Objetivos</b> .....	35
1.8.1 Objetivo geral .....	35
1.8.2 Objetivos específicos .....	35
<b>2 MANUSCRITO Atividade biológica e análise cristalográfica de compostos triazenidos com fragmento <i>para</i>-sulfonamidafenila</b> .....	37
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Resultados e Discussão.....	38
Material e Métodos.....	50
Conclusão.....	54
Informações Suplementares .....	55
Literatura citada – Referências Bibliográficas.....	62
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

### 1.1.1 Considerações básicas e epidemiologia

O câncer, também denominado de neoplasia, representa uma das doenças que mais causa temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor (ALMEIDA et al., 2005), sendo responsável por uma em cada oito mortes em todo o mundo (FERLAY et al., 2010; GARCIA et al., 2007).

Caracteriza-se por um processo comum a um grupo heterogêneo de mais de cem doenças distintas, as quais diferem nos fatores de risco e epidemiologia, e provém de alterações de diversos tipos celulares e órgãos do corpo humano. Essas alterações podem ser devido a mutações no próprio DNA ou também modificações epigenéticas, as quais vão se acumulando de maneira gradual no interior da célula (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Devido às alterações ocorridas, há uma proliferação relativamente descontrolada de células, sobressaindo-se à morte celular adequada, as quais podem invadir as fronteiras de tecido normal e também desencadear metástases em órgãos distantes (CASSIDY, et al., 2010; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

As condições para que células cancerosas se desenvolvam, estão atreladas tanto a fatores intrínsecos (condições imunológicas, predisposições genéticas ligadas a desordens hormonais, mutações hereditárias) quanto a fatores extrínsecos (agentes físicos: radiações ultravioletas; agentes químicos: monóxido de carbono, cianeto, amônia, nitrosaminas – presentes no tabaco; agentes biológicos: microrganismos infecciosos, entre outros) (KROEFF, 2004; MARTINS; FILHO; PIRES, 2011).

Os fatores ambientais (externos) são responsáveis por cerca de 80% de todos os cânceres, sobejando apenas uma pequena taxa, para os fatores intrínsecos. Esses dados percentuais podem vir a colaborar para a prevenção da incidência de novos casos de câncer, visto que, mudanças no estilo de vida das pessoas poderão contribuir para uma diminuição de novos casos (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2011).

Em 2005 foi publicada a Portaria 741/05 pelo INCA, instituindo novas diretrizes para o modelo de gestão da atenção oncológica. Essa Portaria objetivou integrar de forma bem esclarecedora, a assistência, prevenção, ensino e pesquisa, promovendo melhor qualidade na atenção oncológica (BRASIL, 2011).

Apesar das inúmeras pesquisas direcionadas às neoplasias e aos avanços na terapia antineoplásica, sua incidência vêm aumentando. Estimativas mundiais da incidência do câncer apontam um aumento de 50% para o ano de 2020, com 15 milhões de casos novos (GUANCHE et al., 2007). Já no Brasil, para 2013, conforme dados do INCA, são esperados aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (BRASIL, 2011).

Nos países em desenvolvimento, a incidência do câncer está aumentando devido a fatores como crescimento e envelhecimento da população, bem como, a adoção de estilos de vida os quais propiciam o surgimento de células cancerosas, como tabagismo, inatividade física e dietas ditas ocidentalizadas (FERLAY et al., 2010).

As principais abordagens para o tratamento do câncer envolvem excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, porém outras vêm sendo pesquisadas, como: imunoterapia, modificadores da resposta imunológica (interferons e fator de crescimento hematopoiético) e terapia com genes (FERNANDES; MELLO, 2008; MARTINS; FILHO; PIRES, 2011).

A maioria dos antineoplásicos, em especial os agentes citotóxicos, apresenta índice terapêutico (IT) baixo, fato que contribui para que os fármacos fiquem mais propensos a ocasionar efeitos colaterais significativos nos pacientes. Por essa razão, terapias direcionadas aos alvos moleculares continuam sendo extensamente pesquisadas (BRUTON; LAZO; PARKER, 2007).

Em vista disso, torna-se necessário a implementação de estratégias a fim de que essas estimativas aterrorizantes possam ser contornadas. Tais artifícios incluem uma ampla divulgação à população de que os fatores extrínsecos são os maiores responsáveis pelo surgimento de novos casos de cânceres, políticas de prevenção e esclarecimento, desenvolvimento eficiente de novas abordagens terapêuticas, estratégias para prevenção e detecção precoce e assistência aos enfermos (STEWART; COATES, 2005).

## **1.2 Leucemias**

### **1.2.1 Considerações gerais e epidemiologia**



A formação das células sanguíneas, denominada de hematopoese, acontece na medula óssea (MO) a partir de células precursoras (Figura 1). Essas células darão origem às hemácias (eritrócitos), aos leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos) e às plaquetas. (SANTANA-LEMOS; JÁCOMO; SANTOS, 2007; BAIN, 2007).

Quando o amadurecimento das células sanguíneas ocorre totalmente na MO, são ditas células de origem mielóide, já nas de origem linfóide, esse amadurecimento depende também de órgãos linfóides (linfonodos, baço, timo) (SANTANA-LEMOS; JÁCOMO; SANTOS, 2007).

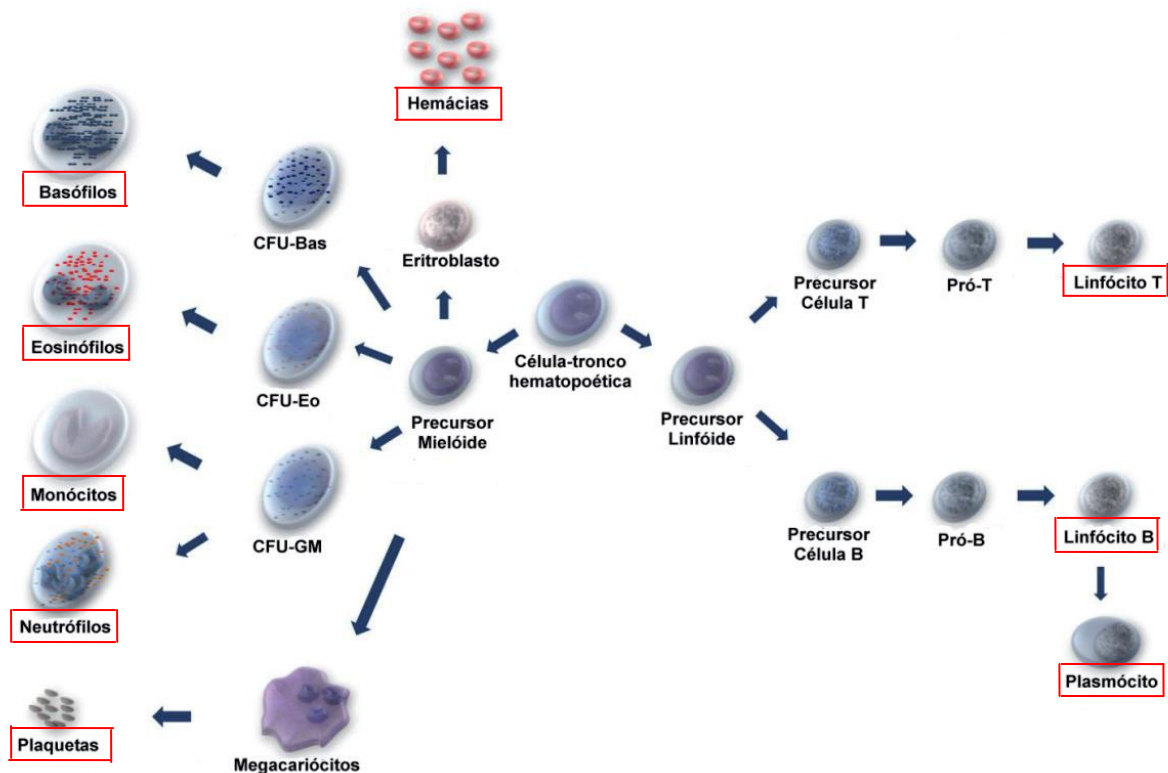


Figura 1 – Modelo simplificado do processo de diferenciação das células hematopoiéticas.

CFU-Bas: Unidade Formadora de Colônias Basofílicas

CFU-Eo: Unidade Formadora de Colônias Eosinofílicas

CFU-GM: Unidade Formadora de Colônias Granulocíticas-Monocíticas.

Fonte: Adaptado de SANTANA-LEMOS; JÁCOMO; SANTOS (2007).

O termo leucemia deriva das palavras gregas *Leukós* (branco) e *haêma* (sangue), significando sangue branco. Esse termo foi criado em 1847, pelo então considerado pai da

patologia moderna, o médico alemão Rudolf Virchow (SANTANA-LEMOS; JÁCOMO; SANTOS, 2007).

A palavra leucemia é um termo amplo, referindo-se a um grupo bastante heterogêneo de neoplasias hematológicas de origem clonal, as quais são resultados da transformação parcial ou total das células blásticas (FORONES et al., 2005; QADIR et al., 2006; SANTANA-LEMOS; JÁCOMO; SANTOS, 2007; GILART et al., 2011).

Caracterizam-se por uma proliferação anormal e descontrolada de células normais leucocitárias (da série mielóide ou linfóide), resultando em leucócitos imaturos ou disfuncionais no sangue circulante, os quais interferem na regulação fisiológica da MO. Essa alteração funcional acarreta na diminuição da produção de leucócitos normais bem como alterações nos eritrócitos e plaquetas, conduzindo a quadros de anemia, infecções, coagulação sanguínea alterada e supressão do sistema imunológico (FORONES et al., 2005; GILART et al., 2011; NOOR; BELL; WARD, 2011).

Em vista disso, múltiplas alterações fisiopatológicas são geradas pela leucemia, entre as quais destacam-se: anemia, fraqueza, neutropenia, trombocitopenia, febre, hemorragia, fadiga, mal-estar, perda de peso inexplicável, dispneia (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005; ACAR et al., 2007; LOPES, 2009).

A etiologia da doença não é evidente, porém alguns fatores podem elevar os riscos de desencadear a patologia. Exposição às radiações ionizantes e às substâncias químicas carcinogênicas, anormalidades cromossômicas constitucionais, policitemias, viroses, tabagismo, síndrome de Down e anormalidades genéticas intrínsecas, constituem alguns desses fatores que predis põem ao surgimento das leucemias (COLBY-GRAHAM; CORDAS, 2003; BRASIL, 2011).

A sintomatologia no início da leucemia não é observada devido ao escasso número de células anormais. Os primeiros sintomas irão aparecer quando as células leucêmicas atingirem a concentração de  $10^{11}$  -  $10^{13}$ . O clone da célula maligna se infiltra na medula óssea e circulação sistêmica, provocando alterações fisiológicas, podendo ser observado hemorragias, número de neutrófilos e plaquetas reduzidos, cansaço, perda ponderal, dores abdominais e inclusive alteração funcional do sistema nervoso central (SILVEIRA; ARRAES, 2008).

No que se refere à classificação das leucemias, em 1976, um grupo formado por hematologistas Franceses, Americanos e Britânicos (**FAB**) desenvolveram uma classificação baseando-se nos aspectos clínicos, citoquímicos e morfológicos, considerando o grau de maturidade e a taxa de proliferação das células leucêmicas (BENNETT, 1976).

Devido à origem dos hematologistas, a classificação ficou reconhecida com o nome de FAB e dividiu as leucemias em quatro principais categorias: Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Para as leucemias agudas, foram determinados subtipos sendo que a LLA subdividiu-se em L1, L2 e L3 e para a LMA, propuseram os subtipos M0, M1, M2, M3, M4, M5a, M5b, M6 e M7, de acordo com o estágio de desenvolvimento celular. (BENNETT, 1976; MENDONÇA, 2003; FARIAS; CASTRO, 2004).

Nas leucemias agudas, há o predomínio de células imaturas (blastos) na MO, ao passo que nas leucemias crônicas, o que se observa é a presença de células em um estado de maior maturação. As células leucêmicas podem ser encontradas em local extramedular, como o fígado, os rins, o baço e os gânglios linfáticos (PUI; RELING; DOWNING, 2004; BUCCHERI; LORENZI, 2006).

Posteriormente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), elaborou uma nova classificação correlacionando o comportamento clínico com as características morfológicas, imunológicas e citogenética e moleculares. Essa classificação considera as neoplasias do tecido linfóide e hematopoiético e obteve um consenso mundial na 4ª edição (2008), sendo hoje adotada entre os especialistas da área e os pesquisadores do mundo todo (PAES, 2002; CAMPO et al., 2011). Em 2011, pesquisadores lançam uma proposta visando atualizar a padronização terminológica da classificação da OMS, em língua portuguesa (ZERBINI, et al., 2011).

Estimativas atuais do INCA, válidas para 2013, apontam a incidência de 4.570 casos novos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres. Os referidos valores correspondem a um risco estimado de cinco novos casos a cada cem mil homens e quatro/cem mil mulheres. Para o estado do Rio Grande do Sul, 670 casos novos dessa patologia são esperados (BRASIL, 2011).

Em relação à sobrevida, devido às diferenças no acesso ao tratamento, nota-se uma relevante disparidade entre as populações. Considerando um espaço de tempo de cinco anos, os homens dos Estados Unidos e da Europa Ocidental apresentam sobrevida de 43%, já no Japão essa taxa cai para 25%, ao passo que na América do Sul, verifica-se a porcentagem de 24%. Essa taxa reduz-se ainda em países como Índia, Tailândia e África subsaariana, onde os valores demonstrados são 24%, 19% e 15%, respectivamente (BRASIL, 2011).

No que dizem respeito às taxas encontradas na infância e adolescência, dos indivíduos com acesso aos tratamentos, a sobrevida alcançada em cinco anos é de 80% (BRASIL, 2011). Levando em consideração os tipos de leucemia, verifica-se que os patamares de sobrevivência

para a LLA elevaram, encontrando-se hoje em mais de 80%. Por outro lado, para a LMA, apesar das taxas estarem subindo, verifica-se uma faixa de 50-70% de sobrevivência, ao passo que para a LMA-M3, esse valor é superior a 80% (ABRALE, 2012).

### 1.2.2 Abordagens terapêuticas

De modo geral, na terapia antineoplásica estão inseridos regimes de quimioterapia podendo ser complementado por radioterapia ou transplante de células-tronco hematopoiéticas (CTHs). Os agentes antineoplásicos são utilizados de maneira isolada ou em associação, denominada de poliquimioterapia (NOOR; BELL; WARD, 2011).

De acordo com o tipo de leucemia, diferentes protocolos de tratamentos são preconizados. A terapêutica moderna tem seus conceitos baseados no diagnóstico e tratamento individualizado (HAFERLACH et al., 2005; LUQMANI, 2005).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir ao máximo as células neoplásicas (remissão completa), causando o menor dano possível nas sadias. A quimioterapia utiliza fármacos citotóxicos os quais visam a morte celular por apoptose (a qual causará dano ao DNA, aos componentes lipídicos de membrana celular e às proteínas celulares) ou a modificação de processos intracelulares que vão convergir para esse desfecho (LUQMANI, 2005; OLIVEIRA et al., 2012).

A quimioterapia pode ser dividida em agentes ciclo-celular específicos (agentes hormonais, antimetabólitos, produtos naturais e enzimas) e ciclo-celular não específicos (produtos naturais, complexos de coordenação da platina e agentes alquilantes), de acordo com o seu mecanismo de ação, esquema demonstrado na Figura 2 (ALMEIDA et al., 2005; NOBILI et al., 2009).

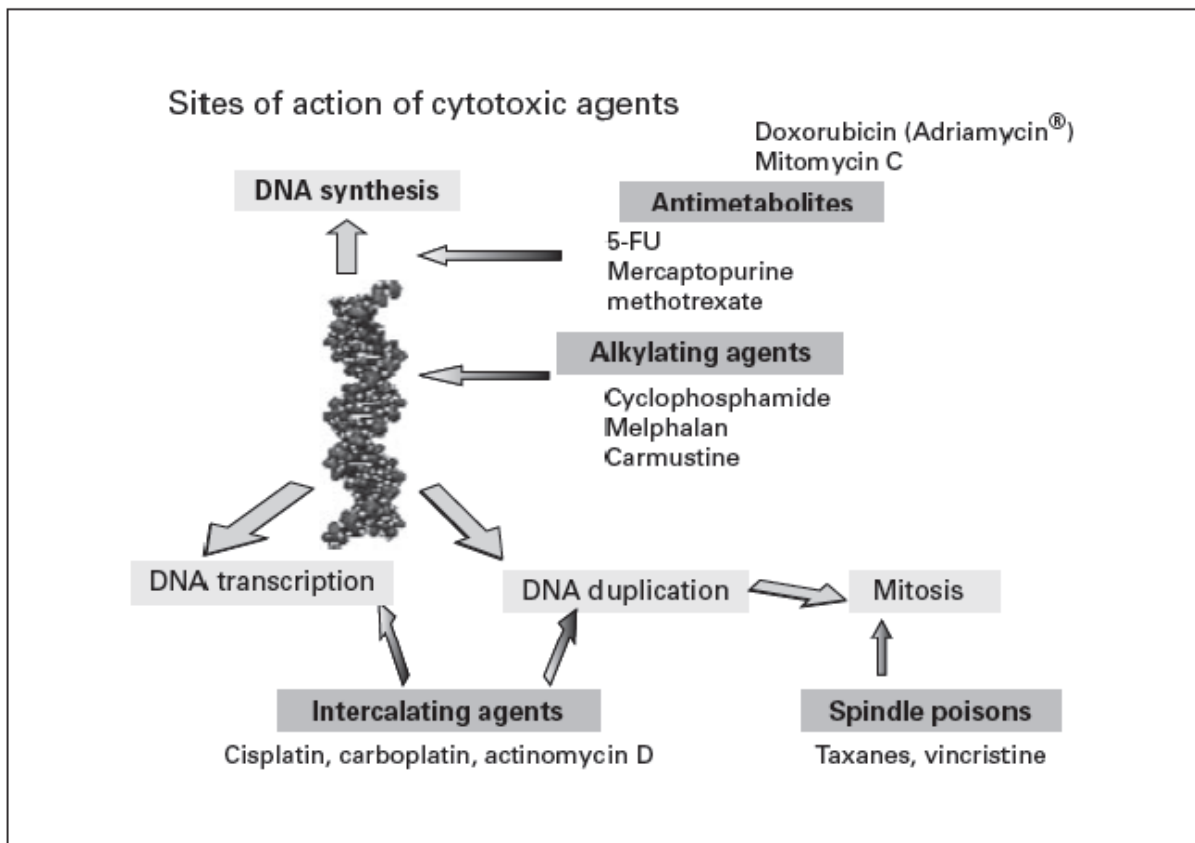


Figura 2. Sítio de ação dos agentes citotóxicos.

Fonte: LUQMANI (2005)

As etapas envolvidas no tratamento são: indução da remissão, consolidação e manutenção. Na primeira, comumente lança-se mão da poliquimioterapia, fato que favorece a remissão completa e contribui também para uma queda no risco de resistência tumoral. A consolidação e a manutenção têm por finalidade a prevenção da recorrência da doença. Naquela, de modo genérico são utilizados os mesmos esquemas terapêuticos da fase de indução e alguns fármacos extras. Por fim, na manutenção são utilizadas doses reduzidas do protocolo preconizado na indução (NOOR; BELL; WARD, 2011).

Embora o objetivo primário da quimioterapia seja a destruição vetorizada para as células neoplásicas, a maioria dos agentes quimioterápicos atua em alvos moleculares de forma não seletiva, desencadeando fenômenos de resistência e efeitos colaterais. (REIS, 2006; OLIVEIRA et al., 2012). Em vista disso, inúmeros esforços vêm sendo feitos pelos grupos de pesquisas a fim de que possam desenvolver uma nova molécula capaz de atuar de forma mais específica e seletiva nos alvos moleculares. (BRANDÃO, 2010; ZHU et al., 2012).

### 1.2.3 Leucemias agudas

As leucemias agudas (LA) são doenças heterogêneas, tanto sob o aspecto morfológico como sob o aspecto biológico. O progresso das LA dá-se de maneira bastante rápido, afetando a maior parte das células primitivas imaturas, fazendo com que essas percam a capacidade de desempenho normal de suas funções.

O processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico pode surgir em diversas fases do desenvolvimento das diferentes linhagens celulares da MO. Com o intuito de separar estas doenças de acordo com suas semelhanças, identificou-se dois grandes grupos de LA com evolução clínica e respostas terapêuticas distintas, as chamadas LLA e LMA (BUCCHERI; LORENZI, 2006; ELMAN; PINTO E SILVA, 2007; ZERBINI et al, 2011).

#### 1.2.3.1 Leucemia Linfóide Aguda

A LLA é uma patologia maligna derivada da produção descontrolada e exacerbada de células linfóides indiferenciadas (linfoblastos), as quais acumulam-se na MO e também extramedularmente. Além disso, observa-se o bloqueio da produção normal de leucócitos, hemácias e plaquetas (HAMERSCHLAK, 2008). Representa o câncer mais comum em crianças, sendo responsável por 75% de todas as LA infantis. Na faixa etária de 2 a 5 anos é que se verifica o pico de incidência dessa doença (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; PIETERS; CARROL, 2008; ONCIU, 2009). Além disso, é mais frequente em meninos, e verificam-se números mais elevados em pessoas da raça branca (ONCIU, 2009).

As causas, na grande maioria das vezes, não são perceptíveis, porém os aspectos clínicos notam-se em decorrência da elevada concentração de células leucêmicas. Entre eles, podem-se ser verificados hepatoesplenomegalia, linfonodomegalia, dor óssea, palidez e quadros hemorrágicos (BAIN, 2007).

Considerando a linhagem precursora, a LLA pode ser LLA-B (linfócitos B) ou LLA-T (linfócitos T). LLA-B de células B precursoras respodem por 85% dos casos; LLA-B de células maduras por 1-2% e os demais casos correspondem ao subtipo de células T (PIETERS; CARROL, 2008). Segundo classificação FAB, levando em conta as

características morfológicas dessa patologia, ela pode ser subdividida em L1, L2 e L3 (FARIAS; CASTRO, 2004; BAIN, 2007).

A LLA L1 (leucemia linfocítica com diâmetro celular pequeno), apresenta blastos pequenos ou médios e de aparência uniforme, apresentando cromatina fina ou aglomerada e núcleo regular com citoplasma escasso e às vezes com presença de vacúolos. Já na LLA L2 (leucemia linfocítica com diâmetro celular grande), os blastos são heterogêneos, apresentam cromatina nuclear delgada, núcleo de forma irregular, contendo um ou mais nucléolos e presença de citoplasma abundante. Por fim, na LLA L3 (leucemia linfocítica com diâmetro celular grande), há presença de células homogêneas, cromatina delgada, núcleo regular redondo ou oval (FARIAS; CASTRO, 2004; BAIN, 2007).

O tratamento da LLA é demorado, tendo sua duração entre dois a três anos. As abordagens terapêuticas, dependendo do centro de tratamento, podem sofrer algumas alterações, porém os novos protocolos contemplam cinco etapas: indução da remissão, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção da remissão (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

### 1.2.3.2 Leucemia Mielóide Aguda

As LMA's constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizado pela multiplicação descontrolada de células progenitoras mielóides, culminando em um elevado número de mieloblastos na MO e órgãos adjacentes comprometendo assim o funcionamento normal da hematopoese (HAMERSCLAK, 2008; JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008).

Em decorrência da atividade hematopoiética alterada, há redução na produção de hemácias, plaquetas e leucócitos. A grande queda na contagem de plaquetas acaba deixando o paciente suscetível a hemorragias, enquanto que a redução no número de leucócitos está associada a uma maior predisposição de adquirir infecção, e o decréscimo das hemácias pode desencadear anemia e fadiga no enfermo (BAIN, 2007).

A incidência de casos de LMA em crianças é baixa, representando taxas pediátricas de 15 a 20%. Em pacientes mais jovens, a incidência é de 2-3 casos a cada cem mil, elevando-se para 13 a 15 casos a cada cem mil aos 70-80 anos. Considerando as taxas de sobrevivência para pacientes com idade inferior a 15 anos, a literatura relata taxas entre 60 a 70%, valores esses

bem inferiores relacionando com os casos de LLA, onde já se obtém mais de 80% de sobrevida. (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2008; BURNETT; WETZLER; LOWENBERG, 2011; GIBSON et al., 2011; PUI et al., 2011).

A etiologia da LMA não é perceptível na maioria dos casos, porém em certos pacientes pode-se correlacionar com frequentes exposições ao benzeno, radiações ionizantes e quimioterapia, podendo também estar associada com a anemia de Fanconi e a Síndrome de Down (HAMERSCLAK, 2008).

Sintomas como palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, febre, faringite, hemorragias, dor nos ossos, hipertrofia gengival, perda de apetite, perda ponderal, infiltrações cutâneas, podem ser considerados como suspeita clínica de LMA (BAIN, 2007).

Diversos tipos celulares podem ser vistos ao exame microscópico de sangue periférico ou aspirado de MO de pacientes com LMA. Levando em consideração essa diversidade celular, essa patologia foi subclassificada em oito subtipos, segundo a classificação FAB (Quadro 1) (BENNETT, 1976; BAIN, 2007; SILVEIRA; ARRAES, 2008; HAMERSCLAK, 2008).

(continua)

<b>SUBTIPO</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS</b>
M0	Leucemia mielóide de blastos muito indiferenciados	Blastos muito indiferenciados, citologia e imunocitoquímica não definem dados específicos.
M1	Leucemia mieloblástica sem maturação	Mais de 30% de blastos indiferenciados. Às vezes, há presença de bastonetes de Auer.
M2	Leucemia mielóide com maturação	Mais de 30% de blastos indiferenciados. Citoplasma com grânulos azurófilos e BA.
M3	Leucemia Promielocítica aguda	> 10% de prómielocitos atípicos e hipergranulares. BA são comuns e núcleo reniforme ou bilobado.
M3v e Variante hiperbasofílica	Leucemia promielocítica (variante microgranular e hiperbasofílica)	Promielócitos atípicos com granulações finas; o núcleo pode apresentar forma semelhante a rim; na variante hiperbasofílica o núcleo é lobulado, citoplasma com basofilia intensa e grânulos ausentes ou em pequeno número.
M4	Leucemia mielomonocítica	Assemelha-se aos subtipos M2 e M5. Mais de 20% de células monocíticas, promonócitos e monócitos na medula óssea e/ou sangue.
M5a	Leucemia mielocítica diferenciada	Mais de 80% das células são monoblastos.



<b>SUBTIPO</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS</b>
M5b	Leucemia mielocítica indiferenciada	Menos de 80% das células são monoblastos, porém a maioria apresenta morfologia monocítica.
M6	Eritroleucemia	Mais de 50% de eritroblastos, com formas megaloblastóides e multinucleadas.
M7	Leucemia megacarioblástica	Mais de 30% de células indiferenciadas; expressão de antígenos de plaquetas.

Quadro 1 – Classificação FAB das leucemias mielóides agudas

Fonte: Adaptado de SILVEIRA; ARRAES (2008)

Embora a classificação FAB esteja sendo substituída pela classificação da OMS, que considera critérios citogenéticos e moleculares, persiste a necessidade de um diagnóstico morfológico preliminar baseado nos critérios FAB, visto que o diagnóstico citogenético requer mais tempo. Além disso, deve-se considerar que em alguns laboratórios não são realizadas as análises genéticas (BAIN, 2007).

O tratamento visa o alcance da remissão, isto é, o desaparecimento dos blastos na MO, e a poliquimioterapia é bastante empregada. Fármacos como a citarabina, daunorrubicina, metotrexato, 6-mercaptopurina e mitoxantrona são utilizados (HAMERSCHLAK, 2008). A instituição das abordagens terapêuticas deve ser tomada com cautela, uma vez que na maioria dos casos de LMA são reveladas alterações citogenéticas, o que contribui para diferentes respostas ao tratamento (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008). Essas anormalidades são mostradas na análise citogenética, a qual revela fusões/translocações de genes de bom prognóstico (genes PML-RARA) e mau prognóstico, como a fusão dos genes *BCR-ABL* (BAIN, 2007).

A quimioterapia é responsável por taxas em torno de 90% de remissão completa, muito embora cerca de um terço das crianças apresentem reincidência (PUI et al., 2011; CREUTZIG et al., 2012). Em adultos o cenário não é tão diferente, pois cerca de 50 a 85% dos pacientes adultos com LMA atingem a remissão após o tratamento e, dependendo do subtipo de LMA, grande parte desses apresenta recidiva indo à óbito mesmo após dois anos em remissão (SHIPLEY; BUTERA, 2009).

Em vista disso, quando acontece a recidiva de LMA, elevadas taxas de morbimortalidade estão associadas, bem como a necessidade de CTHs (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2008).

#### 1.2.4 Leucemias Crônicas

Os pacientes acometidos por leucemia crônica começam a apresentar os sintomas de maneira gradual. No princípio da patologia, a medula óssea tem seu funcionamento de forma regular e as células neoplásicas são diferenciadas. O progresso da neoplasia dá-se de maneira lenta, com duração de meses ou até anos, permitindo um relativo amadurecimento das células anormais. Por se tratar de uma doença de curso lento, em alguns casos, são feitos monitoramentos prévios por um período para depois instituir o tratamento, visando assim garantir a máxima ação da terapia (LIN; MEDEIROS, 2005; FAILACE; FERNANDES; FAILACE, 2009).

##### 1.2.4.1 Leucemia Linfóide Crônica

A LLC caracteriza-se pelo acúmulo de pequenos linfócitos B maduros na MO, sangue, podendo também ser encontrados em outros órgãos. Em decorrência disso, os pacientes acometidos com LLC desenvolvem esplenomegalia, linfonodomegalia e hepatopatia (BAIN, 2007; FAILACE, 2009).

Epidemiologicamente, a LLC tem características bem peculiares uma vez que não acomete crianças e raramente indivíduos menores de 30 anos; todavia, é bastante comum após os sessenta anos a sua incidência varia de acordo com a origem étnica dos seres humanos (YAMAMOTO; FIGUEIREDO, 2005; FAILACE; FERNANDES; FAILACE, 2009).

Além do mais, a etiologia não está clara e fatores ambientais (radiação ionizante, agentes tóxicos ou determinados vírus) que geralmente contribuem para o surgimento de outras patologias, nesse caso não demonstraram correlação. Fatores genéticos vêm sendo sugeridos como etiologia, uma vez que sua frequência em família com predisposição ao desenvolvimento de câncer vem sendo verificada e também entre pessoas de primeiro grau de parentesco e entre gêmeos (YAMAMOTO; FIGUEIREDO, 2005).

A literatura relata que a terapia imediata nos pacientes em estágios iniciais não demonstrou uma melhora na sobrevida. Em vista das heterogeneidades dessa doença, diversos tratamentos são preconizados, incluindo corticosteróides, imunoquimioterapia e transplante autólogo. Outrossim, associações dos análogos de purina com agentes alquilantes mostraram

efeitos sinérgicos (CHIATTONE, 2005; MATUTES; WOTHERSPOON; CATOVSKY, 2007).

#### 1.2.4.2 Leucemia Mielóide Crônica

A LMC é uma desordem mieloproliferativa que representa de 15 a 20% dos casos de leucemia sendo caracterizada pela proliferação excessiva de células de origem mielóide. É uma doença de evolução trifásica, progredindo a partir da fase crônica, para a fase acelerada e finalmente para a fase blástica, e apresenta-se mais comumente em adultos do sexo masculino com idade em torno dos 65 anos (IQBAL; SIDDIQUI; QURESHI, 2004; BERGANTINI et al., 2005; TEFFERI et al., 2005; HEIM; MITELMAN, 2009).

Uma anormalidade citogenética característica, proveniente dos cromossomos 9 e 22 – cromossomo Philadelphia (Ph), pode ser vista na maioria dos pacientes (90-95%). O cromossomo 9 contendo o oncogene *ABL* é translocado até o cromossomo 22 na região *BCR*, ocasionando a formação de um gene quimérico *BCR-ABL* o qual codifica a proteína p210, que por sua vez apresenta atividade tirosina quinase (TK). Níveis elevados de proteínas TK induzem a proliferação exacerbada de clones leucêmicos (MELO; BARNES, 2007; HEIM; MITELMAN, 2009).

O tratamento da LMC foi evoluindo ao longo do tempo. Inicialmente, as modalidades terapêuticas incluíam o arsênio, radioterapia e busulfan. Posteriormente, passaram a utilizar a hidroxiuréia, interferon- $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) e CTHs. Porém, essas opções apresentavam restrições considerando fatores como tolerância e eficácia (STONE, 2004; DEININGER et al., 2007).

No ano de 2001, o atual fármaco mesilato de imatinibe (Glivec®) foi aprovado para uso em pacientes que apresentavam LMC e eram resistentes, refratários ou intolerantes ao IFN-  $\alpha$ . O Glivec® é um inibidor de TK que atua no alvo molecular e desencadeia resposta a qual é responsável por inibir a proliferação das células precursoras da LMA, contribuindo assim para o aumento da sobrevida dos pacientes bem como uma melhoria na qualidade de vida dos mesmos (ALMEIDA et al., 2009; WALZ; SATTLER, 2006; HAMERSCHLAK, 2012).

O mesilato de imatinibe (MI) tornou-se o fármaco de primeira escolha para pacientes com LMC em fase crônica, apresentando respostas hematológicas (os sintomas e a

esplenomegalia desaparecem e o hemograma volta à normalidade), citogenéticas e moleculares (NCCN, 2009; CHAUFFAILLE, 2009).

Apesar do sucesso do MI em LMC, muitos pacientes mostraram-se intolerantes ou desenvolveram resistência a esse antineoplásico. As formas de resistência podem estar associadas ao uso de subdoses, componentes da dieta do paciente e drogas utilizadas em terapias alternativas. Em virtude disso, novos inibidores da TK, como desatinibe e nilotinibe, são usados nesses casos (IQBAL; SIDDIQUI; QURESHI, 2004; HAMERSCHLAK, 2008).

### 1.3 Experimentos *in vitro* e a cultura de células

Metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório são metas antigas na comunidade científica, datando de 1876 a primeira legislação criada especificamente para regulamentar a utilização de animais em experimentos (STEPHENS et al., 2001).

Em 1959, foram publicados os Princípios das Técnicas Experimentais Humanas, no qual os autores descreveram o chamado “Programa 3Rs”, o qual objetiva a redução do número de animais nos experimentos, refinamento das condições do estudo reduzindo ao mínimo possível o sofrimento e a substituição (*replacement*) dos testes *in vivo* por métodos alternativos (STEPHENS et al., 2001; SPIELMANN, 2002; ZURLO, 2002).

No final da década de 80, novas leis e protocolos foram criados e adotados em diversos países, com obrigações legais e morais envolvendo os animais em experimentos objetivando, sempre que possível, a adoção do Programa 3Rs (SPIELMANN, 2002).

Em vista disso, sistemas *in vitro* para pesquisas toxicológicas vêm sendo amplamente utilizados com o intuito de reduzir os experimentos com animais (ROGERO et al., 2003; BEDNARCZUK et al., 2010). Além disso, esses ensaios servem para prever as atividades *in vivo* de determinadas moléculas/fármacos, contribuindo para a especificidade de estudos com animais (BEDNARCZUK et al., 2010).

Experimentos *in vitro*, como a cultura celular, utilizam células do sangue humano ou tecidos as quais crescem em meio com placas ou suspensão, de maneira muito similar às células bacterianas ou leveduras. Quando as células utilizadas têm origem diretamente de um tecido vivo, são ditas culturas primárias (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

O alicerce vantajoso das culturas ditas primária está baseado no fato que as células envolvidas comportam-se do mesmo modo que se apresentam *in vivo* ou no organismo. Além do mais, são modelos bastante apreciados uma vez que se tratam de experimentos sensíveis, reprodutíveis e rápidos. Em contrapartida, essas células têm seu crescimento em um intervalo de tempo limitado (ROGERO et al., 2003; MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

Nas décadas de 50 e 60, desenvolveram-se técnicas aptas ao crescimento de culturas humanas puras. Nesses protocolos, as células são colocadas em meios de cultivo definidos, apresentando aminoácidos, glicose, sais, soro animal e vitaminas (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005).

## **1.4 Infecções bacterianas**

### **1.4.1 Fenômeno de multirresistência**

Antimicrobianos como sulfonamidas e penicilinas quando foram liberados para a prática clínica, revolucionaram o tratamento de infecções bacterianas reduzindo significativamente a morbimortalidade. Posteriormente, durante a “era de ouro” da descoberta de fármacos antibacterianos, surgiram novas classes, como: aminoglicosídeos (1944), tetraciclina (1945), cefalosporinas (1948), macrolídeos (1949), glicopeptídeos (1956), quinolonas (1961) e carbapenêmicos (1976) e com isso o uso terapêutico desses medicamentos tornou-se generalizado (VON NUSSBAUM et al., 2006; SILVER, 2011; RANG et al., 2012).

Em contrapartida, o uso disseminado de antibacterianos fez com que as bactérias desenvolvessem mecanismos para sobreviver. Esses mecanismos acabaram gerando a chamada resistência bacteriana, a qual pode ser advinda de várias formas, tais como: transferência horizontal de genes, mutações cromossômicas, bombas de efluxo de drogas, entre outras (VARALDO, 2002; CHAMBERS, DELEO, 2009; CHOPRA, 2012).

As bactérias são consideradas multirresistente (MDR, do inglês *Multidrug Resistance*) quando apresentam resistência a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames laboratoriais microbiológicos de rotina. Esse fenômeno de multirresistência acaba limitando severamente as opções terapêuticas utilizadas em clínica e representa um sério problema de

saúde pública, visto que as infecções bacterianas são responsáveis por 17 milhões de óbitos no mundo (WISE, 2003; BUTLER; BUSS, 2006).

Apesar de novos fármacos estarem em desenvolvimento, a demanda médica não está sendo adequadamente suprida. Um fator que agrava ainda mais essa situação, é o fato que a maior parte dessas moléculas que estão sendo desenvolvidas, são derivadas de classes antimicrobianas mais antigas estando sujeitos também aos já existentes mecanismos de resistência bacteriana (APPELBAUM, 2012; CHOPRA, 2012).

Uma estratégia de combate à resistência bacteriana, e que vem ganhando destaque nas pesquisas é a complexação de metais a fármacos, pois a interação do íon metálico com um ligante possibilita a obtenção de compostos com ampla variedade de números de coordenação, estados de oxidação e geometrias. Além disso, as características intrínsecas ao íon metálico, adicionadas aos aspectos cinéticos e termodinâmicos do composto sintetizado permitem obter estruturas moleculares que possuem um amplo espectro de reatividade e isto deve ser bem explorado (PANTCHEVA et al., 2008; ROCHA et al., 2011).

Um estudo recente, utilizando diversos compostos conseguiu demonstrar que, ao complexar compostos com metais, as atividades antibacterianas melhoravam. Tetraciclina e doxiciclina foram complexadas com íons de paládio(II), e esses complexos apresentaram maiores atividades antibacteriana frente a linhagem resistente *Escherichia coli* HB101/PBR322, comparadas com os fármacos livres (ROCHA et al., 2011).

Portanto, é inadiável a necessidade de descobrimento/desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos que atuem por mecanismos inovadores e que sejam eficazes frente aos patógenos emergentes e bactérias MDR (CHOPRA, 2012; KAVAILINI et al., 2012).

A atividade antimicrobiana para fármacos, produtos naturais e sintéticos pode ser avaliada por diferentes metodologias. A metodologia mais empregada e recomendada para a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* é a de microdiluição em caldo, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012).

Para determinar da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ajusta-se o tipo de substância que se deseja a análise de acordo com os antimicrobianos comercialmente disponíveis (CLSI, 2012). A CIM é definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação bacteriana (ação bacteriostática). A partir da CIM, pode-se determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é a menor concentração capaz de matar a bactéria (ação bactericida). As concentrações dos produtos sintéticos puros ou fármacos variam entre 0,125 a 512 µg/mL (CLSI, 2012).

## 1.5 Compostos triazenos

### 1.5.1 Aplicações clínicas e perspectivas

Os triazenos (TZC) compreendem uma classe de compostos caracterizados pela cadeia alifática e que apresentam três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=NN) (Figura 3). A síntese desses compostos gera produtos com rendimentos consideráveis (HÖRNER et al., 2003; HÖRNER et al., 2004; HÖRNER et al., 2006; DOMINGUES, et al., 2010).

Esses compostos vêm sendo alvos de pesquisas há mais de um século, dada as importantes e relevantes propriedades por eles apresentadas em diferentes áreas (HÖRNER, 2003; HANUSEK et al., 2009; DOMINGUES et al., 2010; BACK et al., 2012). Em 1956, pesquisadores já possuíam o conhecimento que compostos TZC eram ativos contra alguns tipos de leucemia para os quais havia resistência aos tratamentos convencionais da época (BURCHENAL et al., 1956). A estrutura química dos TZC, ao ser modificada, pode gerar diferentes propriedades biológicas aos seus derivados, como: atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida, repelente e antitumoral (NIFONTOV; BERSKAYA; SHTOKAREVA, 1994).

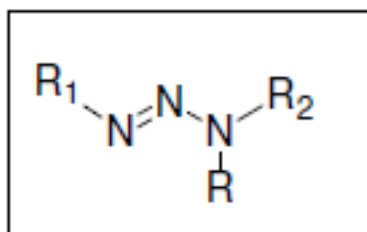


Figura 3. Estrutura química de um composto triazeno

Fonte: Adaptado de DOMINGUES (2009)

A dacarbazina (DCZ) e a temozolamida (TMZ) (Figura 4), estão inseridas no grupo dos fármacos antineoplásicos alquilantes, representando exemplos de TZC comercialmente disponíveis, pois constituem o tratamento de escolha para o melanoma metastático e glioma, respectivamente (CAPORASO et al., 2007). Além do mais, esses dois fármacos apresentam

comprovada atividade antineoplásica em pacientes leucêmicos (SEITER et al., 2004; HORTON et al., 2007; RIZZIERI et al., 2010; MEDEIROS, et al., 2012; BONMASSAR, et al., 2013) sendo que ambos têm a porção ativa representada pelo grupo triazenil, ou seja, é esse o grupo responsável por suas propriedades químicas, físicas e antitumorais (MARCHESI et al., 2007).

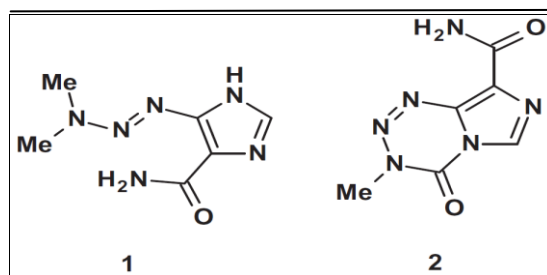


Figura 4. Representação da estrutura molecular dos antineoplásicos Dacarbazina (1) e Temozolomida (2)

Fonte: Adaptado de CAPUCHA et al. (2012)

Em relação aos efeitos citotóxicos causados pelos TZC, em termos quantitativos, o local mais comum de alquilação é a posição  $N^7$  da guanina (70% das bases são metiladas), seguida das posições  $N^1$  da adenina (15%),  $N^3$  adenina (10%) e em torno de 9% a posição  $O^6$  da guanina (MARCHESI et al., 2007; BONMASSAR et al., 2013). Embora pequena porcentagem dos produtos de reação,  $\pm$  9% das bases metiladas, sejam na posição  $O^6$  da guanina, atualmente esse é o principal local a que se atribue os efeitos citotóxicos e mutagênicos dos TZC (BROCH, 2008; BONMASSAR et al., 2013).

Os TZC são capazes de inserir um grupamento metila na posição  $O^6$  da guanina, gerando a  $O^6$ -MeG ( $O^6$ -Metil-Guanina). Se  $O^6$ -MeG não for reparado pela proteína de reparação do DNA,  $O^6$ -MeG-DNA-metiltransferase (MGMT), a guanina irá parear com a Timina durante a duplicação do DNA, formando a  $O^6$ -MeG-T. Essa formação, ao ser reconhecida pelo sistema de reparo (MMR), desencadeia uma cascata de eventos moleculares culminando na parada o ciclo celular na fase G2, ou seja, levando à morte celular (Figura 5).

Porém, se o MMR estiver defeituoso, as células continuam a se dividir, ocasionando transcrições com mutações, as quais produzem proteínas alteradas e geram peptídios não-próprios, fenômeno denominado de *Chemical Xenogenization* (CX), resultado de mutações somáticas induzidas por drogas (BONMASSAR et al., 2013).



A proteína MGMT é responsável pela remoção dos grupamentos metílicos inseridos pelos TZC na posição O<sup>6</sup> da guanina, conferindo assim uma das formas de resistência apresentadas pela terapia com TZC, ou seja, a MGMT bloqueia os efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos agentes alquilantes (BOBOLA et al., 2007; SEITER et al., 2009; BONMASSAR et al., 2013).

Consequentemente, a suscetibilidade das células neoplásicas aos TZC pode ser elevada através da modulação farmacológica do nível e função da atividade MGMT. Se o fármaco for administrado em combinação com inibidores da MGMT, os índices terapêuticos dos TZC podem ser dramaticamente aumentados (MARCHESI et al., 2007).

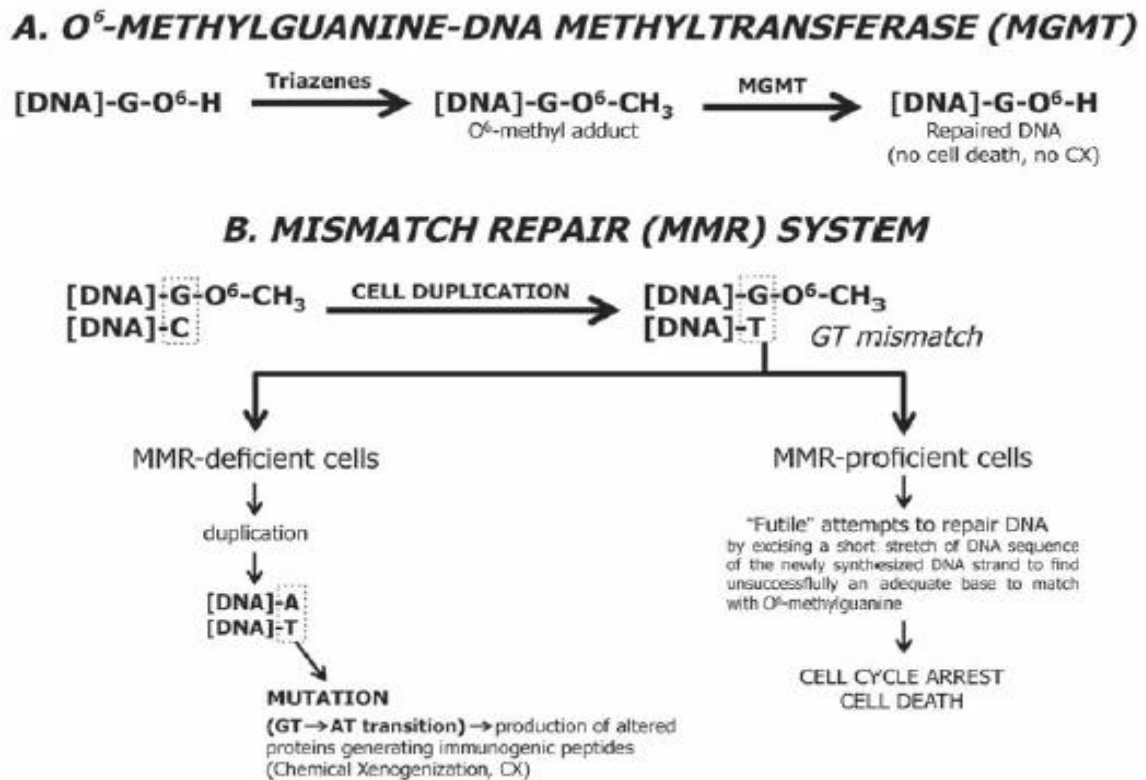


Figura 5. Mecanismo de *Chemical Xenogenization* e parada do ciclo celular/morte celular induzida por compostos triazenos em proliferação celular.

Fonte: BONMASSAR (2013)

Corroborando para essas descobertas, em 2007, um estudo de fase II da TMZ, submeteu 46 pacientes que apresentavam LMA, com idade entre 60-83 anos, a doses terapêuticas de 20mg do referido fármaco, obtendo respostas de 7% remissão completa (RC),

4% de remissão completa com exceção das contagens plaquetárias (RCp) e 4% de remissão parcial (RP). Importante ressaltar que, nesse estudo, todas as RC e RP foram obtidas de pacientes que apresentavam blastos com níveis baixos ou negativos de MGMT e que nenhum paciente com altos níveis de MGMT respondeu à TMZ (BRANDWEIN et al., 2007).

Em 2009, tendo em vista estudos anteriores que demonstraram a capacidade da Cisplatina regular negativamente a expressão de MGMT, Seiter et al., realizaram um estudo com 20 amostras de pacientes leucêmicos (15 LMA, 03 LLA e 02 leucemia bifenotípica) os quais apresentavam recidiva ou refratariedade ao tratamento, com idade média de 52 anos, administrando Cisplatina de 50 a 100 mg no 1º dia seguida de administração de 200 mg de TMZ do 1º ao 7º dia. Foram obtidos 5% de RC e 10% de blastólise parcial na medula óssea (SEITER et al., 2009).

Levando em conta a aplicabilidade dos TZC, em 2010 uma pesquisa contemplando TZC inéditos e DCZ, avaliou a atividade citotóxica desses compostos em amostras de pacientes com LMA, obtendo resultados promissores. Ademais, esses mesmos compostos originais apresentaram bons resultados de atividade antibacteriana, especialmente frente aos microrganismos gram-positivos, avaliados através da técnica de CIM (DOMINGUES et al., 2010).

Quinze compostos TZC inéditos obtidos por síntese, foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana, através da CIM e CBM. Para efetuar essa análise, foram utilizadas três cepas ATCC e trinta e um isolados clínicos bacterianos de diferentes espécimes clínicos, sendo que alguns eram MDR. Doze dos TZC testados, apresentaram algum tipo de atividade antibacteriana, cinco com atividades de largo espectro e sete com estreito espectro. A melhor atividade antibacteriana foi apresentada pelo composto 1-metil-3-(4-carboxifenil)triazeno-1-óxido, com CIM = 16µg/mL (HORNER et al., 2008).

## 1.6 Química medicinal

A química medicinal é uma área baseada na química, em aspectos biológicos, médicos e na ciência farmacêutica. Ela atua na descoberta, no *design*, na identificação, caracterização e preparação de compostos biologicamente ativos assim como no estudo dos respectivos metabolismos e mecanismo de ação desses compostos inéditos.

Essa ciência vem focalizando suas metas na síntese de novos complexos metálicos os quais apresentem ação terapêutica, podendo transformar-se em novos fármacos ou que possam corroborar para o aperfeiçoamento e produção de medicamentos já introduzidos na prática clínica (BARREIRO, 2009; PEREIRA; MORENO, 2010).

### 1.6.1 Compostos de paládio

O sucesso do antineoplásico cisplatina e outros metalofármacos, como o trióxido de arsênio (utilizado no tratamento das leucemias), tem motivado a comunidade científica internacional a investigar a atividade farmacológica de novos complexos contendo metais (GAYNOR; GRIFFITH, 2012). Estudos recentes com compostos de paládio (Pd) vêm demonstrando atividades antimicrobianas (BISWAS et al., 2013) bem como significativas atividades citotóxicas (ABU-SURRAH; AL-AS'DONI; ABDALLA, 2008; LI et al., 2013).

Complexos com centros metálicos de Pd são alvos de pesquisa uma vez que podem constituir potenciais agentes antitumorais (ZMEJKOVSKI et al., 2009; BUDZISZ et al., 2004), pois os íons Pd(II) são capazes de interagir com o DNA, podendo inibir sua síntese e causar morte celular por apoptose (QUIROGA et al., 1999).

Com base na analogia estrutural e a diferença termodinâmica em relação aos complexos de Platina, Pt(II), há grande interesse no estudo de Pd (II) como potenciais medicamentos anti-cancerígenos, isso porque compostos de Pd (II) têm um comportamento citotóxico inerente (ABU-SURRAH; KETUNEN, 2006; GAO et al., 2012).

Um estudo realizado por Budzisz et al. (2004), revelou que complexos com Pd (II) isômero trans, contendo ligantes pirazólio, obtiveram uma elevada ação citotóxica em células leucêmicas (BUDZISZ et al., 2004).

Em 2008, pesquisas mostraram que complexos trans-paládio apresentaram atividade *in vitro* igual ou superior a drogas em uso clínico como carboplatina, oxaliplatina e cisplatina (ABU-SURRAH, AL-AS'DONI; ABDALLA, 2008).

Reforçando esses resultados, em 2013 foi avaliada a atividade citotóxica *in vitro* de seis compostos de Pd (II) frente a linhagem celular de leucemia promielocítica humana (HL-60). A partir dos resultados, foi verificado que esses compostos exercem citotoxicidade na linhagem celular referida além de ter apresentado menor toxicidade quando comparados à Cisplatina (LI et al., 2013).

Além desses dados, alguns compostos de Pd(II), avaliados em 2004, não apresentaram mutagenicidade no teste de Ames, o que representaria uma redução dos potenciais riscos à saúde e uma alternativa terapêutica bastante interessante devido a ausência de mutagenicidade (KUDUK-JAWORSKA et al., 2004).

Uma pesquisa publicada em 2013, por Biswas e seus colaboradores, a qual analisou um complexo com íons Pd(II) e seu ligante frente a dezessete microrganismos (incluindo gram-positivos e gram-negativos), mostrou que o complexo apresentou atividade frente a oito dessas amostras com amplo espectro de ação, isto é, eficaz tanto para bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo mais eficaz nos microrganismos entéricos (BISWAS et al., 2013).

## **1.7 Justificativa**

Em virtude das diversas atividades biológicas apresentadas pelos TZC e íons de paládio, aliado ao aumento da resistência de fármacos antineoplásicos e antimicrobianos, neste estudo investiu-se na avaliação da atividade biológica de um ligante triazeno e um composto triazenido complexado com Pd(II), visando a possível descoberta de um novo fármaco que atue de forma mais específica e seletiva.

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo geral**

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de dois compostos triazenos inéditos, sendo um deles o ligante e o outro um complexo triazenido complexado com paládio(II), bem como pesquisar a atividade antibacteriana dos referidos compostos frente a várias espécies bacterianas envolvidas em infecções hospitalares.

### **1.8.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica do pré-ligante 1,3-*bis*(4-sulfonamidafenil)triazeno e do complexo  $\{trans-bis-[1,3-bis-(4-sulfonamidafenil)triazenido-\kappa N^1]bis(piridina \kappa N)paládio(II)\}\{tetra(piridina-\kappa N)paládio(II)\}bis(potássio)\}$ ·monohidratado frente a células leucêmicas de medula óssea de pacientes recém diagnosticados com leucemia (sem tratamento antineoplásico prévio) e pacientes recidivados, bem como células mononucleares da medula óssea de pacientes não acometido por neoplasias (controle), atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), utilizando o ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]-MTT.
  
- ✓ Determinar a atividade antibacteriana dos compostos triazenos em estudo frente a cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), bem como de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos (multirresistentes - MDR), isoladas de pacientes internados no HUSM.

## 2 MANUSCRITO

O referido manuscrito foi encaminhado para a tradução e o mesmo será submetido ao *Journal of Brazilian Chemistry Society*.

### Atividade Biológica e Análise Cristalográfica de Compostos Triazenidos com fragmentos *para*-sulfonamidafenila

#### Abstract

Os compostos 1,3-*bis*(4-sulfonamidafenil)triazeno e {*trans-bis*-[1,3-*bis*-(4-sulfonamidafenil)triazenido- $\kappa N^1$ ]*bis*(piridina  $\kappa N$ -)paládio(II)} {tetra(piridina- $\kappa N$ )paládio(II)}*bis*(potássio)}·monohidratado foram sintetizados e analisados estruturalmente por difratometria de raios X em monocristal. A caracterização desses compostos foi realizada por espectroscopia na região do Infravermelho, Ultravioleta Visível e Espectroscopia RMN para  $^1H$  e  $^{13}C$ . Avaliamos o potencial citotóxico dos compostos em 22 amostras de pacientes leucêmicos e 1 controle. Resultados citotóxicos satisfatórios foram observados para ambos os compostos. O complexo mostrou-se mais ativo que o ligante em todas as amostras. A atividade antibacteriana foi realizada através da microdiluição em caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima e foi encontrado CIM = 64  $\mu g mL^{-1}$  para as espécies ATCC *Micrococcus luteus* 7468 e *Enterococcus faecalis* 51299.

The compounds 1,3-*bis*(4-sulfonamidephenyl)triazene and *trans-bis*{[1,3-*bis*(4-sulfonamidephenyl)triazenido- $\kappa N^1$ ]*bis*(pyridine  $\kappa N$ -)palladium(II)} {tetra(pyridine- $\kappa N$ )palladium(II)}*bis*(potassium)}·monohydrate were synthesized and structurally analyzed by X-ray diffraction crystallography. The characterization of these compounds was performed by spectroscopy in the region infra-red, Ultraviolet Visible and Spectroscopy NMR for  $^1H$  and  $^{13}C$ . We evaluated the cytotoxic potential of compounds in 22 samples of leukemic patients and 1 control. Cytotoxic satisfactory results were observed for both compounds. The complex was more active than the binder in all samples. The antibacterial activity was performed by broth microdilution to determine the Minimum Inhibitory Concentration and found MIC = 64  $mg mL^{-1}$  for ATCC species *Micrococcus luteus* 7468 and *Enterococcus faecalis* 51299.

**Palavras-chave:** Estrutura cristalográfica, Compostos triazenos, Sulfonamidas, Atividade antibacteriana, Citotoxicidade

## Introdução

Os triazenos (TZC) são compostos de cadeia alifática que apresentam três átomos de nitrogênio interligados em sequência.<sup>1,2</sup> Esses compostos vêm sendo alvos de inúmeras pesquisas visto que o grupamento triazeno é responsável por diversas propriedades biológicas, tais como atividade antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química.<sup>2-6</sup>

Similarmente, o grupamento sulfonamida destaca-se na literatura por apresentar ações biológicas como hipoglicemiante (Glicodiazina),<sup>7</sup> antitumoral (Indisulan) e frente às infecções bacterianas (Sulfanilamida).<sup>8</sup>

Levando em consideração que os diversos efeitos colaterais apresentados pelos antineoplásicos<sup>9-12</sup> bem como o surgimento de bactérias multirresistentes aos tratamentos convencionais<sup>13-15</sup> constituem sérios problemas de saúde pública, urge a necessidade de novas descobertas terapêuticas para esses fins.

A introdução de pesquisas na área da química medicinal, como o sucesso do antineoplásico cisplatina e o metalofármaco trióxido de arsênio (utilizado no tratamento de leucemia),<sup>16</sup> têm suas metas focadas na síntese de novos complexos metálicos os quais constituam inovações na prática clínica.<sup>17,18</sup> Complexos com íons de paládio(II) vêm sendo relatados como promissores agentes citotóxicos e antimicrobianos.<sup>19-23</sup>

Em vista disso, foram sintetizados dois compostos triazenidos inéditos com fragmentos *para*-sulfonamidafenila, sendo um pré-ligante e um complexo com íons de paládio(II) e potássio, e realizada posterior avaliação de suas atividades antimicrobiana e citotóxica.

## Resultados e Discussão

### Síntese dos compostos

Uma nova classe de triazenos com fragmento sulfonamidafenila foi sintetizada. O pré-ligante 1,3-*bis*(4-sulfonamidafenil)triazeno (**1**) foi sintetizado partindo-se de 4-sulfonamidafenilamina (Aldrich) em solvente orgânico a temperatura 0°C, seguindo da adição de nitrito isoamílico. O complexo multinuclear de Pd(II)/K(I), {*trans-bis*-[1,3-*bis*-(4-sulfonamidafenil)triazenido- $\kappa N^1$ ]*bis*(piridina  $\kappa N$  -)paládio(II)} {tetra(piridina- $\kappa N$ )paládio(II)}*bis*(potássio)}·monohidratado (**2**), foi obtido a partir do pré-ligante triazenido

em acetonitrila e DMSO usando excesso de solução de KOH como agente desprotonante, seguido da adição PdCl<sub>2</sub> em acetonitrila e piridina (excesso) (Figura1).

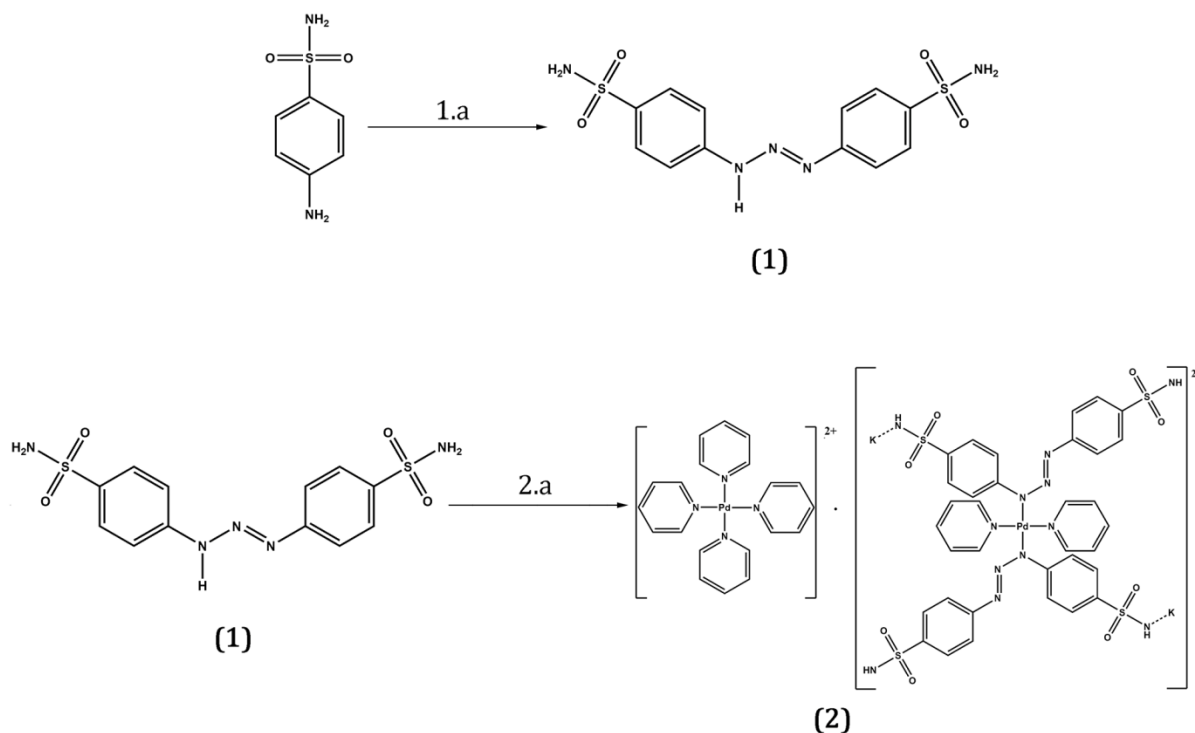


Figura 1 - Síntese dos compostos triazenidos (1) e (2).

1.a) Acetonitrila, nitrito isoamílico, T=0°C; 2.a) Acetonitrila/DMSO (4:1), KOH/MeOH, PdCl<sub>2</sub> em Acetonitrila/Py (1:6).

## Estrutura cristalina

## Caracterização das estruturas por difração de raios X

Os dados cristalinos e os parâmetros experimentais para os compostos 1,3-*bis*(4-sulfonamidafenil)triazeno (1) e {*trans-bis*-[1,3-*bis*-(4-sulfonamidafenil)triazenido-κN<sup>1</sup>]bis(piridina κN)-}paládio(II)} {tetra(piridina-κN)paládio(II)} bis(potássio)} · monohidratado (2), estão representados na Tabela 1.



Tabela 1 - Dados de coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalina/molecular dos compostos (1) e (2).

Parâmetros cristalográficos	Composto (1)	Composto (2)
Fórmula Molecular	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>54</sub> H <sub>60</sub> N <sub>16</sub> O <sub>9</sub> S <sub>4</sub> K <sub>2</sub> Pd <sub>2</sub>
Massa Molecular (g/mol)	433,52	1496,453
Cor/Forma	Amarelo/Bloco	Amarelo/Bloco
Dimensões (mm)	0,18x0,11x0,08	0,052x0,054x0,36
Sistema Cristalino	Monoclínico	Trigonal
Grupo Espacial	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i> (n° 14) <sup>a</sup>	<i>R</i> -3 (N° 148) <sup>b</sup>
Parâmetros de Cella	<i>a</i> = 14,4937(3) Å <i>b</i> = 7,1925(1) Å <i>c</i> = 18,5767(4) Å <i>α</i> = 90° <i>β</i> = 101,703(1)° <i>γ</i> = 90°	<i>a</i> = 22,4789(7) Å <i>b</i> = 22,4789(5) Å <i>c</i> = 33,3935(12) Å <i>α</i> = 90° <i>β</i> = 90° <i>γ</i> = 120°
Volume (Å <sup>3</sup> )	1896,26(4)	14613,1(8)
Z	4	9
Densidade (calculada) (mg/m <sup>3</sup> )	1,519	1,539
<i>F</i> (000)	903,8	6864
Comprimento de onda/Radiação (Å/Mo-K <sub>α</sub> )	0,71073	0,71073
Temperatura (K)	293 (2)	293 (2)
Região dos índices	-18 ≤ <i>h</i> ≤ 18 -9 ≤ <i>k</i> ≤ 8 -23 ≤ <i>l</i> ≤ 23	-29 ≤ <i>h</i> ≤ 29 -25 ≤ <i>k</i> ≤ 29 -44 ≤ <i>l</i> ≤ 44
Solução da Estrutura	Métodos diretos ( <i>SIR</i> -2004)	Métodos diretos ( <i>SIR</i> -2004)
Refinamento da estrutura	SHELXL-97	SHELXL-97
Método de refinamento	Mínimos-quadrados, matriz completa incluindo <i>F</i> <sup>2</sup>	Mínimos-quadrados, matriz completa incluindo <i>F</i> <sup>2</sup>
Reflexões coletadas	16129	56760
Reflexões independentes	3890 [ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0,0584]	8066 [ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0,0421]
Reflexões observadas	2549	2577
Dados/Restrições/Parâmetros	3890/0/320	8066/0/414
Índice de concordância estatística <i>F</i> <sup>2</sup>	0,993	1,071
Índices Finais <i>R</i> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,043 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,097	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0558 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,1477
Índices finais de discordância (todas as reflexões)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0773 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,1162	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,1044 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,1638
Densidades eletrônicas residuais (máx. e mín.)	0,296 e -0,436 e.Å <sup>3</sup>	0,896 e -1,386 e. Å <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> *International Tables for Crystallography* (2006). Vol. A, Space group 14, pp. 184–191.

<sup>b</sup> *International Tables for Crystallography* (2006). Vol. A, Space group 148, pp. 500–503.

Na Tabela 2, encontram-se as distâncias e os ângulos de ligações selecionadas para os dois compostos.

Tabela 2 - Comprimentos de ligações (Å) e ângulos de ligações (°) selecionados no pré-ligante (1) e no complexo (2).

Ligações	Distâncias (Å) (DP)	Ligações	Ângulos (°)
<b>Composto (1)</b>			
<b>N11–N12</b>	1,270(3)	<b>N11–N12–N13</b>	111,521(1)
<b>N12–N13</b>	1,330(3)	<b>H1–N11–N12</b>	118,796(2)
<b>N13–H1</b>	0,88(3)	<b>O1–S1–O2</b>	118,793(1)
<b>S1–O1</b>	1,431(3)	<b>O3–S2–O4</b>	119,050(2)
<b>S1–O2</b>	1,419(3)	<b>H5–N1–H6</b>	117,363(2)
<b>S2–O3</b>	1,434(2)	<b>H3–N2–H4</b>	116,473(3)
<b>S2–O4</b>	1,423(2)		
<b>S1–N1</b>	1,603(3)		
<b>S2–N2</b>	1,615(3)		
<b>N1–H5</b>	0,77(4)		
<b>N1–H6</b>	0,90(4)		
<b>N2–H3</b>	0,88(4)		
<b>N2–H4</b>	0,81(3)		
<b>Composto (2)</b>			
Pd1–N11	2,0565(3)	N11–Pd1–N11'	180
Pd1–N31	2,0309(1)	N31–Pd1–N31'	180
Pd2–N41	2,0282(1)	N11–Pd1–N31	90,244(3)
Pd2–N51	2,0266(1)	N41–Pd2–N41'	179,999(3)
Pd2–K	3,4986(4)	N51–Pd2–N51'	180
K–OW	3,4226(1)	N41–Pd2–N51	90,400(3)
K–N1	3,1317(1)	N1–K–OW	93,926(2)
N11–N12	1,320(4)	N1–K–Pd2	118,735(2)
N12–N13	1,3055(1)	OW–K–Pd2	92,254(2)
N11–N12	1,320(4)	N1–K–C46	93,532(2)
N12–N13	1,3055(1)	N11–N12–N13	114,241(4)

Códigos de simetria para (2) ('): -1/3+x, 1/3+y, 1/3+z.  
(DP): Desvio-padrão

As estruturas moleculares de **(1)** e **(2)**, representadas em elipsóides térmicos, são mostradas na Figura 2.

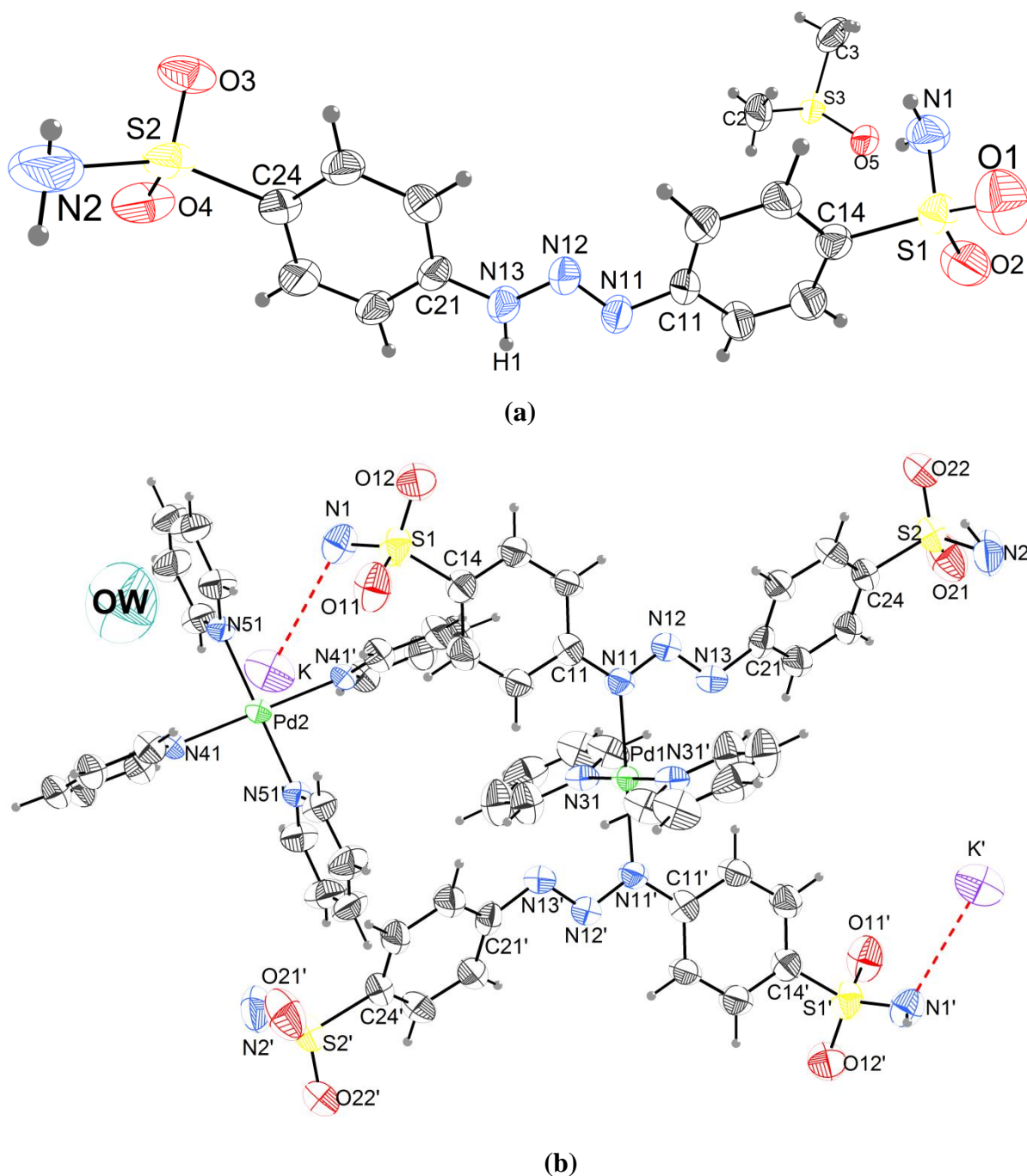


Figura 2 - Projeção estrutural de: **(a)** pré-ligante triazeno **(1)** incluindo o solvato de cristalização DMSO; e **(b)**: complexo **(2)** incluindo uma molécula de água como solvato de cristalização. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.

O ligante monocatenoado triazenido **1** apresenta uma cadeia contendo 3 átomos de nitrogênios ligados em sequência. As ligações entre os átomos desta cadeia diazoamínica [-N-

N=N-] apresentam um caráter  $sp^2$ , devido à deslocalização dos elétrons  $\pi$  na molécula, esse fato pode ser conferido analisando-se as distâncias das ligações N11–N12 e N12–N13 são iguais a 1,2699(0) e 1,3297(0) Å, apresentando caráter de ligação dupla e simples, respectivamente. Além disso, o triazeno **1** apresenta comprimento de ligação N13–H1 igual a 0,8732 (0) Å, e ângulos de ligações N11–N12–N13 e H1–N11–N12 iguais a 111,521(1) e 118,796(2)°.

O composto  $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{HN}(=\text{O})_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}\cdots\text{K})_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]^{2-} \cdot [\text{Pd}^{\text{II}}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (**2**), complexo heteronuclear é formado por um ânion complexo triazenido dinuclear  $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{HN}(=\text{O})_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}\cdots\text{K})_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]^{2-}$  e por um contra cátion complexo  $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]^{2+}$ . A estrutura cristalina do complexo (**2**) é constituída de pares de íons complexos, incluindo Pd(II) e  $\text{K}^+$ . O centro metálico de paládio possui geometria quadrática com número de coordenação igual a quatro, e o átomo de potássio apresenta-se coordenado ao átomo de nitrogênio do grupamento sulfonamida. O ânion complexo apresenta carga formal igual a -4, a qual é balanceada pelo contra cátion-complexo com carga formal igual a +2 e dois íons  $\text{K}^+$ . Esta estrutura é formada por dois íons triazenídicos simétricos  $[\text{HN}(=\text{O})_2\text{SC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}\cdots\text{K}]^{2-}$ , e duas moléculas de piridina coordenadas em geometria *trans*, completando a esfera de coordenação do centro metálico. O contra cátion complexo  $[\text{Pd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]^{2+}$  é constituído por quatro moléculas de piridinas coordenadas ao centro metálico, formando o composto com geometria quadrática.

Ainda, no complexo **2**, o átomo de paládio do ânion complexo está coordenado a átomos de nitrogênio de quatro ligantes, sendo dois ligantes triazenidos e os outros dois ligantes, moléculas neutras de piridina. Já o átomo de paládio do cátion complexo está coordenado a quatro ligantes de moléculas neutras de piridina, formando quatro ligações Pd<sup>II</sup>–N. Assim, os centros metálicos (Pd(II)) apresentam uma geometria de coordenação quadrática com número de coordenação igual a 4. A estrutura apresenta ainda dois átomos de potássio ( $\text{K}^+$ ) coordenado ao átomo de nitrogênio do grupamento sulfonamida, além de coordenar-se a uma molécula de água, e participar de ligações com cinco átomos de hidrogênio. Assim, o átomo de potássio apresenta número de coordenação igual a sete.

Ao analisar o ânion complexo do composto **2**, verificamos que as ligações Pd1–N11 e Pd1–N31 apresentam distâncias iguais a 2,0565(3) e 2,0309(1) Å, respectivamente. Os ângulos das ligações N11–Pd1–N11' e N31–Pd1–N31' são de 180° e das ligações N11–Pd1–N31 são iguais a 90,244(3)°. O cátion complexo tetrakis(piridina)paládio(II) apresenta ligações em torno do centro metálico Pd2–N41 e Pd2–N51 iguais a 2,0282(1) e 2,0266(1) Å, respectivamente, e os ângulos das ligações N41–Pd2–N41' e N51–Pd2–N51' são de 180°, e

das ligações N41–Pd2–N51 iguais a  $90,400(3)^\circ$ . Já a cadeia triazenido do complexo **2** apresenta ligações N11–N12 e N12–N13 com distâncias iguais a  $1,320(4)$  e  $1,3055(1)$  Å, respectivamente, e o ângulo da ligação N11–N12–N13 é igual a  $114,241(4)^\circ$ . Essas distâncias bem como os ângulos aqui demonstrados em nosso complexo, são próximas as encontradas na literatura.<sup>24,25</sup> Hörner et al.,<sup>24</sup> reportam distâncias do complexo de Pd(II) quadrático, Pd–N<sub>(triazeno)</sub> e Pd–N<sub>(piridina)</sub> iguais a  $2,021(3)$  e  $2,039(3)$  Å, respectivamente.

Segundo Domingues et al.,<sup>2</sup> a associação molecular promovida por ligações de hidrogênio tem um importante papel frente aos sistemas biológicos, como o reconhecimento molecular além de apresentar importantes propriedades biologicamente. Com isso, a presença do grupamento sulfonamida dos compostos (**1**) e (**2**) descritos neste trabalho, favorece a formação de ligações de hidrogênio e estudos no estado sólido destes compostos mostram que suas estruturas cristalinas são estabilizadas por estes tipos de interações intermoleculares.<sup>2</sup>

A Figura S.1 (informações suplementares) mostra arranjos supramoleculares formados, no composto (**1**), por ligações de hidrogênio clássicas centrossimétricas N2–H4···O3' e N1–H5···O1'' envolvendo átomos de hidrogênio e oxigênio do grupamento sulfonamida com distância entre os átomos doadores N2 e N1 aos átomos receptores O3 e O1 de  $2,967(4)$  e  $3,027(4)$  Å e ângulos N–H···O de  $169(3)$  e  $156(4)^\circ$ , respectivamente. O dímero (Figura S.1-1.a) é gerado por um centro de inversão localizado em  $[0\ 1\ 0]$ , e pode ser visualizado na direção ao eixo cristalográfico *b*.

Essas interações intermoleculares envolvendo o pré-ligante (**1**) formam anéis que receberam a nomenclatura  $R^2_2(8)$  (Figura S.1-2.b), onde as ligações de hidrogênio formam um anel (*ring*) com 2 átomos receptores (O) e 2 átomos doadores (N) formando um ciclo de 8 membros.<sup>26</sup> Os *Synthons supramoleculares* formados são semelhantes aos descritos por Akiri (2012),<sup>27</sup> onde, no estado sólido, o composto 3-piridinasulfonamida forma  $R^2_2(8)$  com dímeros associados entre si por interações de átomos do grupamento sulfonamida, com distâncias das ligações N–H···O iguais a  $3,028$  e  $2,987$  Å.

As ligações de hidrogênio clássicas N–H···O podem ser polarizadas pelo fluxo de carga através das ligações  $\pi$  que ocorrem no sistema N–H···O=S do grupamento sulfonamida. Este efeito é observado em sistema com grupamentos amidas.<sup>28</sup>

A Figura S.2 (informações suplementares) mostra o arranjo formado por interações intermoleculares com a participação dos átomos de oxigênio do grupamento sulfonamida atuando como átomo receptor, e átomos de carbono e hidrogênio do anel aromático atuando como átomos doadores. As interações formadas são classificadas como ligações de hidrogênio não clássicas C12–H12···O2\* com distância *D–A* igual a  $3,528(1)$  Å e ângulo de ligações *D–*

H...A igual a  $142(1)^\circ$ . Os dímeros gerados são centrossimétricos e formam *synthons* denominados  $\mathbf{R}^2_2(\mathbf{12})$  (Figura S.2), com a participação de dois átomos doadores (C12 e C12\*) e dois átomos receptores (O2 e O2\*) formando um anel de 12 membros. As moléculas dímeras estão associadas por um centro de inversão, localizado em  $[1/2\ 0\ 0]$  e podem ser visualizadas em direção ao eixo cristalográfico *b*.

O composto triazenido (**2**) apresenta interações intermoleculares como mostra a Figura S.3 (informações suplementares), onde ocorre a formação de um anel por ligações de hidrogênio clássicas N1–H1...O12' que recebem a denominação  $\mathbf{R}^6_6(\mathbf{24})$ , em que as ligações de hidrogênio formam um ciclo de 24 membros composto por 6 átomos receptores (O) e 6 átomos doadores (N). Similar a estas interações, também pode-se observar ligações de hidrogênio tais como C22–H22...O22' que apresenta distância entre o átomo doador (C) e o átomo aceptor (O) igual a  $3,450(2)\ \text{Å}$  e estas ligações formam um anel denominado  $\mathbf{R}^6_6(\mathbf{36})$ .

É importante analisar que o complexo (**2**) apresenta interações intermoleculares K...O...HW' formando um arranjo supramolecular bidimensional em um plano cristalográfico *ab* onde as moléculas estão associadas através da interação entre átomo de potássio e uma molécula de água com um átomo de hidrogênio (HW) atuando com interações trifurcadas. As distâncias das interações são  $d_{K...OW} = 3,4226(1)\ \text{Å}$  e  $d_{OW...HW} = 1,8447\ \text{Å}$ . Conforme a Figura S.4 (ver em informações suplementares), o arranjo bidimensional formado resulta em um empacotamento de unidades moleculares gerando cavidades hexagonais com diâmetro de aproximadamente  $47\ \text{Å}$ . As moléculas que compõem estes túneis hexagonais são geradas por um eixo de rotação-inversão de ordem 3, operador de simetria com simbologia  $\bar{3}$ , posicionado em  $[1/4\ 3/4\ z]$  na cela unitária.

### Espectroscopia de UV-Vis

Espectros na região do UV-Vís dos compostos **1** e **2** foram feitos à temperatura ambiente em MeOH e DMSO, respectivamente, com variação na concentração e na região espectral de 190-590nm, e as atribuições das principais bandas são comparadas com a literatura.<sup>29</sup> Compostos triazenidos possuem comportamento cromóforo,<sup>30</sup> apresentando máximos de absorção na região de 190-500 nm. Os compostos **1** e **2**, em MeOH e DMSO, respectivamente, apresentam comprimentos de onda  $\lambda_{\text{máx}}$  em aproximadamente 360 e 405 nm indicando absorção referente a transição  $n \rightarrow \pi^*$  característica do grupamento  $[\text{N}=\text{N}]$ , região que caracteriza a coloração amarelada dos triazenos. As bandas observadas em 262 e 312 nm,

respectivamente, são atribuídas a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos. Além disto, pode-se observar uma banda com  $\lambda_{\text{máx}}$  em aproximadamente 210 e 270 nm, estas caracterizam as transições  $n \rightarrow \sigma^*$  do grupamento sulfonamida no ligante **1** e no complexo **2**.

Os coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foram calculados para os compostos **1** e **2**, nos comprimentos de onda iguais a 363 e 405 nm, respectivamente, e apresentaram valores de  $5,56 \times 10^3$  e  $6,95 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

A Figura 3 (ver em informações suplementares) mostra uma comparação de espectro UV-Vís do ligante **1** e do complexo **2** nas concentrações de 145,6 e 60,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Pode-se observar um deslocamento batocrômico (para o vermelho) de 45 nm referente a banda [N=N] no espectro do complexo **2** em relação ao espectro do ligante **1**. Esse deslocamento pode ser atribuído ao efeito causado pelo átomo pesado do íon de paládio sobre o ligante triazenido desprotonado, ocorrendo uma transferência de carga metal-ligante (TCML) atribuído ao acoplamento spin-órbita, efeito semelhante ao descrito em um estudo publicado por Xie et al. (2011).<sup>31</sup>

### **Atividade biológica**

#### **Atividade antibacteriana**

O perfil de sensibilidade dos 10 isolados clínicos, bem como os genes de resistência encontrado nessas amostras e os espécimes clínicos envolvidos, encontram-se no Quadro 1 das Informações Suplementares.

Os valores de CIM apresentados pelos compostos **1** e **2** revelaram atividade de estreito espectro, frente às bactérias gram-positivas, na faixa de 64 e 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 3). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Hörner et al. (2008),<sup>4</sup> que ao analisar a CIM de 15 compostos trizenos, encontraram amplo espectro de atividade antibacteriana (cepas gram-positivas e gram-negativas) na faixa entre 32 e 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Dois anos após, Domingues et al. (2010),<sup>2</sup> analisando seis trizenos demonstraram que os compostos ensaiados apresentavam amplo espectro de atividade antibacteriana, na mesma faixa (32 e 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ombaka et al. (2012),<sup>32</sup> ao avaliarem 11 hidroxitrizenos, encontraram atividade antimicrobiana de estreito espectro, na faixa de 12,5 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , além da atividade antifúngica.

A complexação de metais de transição aos antibióticos vem sendo uma das estratégias dos pesquisadores, visando contornar o problema de resistência intrínseca ou

adquirida das bactérias.<sup>33</sup> Estudos de Anacona e Osorio (2008) envolvendo complexação de metais à sulfonamidas revelaram que os complexos obtiveram melhores atividades antibacterianas frente às cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853 quando comparadas às atividades dos antimicrobianos testados separadamente.<sup>34</sup>

Rocha et al. (2011)<sup>33</sup> complexaram metais de paládio(II) à tetraciclina e doxiciclina, observando que essa complexação foi responsável por 16 vezes e 2 vezes mais ação, respectivamente, frente à linha de *Escherichia coli* HB101/pBR322, quando comparadas com a droga livre.<sup>33</sup> Em nosso estudo, ao complexarmos Pd(II) com a sulfonamida também verificamos resultados semelhantes, uma vez que a complexação resultou em melhores atividades frente às amostras testadas, em comparação com a ação do ligante.

O provável mecanismo envolvido na atividade antibacteriana dos dois compostos ensaiados no nosso estudo pode ser o mesmo que Goswami e Purohit (2001),<sup>35</sup> Hörner et al. (2008)<sup>4</sup> e Ombaka et al. (2012)<sup>32</sup> citaram, ou seja, devido a sua capacidade quelante, os TZC formariam quelatos com constituintes da parede celular bacteriana, impedindo sua síntese.

O fato de apresentar fraca atividade frente às bactérias gram-negativas pode ser explicado devido a maior complexidade da parede celular, aliada ao fato, atualmente relatado, de que a pequena expressão de porinas na membrana externa dificultaria a entrada dos antimicrobianos para o interior das bactérias, tornando-as resistentes.<sup>36</sup>

Tabela 3 - Atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos triazenos **1** e **2** frente a cepas bacterianas ATCC e isolados clínicos MDR.

Cepas bacterianas ATCC / Isolados clínicos MDR	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	Composto1	Composto 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27859	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	>128	>128
<b><i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468</b>	<b>=64</b>	>128
<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299</b>	>128	<b>=64</b>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	>128	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>128	>128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	>128	>128



<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC14028	>128	>128
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	>128	>128
<b><i>Staphylococcus aureus</i> 1</b>	>128	<b>=128</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	>128	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	>128	>128
<i>Escherichia coli</i>	>128	>128
<i>Acinetobacter baumannii</i> 1	>128	>128
<i>Acinetobacter baumannii</i> 2	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1	>128	>128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2	>128	>128

ATCC: American Type Culture Collection; MDR: Multidrug Resistance; CIM: Concentração Inibitória Mínima

## Ensaio Citotóxicos

A citotoxicidade dos compostos **1** e **2** foi investigada frente a 22 amostras de aspirados de medula óssea de pacientes portadores de doença hematológica e 1 amostra controle. Das 23 amostras, 12 eram de pacientes do sexo feminino e 11 do masculino; 17 amostras foram provenientes de pacientes recém diagnosticados com leucemia, 4 de pacientes recidivantes ao tratamento e 1 amostra de fase acelerada. Em relação ao diagnóstico, a distribuição das amostras foi a seguinte: 10 de leucemia mielóide aguda (LMA), 7 de leucemia mielóide crônica (LMC), 1 leucemia linfóide aguda (LLA), 1 leucemia linfóide crônica (LLC) e 3 síndrome mielodisplásica (SMD) que, para fins estatísticos foram agrupados no grupo “outros” totalizando 5 amostras, e 1 amostra controle. Informações mais detalhadas acerca das amostras, como idade e cariótipo, podem ser vistas no Quadro 2 das informações suplementares. Na Tabela 4, encontram-se os resultados da análise estatística, considerando os tipos de leucemia, IC<sub>50</sub> e nível de significância (p-valor).

Tabela 4 – Comparação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) em relação aos diferentes tipos de leucemia

Diagnóstico	Composto IC <sub>50</sub> (mmol mL <sup>-1</sup> ) (DP)		p-valor
	1	2	
LMA	29,78 (28,53)	19,90 (22,97)	0,0833
LMC	27,83 (25,22)	7,51 (4,65)	0,0000
Outros	83,64 (62,36)	26,44 (32,29)	0,0014
Controle	14,05 (0)	11,54 (0)	0,0253

DP= Desvio-padrão; IC<sub>50</sub>= concentração necessária para atingir 50% de inibição do crescimento celular; Outros= 5 amostras: 1 LLA, 1 LLC e 3 SMD

Ao compararmos os dois compostos nos diferentes tipos de leucemia, através do teste de Mann-Whitney, foi possível verificar que existem diferenças significativas quanto aos efeitos citotóxicos entre as amostras de LMC, outros e controle ( $p < 0,05$ ).

Em todas as análises citotóxicas, o composto **2** obteve melhores resultados que o **1**, sendo 1,49 vezes mais ativo na LMA, 3,70 vezes na LMC e 3,16 no grupo outros. Estes resultados sugerem que a complexação com íons de Pd(II) contribuiu para melhorar a ação do composto, assim como já relatado em outros estudos anteriormente.<sup>20,37-40</sup>

Os compostos avaliados apresentaram melhor atividade frente às amostras de LMC, com valores de IC<sub>50</sub> entre 8,48 até 71,61 mmol mL<sup>-1</sup> para o ligante (**1**) e IC<sub>50</sub> de 1,069 até 13,83 mmol mL<sup>-1</sup> para o complexo (**2**). A amostra que apresentou IC<sub>50</sub>= 13,83 mmol mL<sup>-1</sup> era proveniente de um paciente recidivado ao tratamento convencional, além de apresentar cariótipo alterado, 48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9:22), sendo então classificado como um paciente com prognóstico desfavorável. (Quadro 2 das Informações Suplementares). Sugere-se que a variação das respostas apresentadas pelos compostos possa ser atribuída às diferenças citogenéticas das amostras dos indivíduos, visto que essa variação gênica interfere na eficácia e toxicidade do composto em estudo.<sup>41,42</sup>

Recentemente, um estudo de Moraes et al. (2013)<sup>39</sup> avaliou a citotoxicidade de compostos de Pd(II) frente à linhagem celular K562 (LMC Ph+) e amostras de sangue periférico de LMC, obtendo resultados bastante similares (IC<sub>50</sub>=1,2 mmol mL<sup>-1</sup>) aos que encontramos com o nosso composto, que também apresenta íons de Pd(II) complexado. Cabe

ressaltar que a metodologia empregada nessa pesquisa foi a mesma que adotamos (ensaio colorimétrico com MTT). Além disso, os autores encontram resultados dose-dependente.<sup>39</sup>

Nas amostras de LMA, a melhor  $IC_{50}$  encontrada para o composto **1** foi de 5,582  $mmol mL^{-1}$  ao passo que esse valor foi de  $IC_{50}= 0,309 mmol mL^{-1}$ , para o **2** (Quadro 2 das informações suplementares). Esses resultados são similares aos apresentados por um estudo publicado em 2010, no qual o potencial citotóxico dos TZC estudados frente à LMA, foi de  $IC_{50}= 1,83 mmol mL^{-1}$ . Além disso, também foi avaliada a  $IC_{50}$  do antineoplásico Dacarbazina<sup>®</sup> (DCZ), em corrente uso clínico, e foi verificado  $IC_{50}$  significativamente mais elevada ( $IC_{50}= 132,4 mmol mL^{-1}$ ).<sup>2</sup>

A LMA é o tipo de leucemia mais diagnosticada em adultos, sendo que o tratamento de primeira linha atualmente é a citarabina (antimetabólito que apresenta dois átomos de nitrogênio e é análogo à molécula de pirimidina), a qual induz remissão completa. Porém, quando ocorre resistência a longo prazo, um aumento da dose é necessária, manifestando-se efeitos colaterais mais agressivos. Esses fatos justificam o envolvimento dos grupos de pesquisa atuais na síntese de novas moléculas com atividade antineoplásica.<sup>43,44</sup>

Os compostos TZC aqui estudados apresentaram satisfatórios resultados de  $IC_{50}$ , os quais podem ser comparados aos de literatura atual e atribuídos ao grupamento triazeno,<sup>2,6,45</sup> à complexação com íons de Pd(II)<sup>19-22,46</sup> e ao grupamento sulfonamida.<sup>47,48</sup>

DCZ e Temozolomida<sup>®</sup> são compostos triazenos que constituem tratamento de primeira linha para melanoma metastático e glioma, respectivamente.<sup>3,49</sup> O mecanismo de ação deles está relacionado, em termos quantitativos, com a posição N<sup>7</sup> da guanina. Porém, a metilação da posição O<sup>6</sup>-guanina mediada pelo íon metildiazônio (em torno de 9% do produto formado), é considerada a principal posição responsável pelos efeitos citotóxicos dos TZC.<sup>3,50</sup> No caso dos dois compostos analisados nesse estudo, somou-se o efeito do grupamento triazeno com o dos íons de Pd.

## Experimentos

### Material e métodos

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos por um espectrômetro de ressonância magnética e nuclear da marca BRUKER<sup>®</sup> DPX-400, e foram registrados em 400 MHz. Os espectros de absorção do infravermelho foram realizados em pastilhas de brometo de potássio (KBr). O aparelho utilizado foi Espectrômetro Bruker Tensor 27 que abrange a região de 370

– 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram registrados na região de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . A análise de espectros eletrônicos foi realizada em um espectrofotômetro de Ultravioleta e Visível (UV-Vis) Shimadzu, em soluções de dimetilsulfóxido. Os espectros foram registrados na região de 590 – 190  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Análise estrutural difração de raios X**

Os dados de difração de Raios X foram coletados em um difratômetro Bruker Kappa Apex II CCD (Charge Coupled Device detector). A radiação usada foi de Mo-K $\alpha$  de comprimento de onda ( $\lambda$ ) igual a 0.71073 Å, e um monocromador de grafite, e foram utilizados monocristais dos complexos triazenidos fixados em fio de vidro para coleta de dados. A redução de dados e a correção de absorção envolveram os programas SAINT e SADABS,<sup>51</sup> respectivamente. As estruturas foram resolvidas via Métodos Diretos e o refinamento dos dados incluiu fatores estruturais ao quadrado ( $F^2$ ) e o método dos mínimos quadrados incluindo matrizes completas, empregando-se parâmetros térmicos anisotrópicos para os átomos não-hidrogenóides.<sup>52,53</sup> Após a redução dos dados o grupo espacial foi determinado pelo programa XPREP (APEX II). Tabelas com parâmetros cristalográficos e detalhes referentes às coletas de dados e refinamentos das estruturas foram geradas com o programa WingX.<sup>54</sup> As representações gráficas das estruturas foram geradas com o programa DIAMOND.<sup>55</sup> As coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio dos anéis fenila foram obtidas geometricamente [ $\text{C}(sp^2)\text{-H} = 0.93 \text{ \AA}$ ], [ $\text{N}(sp^3)\text{-H} = 0.89 \text{ \AA}$ ] e refinados na forma anexada aos respectivos átomos de carbono e nitrogênio, incluindo parâmetros térmicos isotrópicos, com valores  $U_{\text{ISO}}(\text{H})$  relacionados a  $1.2 U_{\text{eq}}\text{C}sp^2$ ,  $1.2 U_{\text{eq}}\text{N}sp^2$  e  $1.2U_{\text{eq}}\text{N}sp^3$ , respectivamente.<sup>53</sup>

### **Síntese**

#### **Síntese do pré-ligante 1,3-Bis(4-sulfonamidafenil)triazeno (1)**

Uma solução de 4-aminobenzenosulfonamida (5,65 mmol, 0,86 g) em acetonitrila (15 mL), foi mantida a uma temperatura de 0°C e sob agitação constante. Nestas condições foi adicionado, lentamente, nitrito isoamílico (3 mmol, 0,3515g; 0,404 mL). O meio de reação foi mantido sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. O precipitado formado foi extraído com THF purificado e isolado a pressão reduzida. O composto (1) foi purificado por coluna

cromatográfica (sílica gel), hexano/acetona 50%, e recristalizado em DMSO, originando monocristais com forma de blocos amarelos aptos a difração de raios X para análise estrutural cristalina e molecular. Foi obtido sólido amarelo. Rendimento baseado na 4-aminobenzenosulfonamidade: 95% ( $m = 0,9538\text{g}$ ;  $2,684\text{ mmol}$ ). Estável ao ar e a temperatura ambiente; P.F =  $164\text{-}166^\circ\text{ C}$ ; A.E. (%) para CHN:  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $355,393\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ : C 41,84 (calculado 40,55), H 4,6 (calculado 3,69), N 16,57 (calculado 19,70). IR em KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$  3477;  $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)_{\text{Amida}}$  3384;  $\nu(\text{N-H})_{\text{Triazeno}}$  3319;  $\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$  3242;  $\nu(\text{NH})$  1625;  $\delta(\text{Anel aromático})$  1596;  $\delta(\text{N-H})_{\text{Triazeno}}$  1502;  $\nu(\text{N=N})$  1444;  $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$  1400;  $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$  1311;  $\nu(\text{N-N})$  1147;  $\delta(\text{NH}_2)_{\text{Amida}}$  1091;  $\nu(\text{S-N})$  891;  $\nu(\text{Aromáticos } para\text{-substituidos})$  825;  $\delta(\text{SO}_2)$  540. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 12,99$  (s,  $J = 12,99\text{ Hz}$ , 1H, NH) ppm; 7,86 – 7,31 (m, 4H, ArH); 6,89 (s,  $J = 6,89\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ); 6,62 (d,  $J = 8,7\text{ Hz}$ , 4H, ArH); 5,75 (s, 2H,  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 152,87$ ; 131,10; 128,48; 113,59; 40,60. UV-Vís:  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (MeOH) 210; 262; 363 ( $\epsilon_{363} = 5,56 \times 10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

**Síntese de  $\{trans\text{-Bis}[1,3\text{-bis}(4\text{-sulfonamidafenil)triazenido-}\kappa\text{N}^1]\text{bis}(\text{piridina-}\kappa\text{N})\text{paládio(II)}\}\{\text{tetra}(\text{piridina-}\kappa\text{N})\text{paládio(II)}\}\text{bis}(\text{potássio})\cdot\text{monohidratado (2)}$**

Dissolveu-se o ligante **1** (0,2 mmol, 0,072 g) em acetonitrila e dimetilsulfóxido (4:1) (10 mL) seguindo a desprotonação do ligante com 5 gotas de solução de hidróxido de potássio em metanol (1g de KOH em 10 mL de metanol), obtendo-se uma solução amarelo-alaranjada. Em seguida, adicionou-se solução de cloreto de paládio(II) –  $\text{PdCl}_2$  (0,3 mmol, 0,054g), em uma mistura de acetonitrila e piridina (1:6) (7 mL). A solução resultante de coloração alaranjada foi mantida sob agitação constante por 6 horas. Cristais amarelos de forma hexagonais, aptos à difração de raios X, foram obtidos por evaporação lenta do solvente. Estável ao ar e a temperatura ambiente; P.F. =  $194\text{-}198^\circ\text{ C}$ ; A.E. (%) para CHN:  $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_{16}\text{S}_4\text{O}_9\text{Pd}_2\text{K}_2$ ,  $1496,453\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ : C 41,59 (calculado 43,34), H 4,07 (calculado 4,04), N 13,74 (calculado 14,97). IR em KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)_{\text{Amida}}$  3340;  $\nu(\text{N-H})_{\text{Triazeno}}$  3242; Amida secundária overtone 3022;  $\delta(\text{Anel aromático})$  1596;  $\nu(\text{N=N})$  1454;  $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$  1417;  $\nu\text{Py}$  1352;  $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$  1288;  $\nu(\text{N-N})$  1209;  $\delta(\text{NH}_2)_{\text{Amida}}$  1093;  $\nu(\text{S-N})$  891;  $\nu(\text{Aromáticos } para\text{-substituidos})$  835;  $\nu(\text{NH})_{\text{Amida secundária}}$  763;  $\nu(\text{Aromáticos monossustituidos})$  do anel piridina 698;  $\delta(\text{SO}_2)$  553. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 9,34$  (d, 1H,  $\text{S}(\text{O})_2\text{NH}$ ); 8,75 (d,  $J = 22,6\text{ Hz}$ , 8H, ArH); 8,57 (s, 6H, ArH); 8,40 (s, 1H, NH); 7,93 (d,  $J = 39,7\text{ Hz}$ , 10H, ArH); 7,77 (s, 9H, ArH); 7,66 (s, 1H,  $\text{S}(\text{O})_2\text{NH}$ ); 7,55-7,35 (m, 15H, ArH); 7,26 (d,  $J = 14,4\text{ Hz}$ , 9H, ArH). RMN  $^{13}\text{C}$ : (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta = 153,90$  (d,  $J = 15,5\text{ Hz}$ ); 153,58 (s); 150,59 (s); 140,45

(s); 137,14 (s); 128,06 (s); 127,23 (s); 126,78 (s); 126,49 (s); 124,94 (s). UV-Vís:  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (DMSO): 270; 312; 405 ( $\epsilon_{405} = 6,95 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

## Testes biológicos

### Ensaio Antibacterianos

A atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a 21 amostras de espécies bacterianas sendo 11 cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e 10 isolados clínicos multirresistentes (MDR). As cepas padrões testadas foram: *Bacillus cereus* 14579, *Enterococcus faecalis* 29212, *Enterococcus faecalis* 51299, *Escherichia coli* 35218, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Micrococcus luteus* 7468, *Pseudomonas aeruginosa* 27859, *Salmonella thyphimurium* 14028, *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus epidermidis* 12228 e *Staphylococcus saprophyticus* 15305. Os isolados clínicos foram provenientes da rotina do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria e identificados através do sistema automatizado MicroScan<sup>®</sup> - SIEMENS como espécies multirresistentes, de acordo com a ANVISA em seus critérios da nota técnica nº1/2010.<sup>56</sup> *Staphylococcus aureus* (2 isolados), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (2 isolados), *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* (2 isolados) e 2 amostras de *Staphylococcus epidermidis* constituíram os isolados MDR testados.

O teste de suscetibilidade antimicrobiana utilizado foi a microdiluição em caldo Mueller Hinton para determinar da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual representa a menor concentração do composto testado capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo após 24 horas de incubação. Essa metodologia segue o protocolo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2012.<sup>57</sup> Inóculos bacterianos foram preparados por meio da diluição das bactérias com solução salina estéril até atingir o padrão de turbidez 0.5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), ajustada após leituras em espectrofotômetro a 625 nm. Os compostos foram diluídos em água/etanol na proporção 1:1. Após, 100 $\mu\text{L}$  desses inóculos foram pipetados em uma placa de 96 poços contendo caldo Mueller Hinton e o composto diluído. Posteriormente, foram realizadas sucessivas diluições em série, de modo a atingir dez diferentes concentrações dos compostos em cada ensaio (0,25 a 128  $\text{mg mL}^{-1}$ ). As microplacas foram então incubadas por 24 horas em estufa de  $35 \pm 2^\circ \text{ C}$ . Após a incubação, 10  $\mu\text{L}$  de cloreto de 2,3,5 -trifeniltetrazólio (CTT) à 2% foram adicionados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (CLSI, 2012)

### **Ensaio Antitumoral *In Vitro***

O teste de citotoxicidade foi analisado em triplicata através do ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) descrito por Mosmann (1983).<sup>58</sup> As amostras de medula óssea eram excedentes da rotina clínica do Laboratório de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brasil. Foram coletadas 23 amostras a partir do aspirado de medula óssea, sendo que 18 destas eram de pacientes sem tratamento antineoplásico prévio, com suspeita de leucemia; 4 amostras de pacientes recidivantes ao tratamento convencional e 1 amostra de paciente sem leucemia, usada como controle. O ensaio utilizou as células mononucleares as quais foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF-Gibco<sup>®</sup>), penicilina G 100U ml<sup>-1</sup> e sulfato de estreptomicina 100 ug ml<sup>-1</sup>, a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. A fim de verificar a viabilidade das células, foi adicionado o corante azul de tripano na proporção 1:6 de suspensão celular. A quantidade das células viáveis foi verificada em câmara de Neubauer com aumento de 400X e a concentração das células foi ajustada para 3x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>.

Os compostos testados foram previamente dissolvidos em água/etanol 1:1 até as concentrações 100, 50 e 12,5 mmol mL<sup>-1</sup>. A fim de analisar o efeito citotóxico dos compostos, foram pipetados em microplacas de 96 poços: 3x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> por poço, meio RPMI e as diferentes concentrações dos compostos. Essas microplacas foram incubadas durante 20 horas a 37 ° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguida de adição de 10µL da solução de MTT (5 mg mL<sup>-1</sup>) e posterior incubação nas mesmas condições por 4 horas. Dimetilsulfóxido (100 µL) foi adicionado às placas após as 24 horas de incubação. A inibição do crescimento celular foi determinada a partir da leitura de absorbância de cada poço a 570 nm utilizando o leitor de microplacas Epoch<sup>®</sup>, comparando com o controle negativo não tratado. A IC<sub>50</sub> refere-se à concentração do composto necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular. Para determinar a IC<sub>50</sub>, os dados experimentais utilizando análise de regressão não linear foram inseridos no programa GraphPadPrism 5.0, revelando assim a IC<sub>50</sub> nas diferentes concentrações do composto das diferentes amostras.

### **Conclusões**

A estrutura cristalina do ligante (**1**) demonstra a formação de *synthons* supramoleculares por meio de ligações de hidrogênio clássicas envolvendo átomos do grupamento sulfonamida. Contudo, na combinação destas interações, pode-se observar a formação de arranjos supramoleculares 3-D, importantes nos estudos da farmacologia e na engenharia de cristais. No estado sólido do complexo **2**, ocorre a formação de túneis hexagonais com diâmetros de aproximadamente 47 Å. Os compostos **1** e **2** apresentaram atividade antibacteriana de estreito espectro direcionada às espécies gram-positivas. Os dois compostos mostraram significativos efeitos citotóxicos nas amostras testadas e o composto **2** apresentou menor  $IC_{50}$  que o **1** (Quadro 2 - informações suplementares). Houve diferenças significativas das respostas entre **1** e **2** nas amostras de LMC, outros e controle. Estatisticamente existe diferença significativa ao compararmos a porcentagem de morte celular entre os dois compostos, nas concentrações de 12,5 e 50  $nmol mL^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5 – informações suplementares). Apresentamos dois TZC com promissores resultados citotóxicos os quais podem estar associados, sinergicamente, à presença do grupamento triazeno, à sulfonamida e aos íons de paládio, constituindo agentes com potencialidade antineoplásica.

### Informações Suplementares

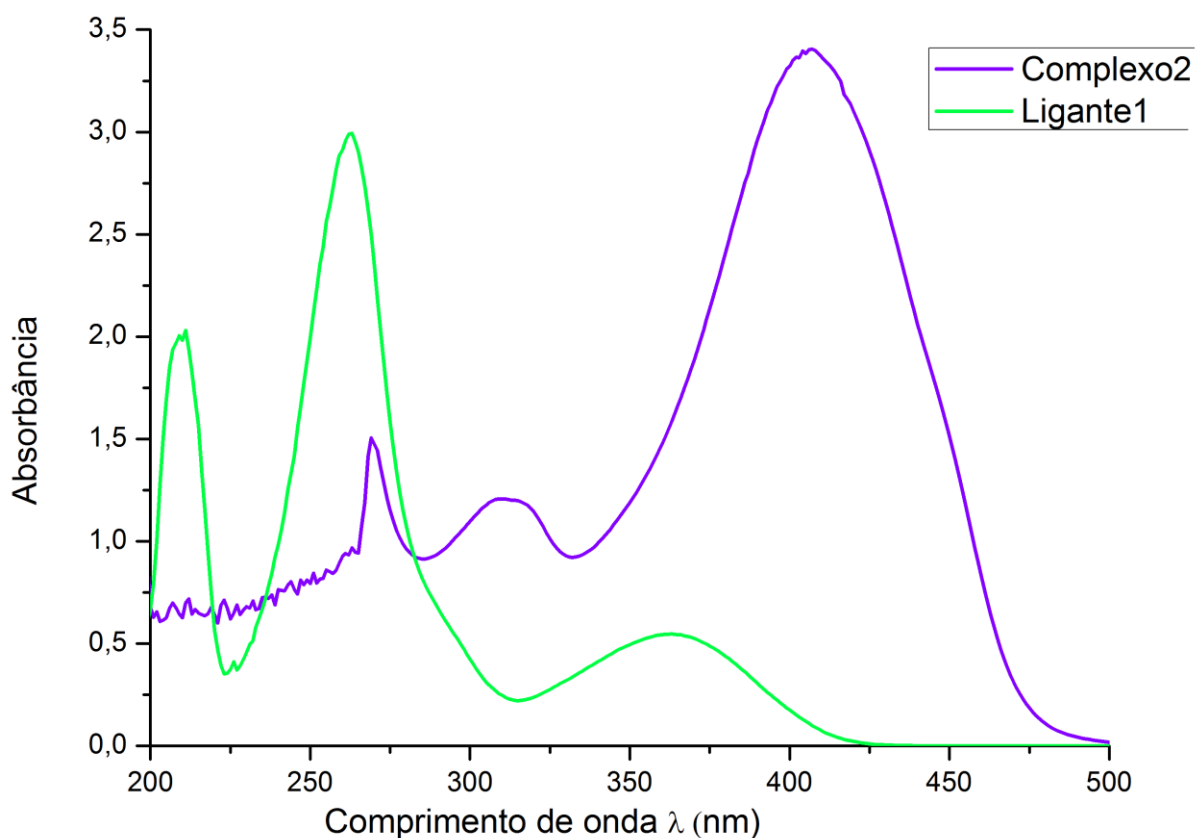




Figura 3: Espectro com comparação de espectro UV-Vís do ligante **1** e do complexo **2** nas concentrações de 145,6 e 60,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

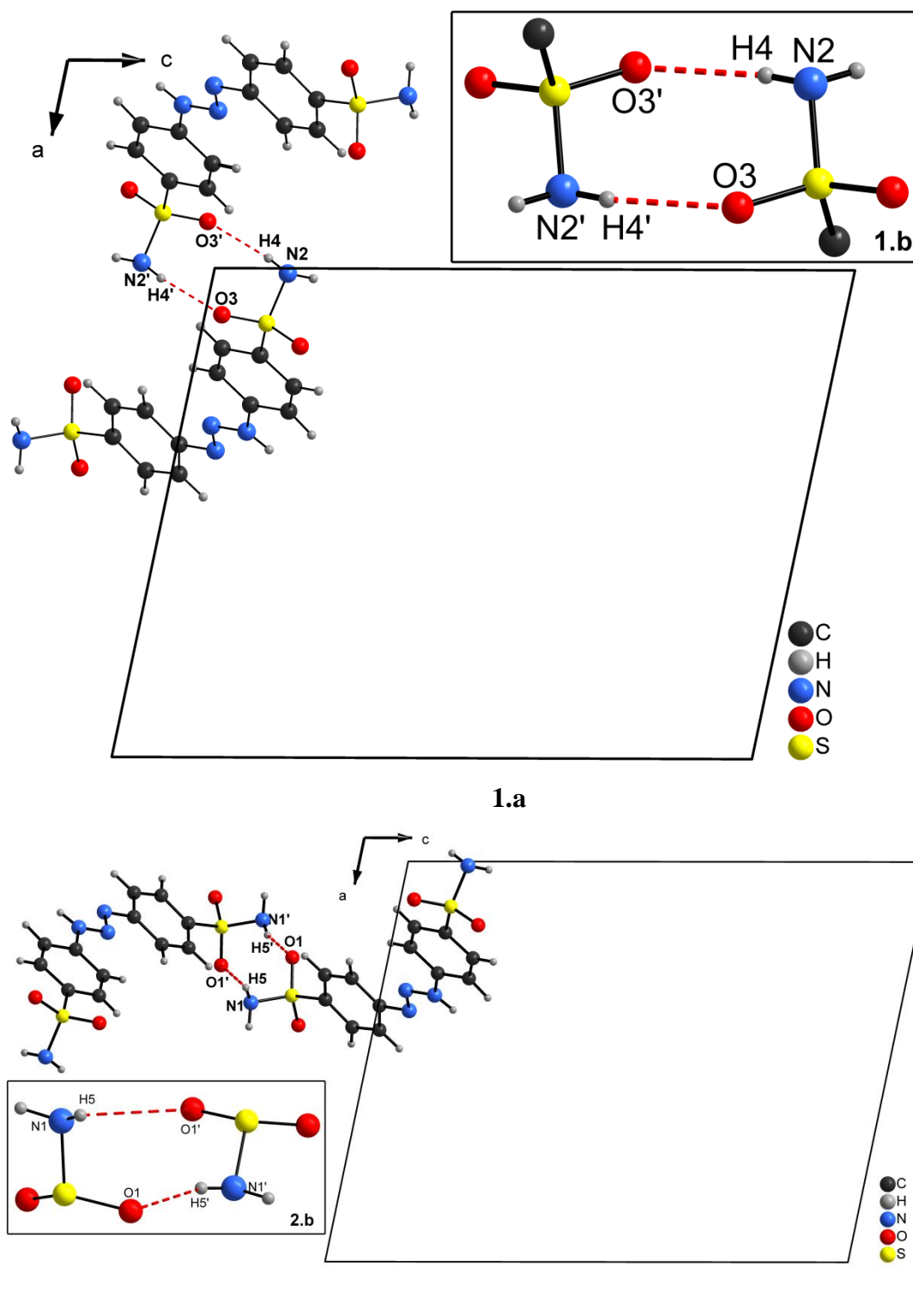


Figura S.1 - Projeção no eixo cristalográfico *b* dos dímeros centrossimétricos formando *synthons supramoleculares* por ligações de hidrogênio clássicas (1.a) N2-H4...O3 e (2.a)

N1–H5•••O1. Em (1.b) e (2.b) são destacados os anéis designados  $R^2_2(8)$  formados pelas ligações de hidrogênio. Códigos de simetria: (‘):  $[-x, 2-y, -z]$  (1.a) e  $[\frac{1}{2}-x, \frac{1}{2}+y, -\frac{1}{2}-z]$  (2.a).

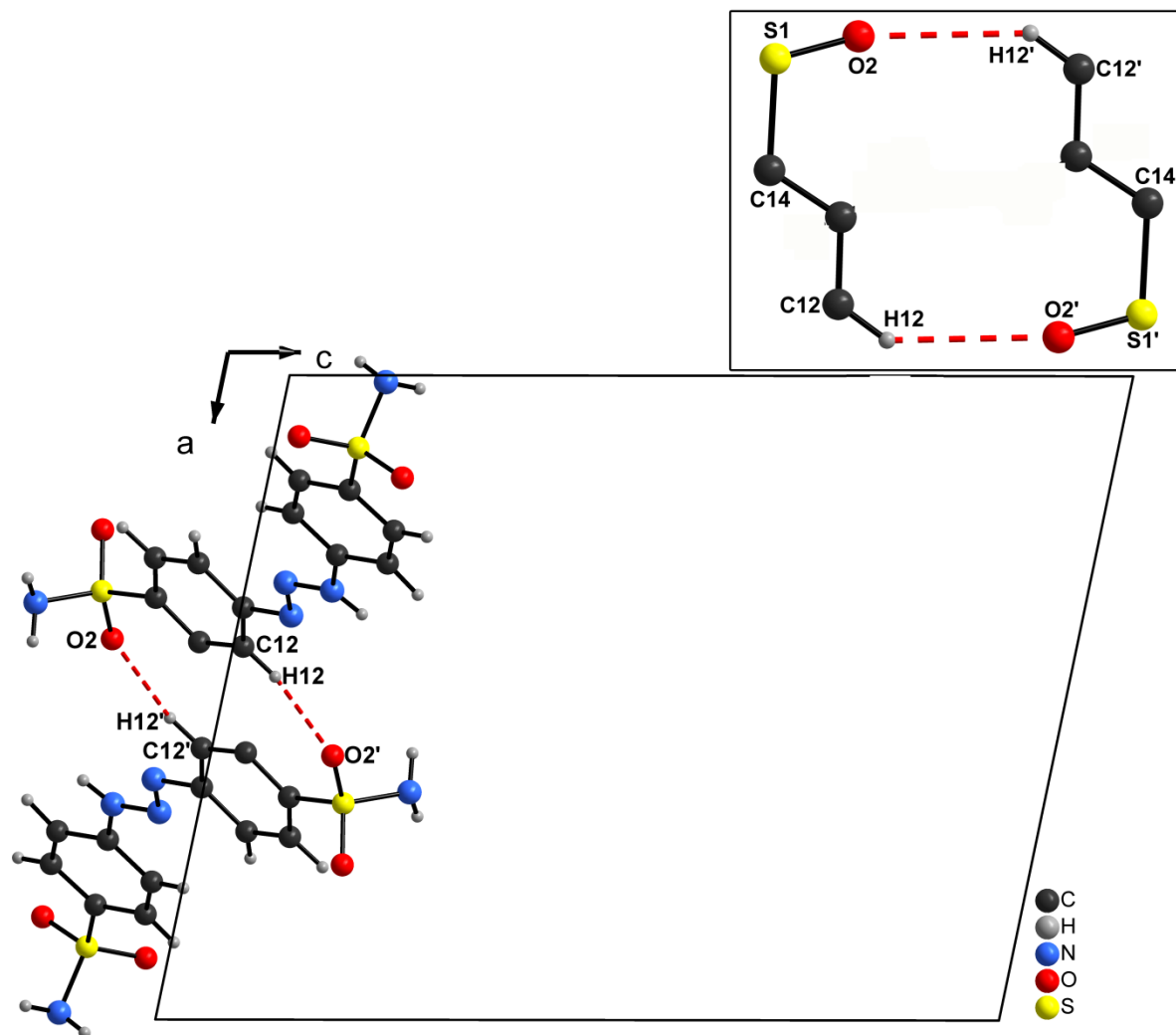


Figura S.2 - Projeção no eixo cristalográfico  $b$  dos dímeros centrossimétricos formando *synthons supramoleculares* por ligações de hidrogênio clássicas C12–H12•••O2. Destaque para o anel formado designado  $R^2_2(12)$  formado por ligações de hidrogênio. Códigos de simetria: (‘):  $1-x, 5-y, -z$ .

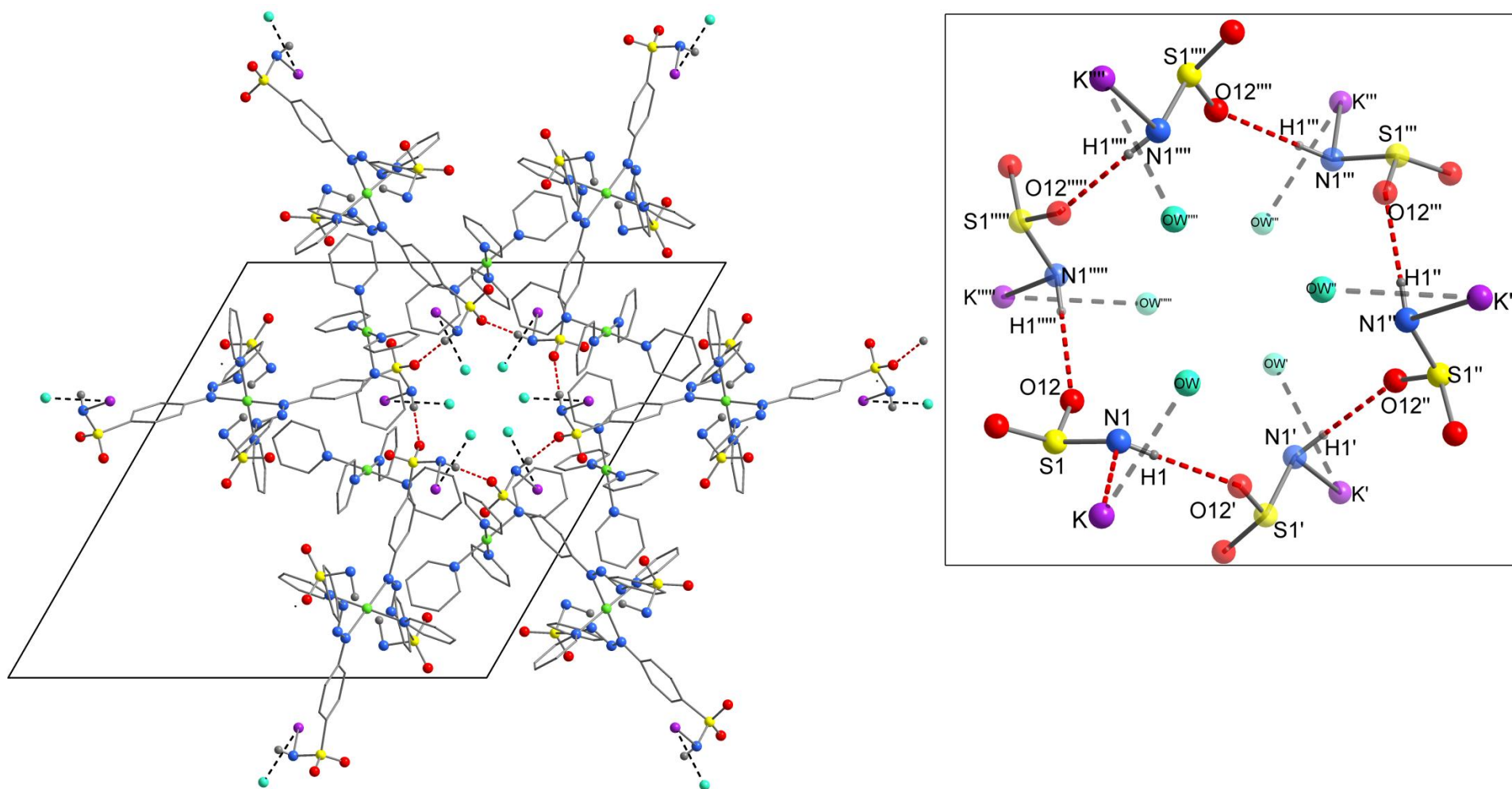


Figura S.3 - Projeção do arranjo com destaque do anel formado por ligações de hidrogênio do grupamento sulfonamida. Átomos de hidrogênio aromáticos foram omitidos para melhor visualização. Códigos de simetria: ('):  $1,33+y, 0,66-x+y, -0,33-z$ ; (''):  $2-x+y, -x, z$ ; (''):  $1,33-x, -1,33-y, -0,33-z$ ; (''''):  $-y, -2+x-y, z$ ; (''''''):  $-0,66+x-y, -1,33+x, -0,33-z$ .

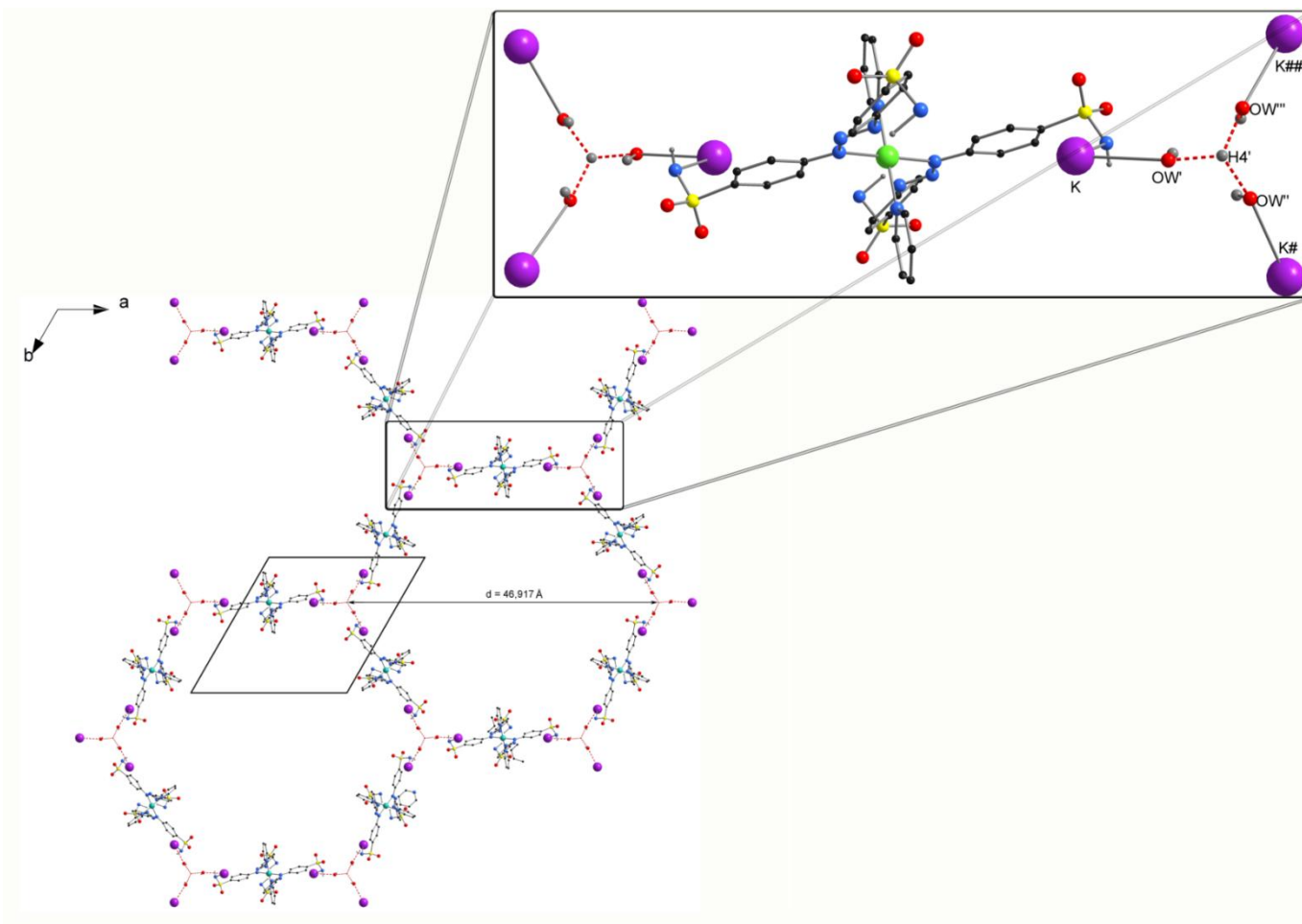


Figura S.4 - Projeção dos túneis hexagonais gerados pelo empacotamento de moléculas com visualização no plano cristalográfico *ab*. Destaque das interações intermoleculares  $K \cdots O \cdots HW$  responsáveis pela formação de cavidades hexagonais. Códigos de simetria: ('):  $0,333+x, -0,333+y, -0,333+z$ ; ('):  $1,333-x+y, -0,333-x, -0,333+z$ ; ("):  $0,333-y, -1,333+x-y, -0,333+z$ ; (#):  $2-x+y, -x, z$ ; (##):  $-y, -2+x-y, z$ .

Antimicrobiano	1. <i>S.aureus</i> ★ *	2. <i>S.aureus</i> ★ *	3. <i>P.aeruginosa</i> ■	4. <i>K.pneumoniae</i> ★	5. <i>K.pneumoniae</i> ★	6. <i>E. coli</i> ▲	7. <i>A.baumannii</i> ●	8. <i>A.baumannii</i> ●	9. <i>S.epidermidis</i> ★ ◆	10. <i>S.epidermidis</i> ★ ◆
Amicacina	–	–	R	R	I	R	R	I	–	–
Amoxicilina/Clavulonato	R	R	–	R	R	R	–	–	–	–
Ampicilina/Sulbactam	R	R	–	R	R	R	R	I	–	–
Ampicilina	Blac	Blac	–	R	R	R	–	R	–	–
Aztreonam	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefazolina	R	R	–	–	–	–	R	R	–	–
Cefalotina	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefepime	–	–	–	R	R	R	–	–	–	–
Ceftazidime	–	–	R	R	R	R	R	R	–	–
Ceftriaxona	R	R	–	R	–	–	–	–	–	–
Cefoxitina	–	–	–	–	–	–	R	R	R	R
Cefuroxime	–	–	–	–	R	R	–	–	–	–
Ciprofloxacino	–	–	R	R	R	R	R	R	S	S
Clindamicina	R	R	–	–	–	–	–	–	S	S
Daptomicina	S	S	–	–	–	–	–	–	–	–
Eritromicina	R	R	–	–	–	–	R	R	S	R
Ertapenem	–	–	R	S	–	R	–	–	–	–
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Imipenem	R	R	R	S	S	S	R	I	–	–
Levofloxacino	R	R	–	–	R	R	R	R	S	S
Linezolid	S	S	–	–	–	–	–	–	S	S
Meropenem	R	R	R	S	S	–	R	R	–	–
Nitrofurantoina	–	–	–	–	–	R	–	–	S	S
Norfloxacino	–	–	–	–	–	–	–	–	S	S
Oxacilina	R	R	–	–	–	–	–	–	R	R
Penicilina G	Blac	Blac	–	–	–	–	–	–	R	R
Piperacilina/Tazobactam	–	–	–	–	R	R	–	–	–	–
Polimixina B	–	–	S	–	–	–	–	S	–	–
Rifampicina	R	R	–	–	–	–	–	–	S	S
Sulfametoxazol/trimetropina	R	S	–	R	R	R	R	R	R	S
Teicoplanina	–	S	–	–	–	–	–	–	S	S
Tetraciclina	–	–	–	–	–	–	–	–	R	R
Ticarclina/Clavulonato	–	–	R	–	R	S	R	R	–	–
Tigeciclina	–	–	–	–	–	–	–	–	R	S
Tobramicina	–	–	R	–	R	R	S	S	–	–
Vancomicina	S	–	–	–	–	–	–	–	S	S

Quadro 1– Perfil de sensibilidade, espécime clínico e genes de resistência dos isolados clínicos.

R: resistente, S: sensível, I: intermediário, Blac: Beta-lactamase positiva; –: não testado

Isolados clínicos de ★:sangue periférico; ■: escarro; ●: secreção traqueal; ▲: urina

Expressão dos genes: \*: *mecA*; ◆: *icaD*

Pcte	S	Idade	Diagn	Status	Citogenética	Progn	% Viabilidade Celular						IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> )	
							Composto 1			Composto 2			(1)	(2)
							100	50	12,5	100	50	12,5		
1	F	63	LMA-M7	Recid	46,XX	INT	11,30	-	35,77	37,68	-	28,29	7,338	7,239
2	F	48	LMC	Diagn	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	SVP	-	32,37	37,69	80,60	-	14,41	10,77	6,108
3	F	67	LLC	Tb	46,XY	SVP	76,84	61,42	72,01	37,72	37,06	73,13	151	38,41
4	F	49	LMC	Diagn	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	SVP	29,22	73,33	81,53	20,55	53,44	18,10	<b>71,61</b>	9,156
5	F	-	LMC	Diagn	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	SVP	26,23	51,92	27,95	54,17	19,47	36,03	15,05	13,83
6	F	-	Controle	N	46,XX	SVP	8,96	52,01	33,70	37,08	43,00	23,27	14,05	11,54
7	M	55	SMD	T	-	INC	32,06	43,60	39,69	6,54	23,80	23,98	20,09	5,402
8	M	14	LMA-M4	Diagn	46,XY,inv(16)(p13q22)[04]/47,sl,+22[04]/48,sdl1,+8[04]/50,sdl2,+7[04]	DESF	17,47	18,01	34,16	11,21	19,94	20,02	8,04	4,406
9	M	78	LMC	Diagn	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	SVP	12,39	29,51	31,35	7,34	6,73	5,66	<b>8,488</b>	<b>1,069</b>
10	F	30	LMA-M3	Recid	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	fav	82,54	19,05	8,93	20,04	0	0	5,582	0,309
11	M	17	LMA-M3	Diagn	Teste Fish t(15,17)	FAV	14,86	94,22	45,50	29,36	27,80	78,99	55,61	31,31
12	M	77	LMA-M4	Diagn	46,XY	INT	42,43	26,84	31,33	40,33	21,06	24,66	11,62	7,589
13	M	66	LMA-M2	Diagn	44~45,XY,del(4)(q24)[4],-7[5],-15[9],-16[4],-18[8],+r[7],+mar[6][cp10]	DESF	39,67	73,53	90,07	59,67	56,87	65,67	93,04	81,69
14	M	45	LMC	C. blást.	48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)	DESF	39,63	38,37	29,67	34,94	35,51	31,96	13,99	<b>13,14</b>
15	M	51	LMA-M5	Recid	46,XY	INT	51,79	-	51,33	34,94	35,51	31,96	14,22	13,14
16	F	49	LMA-M5	Diagn	46,XX	INT	37,65	54,75	41,61	47,22	38,93	34,46	32,32	19,84
17	M	46	LMC	Diagn	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	SVP	34,51	27,30	39,03	26,13	28,98	22,61	13,79	6,919
18	M	52	LMA-M2	Diagn	46,XY	INT	43,80	35,48	27,33	27,87	24,16	71,49	12,58	25,58
19	F	66	SMD	Diagn	-	-	73,44	48,69	64,77	51,40	68,56	60,61	94,48	82,62
20	F	26	LMC	Diagn	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	SVP	44,18	60,61	62,76	0	1,73	17,14	61,13	2,356
21	M	82	SMD	T	mn(40~44)[14]/mn(70~80)[9]/mn(81~87)[2]	DESF	65,64	74,74	72,77	0,32	0	0	144,7	0,004
22	F	61	LLA-B	Diagn	45,XX,-10	DESF	35,25	23,25	26,15	24,85	18,25	23,56	7,959	5,77
23	F	70	LMA-M4	Diagn	46,XX,16qh+	INT	61,38	43,01	60,57	25,65	31,41	24,84	57,47	7,959

Quadro 2 – Perfil das amostras, citogenética, viabilidade celular e IC<sub>50</sub> dos compostos (1) e (2)

Pcte: paciente; S: Sexo (F: feminino; M: masculino); Diagn: diagnóstico (LMA: Leucemia Mielóide Aguda, com seus subtipos M2, M3, M4, M5 e M7, LMC: Leucemia Mielóide Crônica, LLC: Leucemia Linfóide Crônica, SMD: Síndrome Mielodisplásica, LLA-B: Leucemia Linfóide Aguda de células B); Status: (C. Blast.: crise blástica; Diagn: amostra de diagnóstico, Tb: transformação blástica, N: normal, T: transformada); Progn: prognóstico (INT: intermediário, SVP: sem valor prognóstico, DESF: desfavorável, FAV: favorável, INC: inconclusivo; IC<sub>50</sub>: Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular.

Tabela 5 - Análise da viabilidade celular (VC) e IC<sub>50</sub> entre os compostos **1** e **2** em pacientes de diagnóstico

Composto e concentração ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )	Status		
	Diagnóstico		
	% VC Média ou IC <sub>50</sub> *	DP	p-valor
<b>1</b> 12,5	45,43	(20,41)	0,0081
<b>2</b> 12,5	31,77	(22,82)	
<b>1</b> 50	46,76	(20,77)	0,0092
<b>2</b> 50	28,20	(18,30)	
<b>1</b> 100	40,01	(21,42)	0,1462
<b>2</b> 100	31,11	(19,68)	
<b>1</b> IC <sub>50</sub>	40,21*	(43,32)	0,0000
<b>2</b> IC <sub>50</sub>	17,19*	(22,33)	

DP: desvio-padrão; % VC média: porcentagem de viabilidade celular média; IC<sub>50</sub>: Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular.

## Agradecimentos

Agradecemos o apoio do CNPq (processo nº 305254/2009-0), da CAPES e do setor de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

## Referências

- Hörner, M.; Brancher, AL; Silva, A.; Bordinhão, J.; Mössmer, CM. *Acta Cryst*, **2004**, C. 60, o-303.
- Domingues, VO; Hörner, R.; Reetz, LGB; Kuhn, F.; Coser, VM; Rodrigues, JN; Bauchspiess, R.; Pereira, WV; Paraginski, GL; Locatelli, A.; Fank, JO; Giglio, VF; Hörner, M. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 2226.
- Marchesi, F.; Turriziani, M.; Tortorelli, G.; Avvisati, G.; Torino, F.; Vecchis, L. *Pharmacological Research*, **2007**, 56, 275.

4. Hörner, M.; Giglio, VF; dos Santos, AJRWA; Westphalen, AB; Iglesias, BA; Martins, PR; do Amaral, CH; Michelot, TM; Reetz, LGB; Bertoncheli, CM; Paraginski, GL; Hörner, M. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2008**, *44*, 441.
5. Rizzieri, D.; LoRusso, S.; Tse, W.; Khan, K.; Advani, A.; Moore, J.; Karsten, V.; Cahill, A.; Gerson, S. L.; *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2010**, *10*, 211.
6. Bonmassar, L.; Marchesi, F.; Pascale, E.; Franzese, O.; Margison, G. P.; Bianchi, A.; D'Atri, S.; Bernardini, S.; Lattuada, D.; Bonmassar, E.; Aquino, A.; *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2389.
7. Stewart, RDH; Anderson, DE. *British Medical Journal.* **1965**, *2*, 682.
8. Gerlbrich, T.; Bingham, AL; Threlfall, TL; Hursthouse, MB. *Acta Cryst. Section C, Crystal Structure Communications.* **2008**, *C64*, o205.
9. Bruton, LL; Lazo, JS; Parker, KL. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 2007.
10. Brandão, HN. *Quim. Nova*, **2010**, *33*, 1359.
11. Oliveira, LC. *Rev. Bras. Canc.*, **2012**, *58*, 695.
12. Zhu, W.; Liu, Y.; Zhai, X.; Wang, X.; Zhu, Y.; Wu, D.; Zhou, H.; Gong, P.; Zhao, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 162.
13. Chambers, HF; Deleo, FR. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 629.
14. Chopra, I. *J Anticrib. Chemother.*, **2012**, *68*, 496.
15. Kavailini, P.; Prabhakaran, R.; Dallemer, F.; Poornima, P.; Vaishnavi, E.; Ramachandran, E.; Padma, VV; Renganathan, R.; Natarajan, K. *Metallomics*, **2012**, *4*, 101.
16. Gaynor, D.; Griffith, DM. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 13239.



17. Barreiro, EJ. *Rev. Virtual Quím.*, **2009**, *1*, 26.
18. Pereira, MM; Moreno, MJM. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, **2010**, *116*, 35.
19. Budzisz, E.; Krajewska, U.; Rozalski, M.; Szulawska, A.; Czyz, M.; Nawrot, B. *Eur. J. Pharmacology*, **2004**, *502*, 59.
20. Abu-Surrah, AS; Al-AS'Doni, HH; Abdalla, MY. *Cancer Therapy*, **2008**, *6*, 1.
21. Zmejkovski, BB; Kaluderovic, GN; Gómez-Ruiz, S.; Zizak, Z.; Steinborn, D.; Schmidt, H.; Paschke, R.; Juranic, ZD. *Eur J Med Chem*, **2009**, *44*, 3452.
22. Li, L.; Zang, J.; Ma, L.; Zhang, Z.; Wang, S.; Li, S.; Zhou, G. *J. Coord Chem*, **2013**, *66*, 638.
23. Biswas, C.; Zhu, M.; Lu, L.; Kaity, S.; Das, M.; Samantha, A.; Naskar, JP. *Polyhedron*, **2013**, *56*, 211.
24. Hörner, M.; Visentin, LC; Dahmer, M.; Bordinhao, J. *Acta Cryst.*, **2002**, *C58*, m286.
25. Adrian, RA; Gonzalez, DM; Tiekink, ERT; Walmsley, JA; *Acta Cryst.*, **2010**, *E66*, m957.
26. Etter, MC; *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, 120.
27. Akiri, K.; Cherukuvada, S.; Rana, S.; Nangia, A.; *Cryst. Growth Des*, **2012**, *12*, 4567.
28. Steiner, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 49.
29. Pavia, DL; Lampman, GM; Kriz, GS; Vyvyan, JR; *Introdução a Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana*, Cengage Learning, **2010**.
30. Masoud, MS; Ali, AE; Shaker, MA; Ghani, MA *Spectrochimica Acta Part A*, **2005**, *61*, 3102.

31. Xie, X.; Chen, J.; Xu, W.; He, E.; Zhan, S.; *Inorganica Chimica Acta*, **2011**, 373, 276.
32. Ombaka, AO; Muguna, AT; Gichumbi, JM. *J. Environ Chem Ecotoxicol.*, **2012**, 4, 133.
33. Rocha, DP; Pinto, GF; Ruggiero, R.; de Oliveira, CA; Guerra, W. *Quim. Nova*, **2011**, 34, 111.
34. Anacona, JR; Osorio, I. *Trans. Met. Chem.* **2008**, 33, 517.
35. Goswami, AK; Purohit, DN. *Anal. Sci.* **2001**, 17, 1789.
36. Tängden, T.; Adler, M.; Cars, O.; Sandegren, L., Löwdin, E. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2013**, 68, 1319.
37. Kontek, R.; Matlawska-Wasowska, K.; Kalinowska-Lis, U.; Kontek, B.; Ochocki, J. *Acta Pol Pharm.*, **2011**, 68, 127.
38. Kalinowska, U.; Checinska, L.; Malecka, M.; Erxleben, A.; Lippert, B.; Ochocki, J. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 2464.
39. Moraes, VWR; Caires, ACF; Paredes-Gamero, EJ; Rodrigues, T. *Cell Death e Disease*, **2013**, 4, 1.
40. Abu-Surrah, AS; Kettunen, M.; Leskela, M.; Al-Abed, Y. Z. *Anorg. Allg. Chem.*, **2008**, 634, 2655.
41. Metsger, IF; Souza-Costa, DC; Tanus-Santos, JE. *Revista Medicina Ribeirão Preto*, **2006**, 39, 515.
42. Reis, M. *Revista Medicina Ribeirão Preto*, **2006**, 39, 577.
43. Mrozek, K.; Heereman, NA; Bloomfield, CD. *Blood Reviews*, **2004**, 18, 115.
44. Hamerschlak, N. *Jornal de pediatria*, **2008**, 84, S52.

45. Brandwein, JM; Yang, L.; Schimmer, AD; Schuh, AC; Gupta, V.; Wells, RA; Alibhai, SMH; Xu, W.; Minden, MD. *Leukemia*, **2007**, *21*, 821.
46. Gao, E.; Lin, L.; Liu, L.; Zhu, M.; Wang, B.; Gao, X. *Dalton Transactions*, **2012**, *41*, 11187.
47. Ozawa, Y.; Sugi, NH; Nagasu, T.; Owa, T.; Watanabe, T.; Koyanagi, N.; Yoshino, H.; Kitoh, K.; Yoshimatsu, K. *Eur. J. Cancer*, **2001**, *37*, 2275.
48. Casey, JR; Morgan, PE; Vullo, D.; Scozzafava, P.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, CT. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2337.
49. Caporaso, P.; Turriziani, M.; Venditti, A.; Marchesi, F.; Buccisano, F.; Tirindelli, MC; Alvino, E.; Garbin, A.; Tortorelli, G.; Toppo, L.; Bonmassar, E.; D'Atri, S.; Amadori, S. *DNA Repair*, **2007**, *6*, 79.
50. Roos, WP; Batista, LF; Naumann, SC; Wick, W.; Weller, M.; Menck, CF; Kaina, B. *Oncogene*, **2007**, *26*, 186.
51. Bush, K.; Jacoby, GA. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2010**, *54*, 969.
52. Burla, MC; Caliandro, R.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Cascarano, GL; De Caro, L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Cryst.*, **2005**, *38*, 381.
53. Sheldrick, GM; SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany. (1997).
54. Farrugia, LJ.; *J. Appl. Cryst.* *32*, 837 – 838; WingX – An Integrated System of Windows Programs for Solution, Refinement and Analysis of Single Crystal X-Ray Diffraction Data, VERS. 1.64.04.
55. Brandenburg, K.; Diamond 3.1a. 1997 - **2005**, Version 1.1a. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.

56. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica nº 1/2010; Brasília, Brasil, **2010**.

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

58. Mosmann, T.; *J. Immunol. Meth.* **1983**, *65*, 55.

### 3 CONCLUSÃO

A estrutura cristalina do ligante 1,3-*bis*(4-sulfonamidafenil) (**1**) demonstra a formação de *synthons* supramoleculares por meio de ligações de hidrogênio clássicas envolvendo átomos do grupamento sulfonamida. Contudo, na combinação destas interações, pode-se observar a formação de arranjos supramoleculares 3-D, importantes nos estudos da farmacologia e na engenharia de cristais. No estado sólido do complexo {*trans-bis*-[1,3-*bis*-(4-sulfonamidafenil)triazenido- $\kappa N^1$ ]bis(piridina  $\kappa N$ )paládio(II)}{tetra(piridina- $\kappa N$ )paládio(II)}bis(potássio)}·monohidratado (**2**), ocorre a formação de túneis hexagonais com diâmetros de aproximadamente 47 Å. Os compostos **1** e **2** apresentaram atividade antibacteriana de estreito espectro direcionada às espécies gram-positivas. Os dois compostos mostraram significativos efeitos citotóxicos nas amostras testadas e o composto **2** apresentou menor IC50 que o **1** (Quadro 2 - informações suplementares). Houve diferenças significativas das respostas entre **1** e **2** nas amostras de LMC, outros e controle. Estatisticamente existe diferença significativa ao compararmos a porcentagem de morte celular entre os dois compostos, nas concentrações de 12,5 e 50 nmol mL<sup>-1</sup> (p<0,05) (Tabela 5 – informações suplementares). Apresentamos dois TZC com promissores resultados citotóxicos os quais podem estar associados, sinergicamente, à presença do grupamento triazeno, à sulfonamida e aos íons de paládio, constituindo agentes com potencialidade antineoplásica.

## REFERÊNCIAS

ABU-SURRAH, A. S.; KETTUNEM, M. Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p.1337-1357, 2006.

ABU-SURRAH, A. S.; AL-AS'DONI, H. H.; ABDALLA, M. Y. Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. **Cancer Therapy**, v.6, p.1-10, 2008.

ACAR, G. Ö. et al. Unilateral sudden hearing loss as the first sign of chronic myeloid leukemia. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v.264, n. 12, p.1513-1516, 2007.

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

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA (ABRALE). In: **Taxas sobrevida da leucemia em crianças**. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br> <http://www.abrale.org.br/pagina/taxas-sobrevida-da-leucemia-em-crianca>>. Acesso em: 09 out. 2013.

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

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.1, p. 26-34, 2009.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 43-50, 2010.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Brazilian Journal Haematology**, v.33, n.4, p.451-458, 1976.

BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mieloide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n.2, p.120-125, 2005.

BISWAS, C. et al. A palladium(II) complex: Synthesis, structure, characterization, electrochemical behavior, thermal aspects, BVS calculation and antimicrobial activity. **Polyhedron**, v.56, p. 211-220, 2013.

BOBOLA, M. S. et al. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase deficiency in developing brain: Implications for brain tumorigenesis. **DNA Repair**. v. 6, p. 1127–1133, 2007.

BONMASSAR, L. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: a Short Review and a Case Report. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 2389-2401, 2013.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e Farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRANDWEIN, J. M. et al. A phase II study of temozolomide therapy for poor-risk patients aged  $\geq 60$  years with acute myeloid leukemia: low levels of MGMT predict for response. **Leukemia**, v.21, n.4, p.821-824, 2007.

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

BROCH, F. **Supramolecularidade de triazenos assimétricos dissubstituídos 4-(etoxicarbonilfenil)-2-(halofenil) e complexos de Ni (II), Cu (II) e Hg (II)**. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

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

BUCCHERI, V.; LORENZI, T. F. **Patologia dos leucócitos: doenças proliferativas linfadenopatias reacionais – Parte A – Leucemias Agudas**. In: Lorenzi, T. F. Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 351-398, 2006.

BUDZISZ, E. et al., Biological evaluation of novel Pt(II) and Pd(II) complexes with pyrazole-containing ligands. **European Journal Pharmacology**, v.502, n.1, p.59-65, 2004.

BURCHENAL, J. H. et al. Chemotherapy of leukemia. VII. Effect of substituted triazenes on transplanted mouse leukemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n.3, p. 398-401, 1956.

BURNETT, A.; WETZLER, M.; LÖWENBERG, B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, n.5, p.487-494, 2011.

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

CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v.117, n.19, p.519-532, 2011.

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

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

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

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista HCPA**, v.30, n.1, p.5-12, 2010.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, sept. 2009.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Leucemia mieloide crônica: tratamento baseado em evidências. **Diagnóstico e Tratamento**, v.14, n.2, p.62-65, 2009.

CHIATTONE, C. S. Tratamento de primeira linha da leucemia linfóide crônica. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n. 4, p. 276-279, 2005.



CHOPRA, I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.3, p.496-505, 2012.

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

COLBY-GRAHAM, F. M.; CHORDAS, C. The childhood leukemias. **Journal of Pediatric Nursing**, v.18, n.2, p.87-95, 2003.

CREUTZIG, U. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 120, n. 16, p. 3187-3205, 2012.

DEININGER, M.W. et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. **Cancer**, v.110, n.7, p. 1509-1519, 2007.

DOMINGUES, V. O. Avaliação da atividade biológica de compostos triazenos. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

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.

ELMAN, I.; PINTO e SILVA, M. E. M. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.297-303, 2007.

FAILACE, R; FERNANDES, F. B.; FAILACE, R. Hemograma: manual de interpretação. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S.M. Diagnóstico Laboratorial da Leucemias Linfóides Agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.2, p. 91-98, 2004.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of câncer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of cancer**, v.127, n.12, p. 2893-2917, 2010.

FERNANDES, I. C.; MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Tema**, v.7, n.10-11, p.2-11, 2008.

FORONES, N. M. et al. **Oncologia - Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar**. São Paulo: Manole, 2005.

GAO, E. et al. Two new palladium(II) complexes: synthesis, characterization and their interaction with HeLa cells. **Dalton Transactions**, v.41, p.11187-11194, 2012.

GARCIA, M. et al. **Global câncer facts and figs 2007**. American Cancer Society, Atlanta, 2007.

GAYNOR, D.; GRIFFITH, D. M. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 43, p. 13239-13257, 2012.

GIBSON, B. E. S. et al. Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukaemia: Medical Research Council AML12 trial. **British Journal of Haematology**, v. 155, n. 3, p. 366–376, 2011.

GILART, G. G. et al. Características clinicoepidemiológicas de las leucemias en el niño. **Medisan**, v. 15, n. 12, p. 1714-1719, 2011.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de medicina interna**. 22 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

GUANCHE, G. H, et al. Tendencias de la morbilidad y letalidad hospitalaria por cáncer. **Anales de Medicina Interna**. v. 24, n.1, p. 12-14, 2007.

HAFERLACH, T. et al. Modern diagnostics in acute leukemias. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.56, n.2, p.223-234, 2005.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, v.84, n.4 Suppl, p. S52-57, 2008.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, n. 14, p. 20-23, nov/dez. 2012.

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

HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**. 3rd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

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

HORNER, M. et al. 3-(4-Acetylphenyl)1-(4-nitrophenyl)-triazene. **Acta Crystallographica. Section C: Crystal Structure Communications**, v.C60, p. 303-304, 2004.

HORNER, M. et al. Bidimensional self-assembling of  $[\text{Hg}^{\text{II}}[\text{RPhNNNPhR}'']_2]$  (R= acetyl, R'= F) through metal- $\eta^4$ -arene  $\pi$ -interactions and non classical C-H...O bonding: Synthesis and X-Ray characterization of a bis diaryl symmetric-substituted triazenide complex polymer of Hg(II). **Zeitschrift fuer Anorganische und Allgemeine Chemie**, v.632, p. 615-618, 2006.

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

HORTON, T. M. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of temozolomide in pediatric patients with refractory or recurrent leukemia: a Children's Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, n. 31, p. 4922-4928, 2007.

IQBAL, Z.; SIDDIQUI, R. T.; QURESHI, J. A. Two different point mutations in ABL gene ATP-binding domain conferring primary Imatinib resistance in a chronic myeloid leukemia (CML) patient: a case report. **Biological Procedures Online**, v.6, n.1, p. 144-148, 2004.

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

KAVAILINI, P. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. **Metallomics**, v.4, p.101-113, 2012.

KROEFF, M. O cancer é curável? **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.1, p.5-6, 2004.

KUDUK-JAWORSKA, J. et al. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium(II) complexes with 2,6-dimethyl-4-nitropyridine. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.98, n.8, p.1447-56, 2004.

LI, L. et al. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of platinum(II)/palladium(II) complexes with 4-toluenesulfonyl-L-amino acid dianion and diimine/diamine. **Journal of Coordination Chemistry**, v.66, n.4, p.638-649, 2013.

LIN, P. & MEDEIROS, J. **Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias**, In: COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. *Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias in Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian* 2<sup>nd</sup> ed. Humana Press, 2005. Totowa, New Jersey.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2 ed. São Paulo: Rocca, 2009.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v.14, n.1, p.35-48, 2005.

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

MARTINS, C. B. S.; FILHO, N. S.; PIRES, M. L. N. Estratégias de coping e o impacto sofrido pela família quando um dos seus está em tratamento contra o câncer. **Advances in Health Psychology**, v.19, n.1-2, p.11-18, 2011.

MATUTES, E.; WOTHERSPOON A.; CATOVCKY, D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. **Baillière's Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 20, n. 3, p. 367-384, 2007.

MEDEIROS, B. C. Tailored temozolomide therapy according to MGMT methylation status for elderly patients with acute myeloid leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 1, p. 45-50, 2012.

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

MENDONÇA, N. Leucemia mielóide aguda na criança: como andamos no Brasil? **Jornal de Pediatria**, v. 79, n.6, p. 476-477, 2003.

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

National Comprehensive Cancer Network. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Chronic Myeloid Leukemia v2**. 2009. Disponível em: <[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/cml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cml.pdf)> Acesso em: 15 out. 2013.

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

NOBILI, S. Natural compounds of câncer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v.59, n.6, p.365-378, 2009.

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

OLIVEIRA, L. C. Aplicações das nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.58, n.4, p.695-701, 2012.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology-Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655-674, 2009.

PAES, R. A. P. Classificação da Organização Mundial da Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematologia da Sociedade Brasileira de Patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Tropical**, v.38, n.3, p. 237-239, 2002.

PANTCHEVA, I. N. et al. First divalent metal complexes of the polyether ionophore Monensin A: X-Ray structures of [Co(Mon)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] and [Mn(Mon)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] and their bactericidal properties. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 5, n. 2, p.154-161, 2008.

PEREIRA, M. M.; MORENO, M. J. M. Complexos de metais de transição em química fina e medicinais aplicações na indústria farmacêutica química. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 116, p. 35-41, 2010.

PIETERS, R.; CARROLL, W. L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2008.

PUI, C. H.; RELING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.350, p. 1535-1548, 2004.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.371, p.1030-1043, 2008.

PUI, C. H. et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, n. 5, p. 551-565, 2011.

QADIR, M. et al. Routine Immunophenotyping in Acute Leukemia: Role in Lineage Assignment and Reassignment. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v.70B, n.5, p.329-334, 2006.

QUIROGA, A. G. et al. Synthesis and characterization of Pd(II) and Pt(II) complexes of *p*-isopropylbenzaldehyde N-protected thiosemicarbazones. Cytotoxic activity against *ras*-transformed cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.75, p.293-301, 1999.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REIS, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Revista Medicina Ribeirão Preto**, v.39, n.4, p.577-586, 2006.

RIZZIERI, D. Phase I study of temozolomide and laromustine (VNP40101M) in patients with relapsed or refractory leukemia. **Clinical Lymphoma Mieloma and Leukemia**, v. 10, n. 3, p. 211-216, 2010.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p. 317-320, 2003.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute Lyeloid Leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 21-51, 2008.

SANTANA-LEMOS, B. A. A.; JÁCOMO, R. H.; SANTOS, G. A. S. LEUCEMIAS: misteriosas e temidas, mas não invencíveis! **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p.1-3, 2007.

SEITER, K. et al. Evaluation of Temozolomide in Patients with Myelodysplastic Syndrome. **Leukemia & Lymphoma**. v.45, n.6, p.1209-1214, 2004.

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

SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 6, p.649-658, 2009.

SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arquivos do Mudi**, v.12, n.1, p.5-14, 2008.

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

SPIELMANN, H. Animal Use in the Safety Evaluation of Chemicals: Harmonization and Emerging Needs. **ILAR Journal**, v.43, p. S11-17, 2002.

STEPHENS, M. L., GOLDBERG, A. M., ROWAN, A. N. **The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and repalcing the use of laboratory animals**. In: ROWAN, A. N. The state of the animals 2001. Washington: Humane Society Press, 2001. chapter 8.

STEWART, B. W.; COATES, A. S. Cancer Prevention: a global perspective. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n.2, p.392-403, 2005.

STONE, R. M. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. **The Oncologist**, v.9, n.3, p.259-270, 2004.

STRATON, M. R., CAMPBELL, P. J. FUTREAL, P. A. **The cancer genome**, v. 458, n. 9, p.719-724, 2009.

TEFFERI, A. et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v.80, n.3, p.390-402, 2005.

VARALDO, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p. 1-4, 2002.

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

WALZ, C.; SATTLER, M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.57, n.2, p.145-164, 2006.

WISE, R. Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n. Suppl S1, p. 37-42, 2003.

YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO, V. L. P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n.4, p. 229-232, 2005.

ZERBINI, M. C. N. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 643-648, 2011.

ZHU, W. et al. Design, Synthesis and 3D-QSAR Analysis of Novel 2-Hydrazinyl-4-morpholinothieno[3,2-*d*]pyrimidine Derivatives as Potential Antitumor Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 162-175, 2012.

ZMEJKOWSKI, B. B., et al. Palladium(II) complexes with R<sub>2</sub>edda-derived ligands. Part II. Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral studies of R<sub>2</sub>eddip esters and palladium(II) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.9, p.3452-3458, 2009.

ZURLO, J.; RUDACILLE, D.; GOLDBERG, A. M. **Animal and alternatives in testing: History, science, and ethics**. Larchmont: The Johns Hopkins University, 2002. Disponível em: <[http://caat.jhsph.edu/pubs/animal\\_alts/animal\\_alts.htm](http://caat.jhsph.edu/pubs/animal_alts/animal_alts.htm)>. Acesso em: 14 out. 2013.