

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
TRIAZENOS INÉDITOS COMPLEXADOS COM Au(I)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Cláudia Barbisan Kempfer**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TRIAZENOS  
INÉDITOS COMPLEXADOS COM Au(I)**

**Cláudia Barbisan Kempfer**

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 DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TRIAZENOS  
INÉDITOS COMPLEXADOS COM Au(I)**

elaborada por  
**Cláudia Barbisan Kempfer**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Rosmari Hörner, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Luciana Maria Fontanari Krause, Dra. (UNIFRA)**

**Virgínia Maria Cóser, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 22 de março de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu agradecimento a Deus, sempre me guiando pelo melhor caminho a seguir.

A minha família, especialmente meus pais, Nelsa e Antônio, pelo amor, ensinamentos e dedicação de uma vida inteira.

Ao meu marido, Rodrigo, testemunha do meu esforço e dedicação, e que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando em todos os momentos, todo o meu amor e respeito a você.

À minha orientadora professora Dra. Rosmari Hörner, que com muita paciência me guiou neste caminho.

A todas as colegas do laboratório de microbiologia que me ajudaram na realização deste trabalho, pela companhia e auxílio.

À minha colega Maísa, que se tornou uma grande amiga e me acompanha desde a graduação.

Às colegas de laboratório que se tornaram verdadeiras amigas, Liliana, Mônica, Lívia e Silvana.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Ao Laboratório de Hematologia-Oncologia do Hospital Universtário de Santa Maria pelo auxílio.

Ao Núcleo de Investigação de Trizenos e Complexos, especialmente ao Professor Manfredo Hörner pela ajuda.

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

Muito obrigada a todos por esta conquista.

## RESUMO

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

### **AValiação da Atividade Biológica de Triazenos Inéditos Complexados com Au(I)**

**AUTORA: CLÁUDIA BARBISAN KEMPFER**

**ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER**

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de março de 2013.

Os triazenos são compostos com comprovada atividade citotóxica e antibacteriana. Variações na sua estrutura química, como por exemplo a complexação com metais como o ouro (I), podem lhe conferir diferenciadas atividades biológicas. Os antineoplásicos dacarbazina e temozolomida constituem exemplos de triazenos disponíveis comercialmente utilizados no tratamento de tumores sólidos e leucemias agudas. Neste estudo foram sintetizados os seguintes compostos triazenos inéditos complexados com ouro (I): **1**) [1,3-*Bis*(2-fluorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I); **2**) [1,3-*Bis*(2 clorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I); **3**) [1,3-*Bis*(2-bromofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I); **4**) [1,3-*Bis*(2 iodofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I). A citotoxicidade desses compostos foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT efetuando cultura de células de medula óssea de pacientes com diferentes tipos de leucemias, além de paciente controle, sem a doença. Para a análise da atividade antimicrobiana foi utilizada a metodologia quantitativa da microdiluição em caldo com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para a determinação da atividade de nuclease foram efetuados ensaios de clivagem do DNA plasmidial fita dupla utilizando a metodologia de eletroforese em gel de agarose. Os resultados mostraram uma considerável atividade frente a diferentes tipos de leucemias (leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crônica) com um pequeno valor de IC<sub>50</sub> de 0,0057  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  para o composto **4** em células de leucemia mielóide aguda, sendo todos os compostos ativos em diferentes tipos de leucemias, porém de forma não seletiva. A maior atividade antibacteriana foi frente a bactérias gram-positivas principalmente em diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (com valor de CIM igual a 16  $\mu\text{g/mL}$ ). Nenhum dos 4 compostos analisados nesse estudo conseguiu clivar o DNA plasmidial. Desta forma, todos os triazenos testados possuem potencial biológico, ou seja, podem ser objeto de mais estudos como alternativas aos fármacos antimicrobianos e antineoplásicos existentes.

**Palavras-chave:** Triazenos. Ouro. Citotoxicidade. *S. aureus*. Leucemia.

## ABSTRACT

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

### EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF UNPUBLISHED TRIAZENES COMPLEXED WITH Au (I)

AUTHOR: CLÁUDIA BARBISAN KEMPFER

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Presentation date: Santa Maria, March 22th 2013.

The Triazenes are compounds with proven antibacterial and cytotoxic activity. Variations in the chemical structure such as complexation with metals like gold (I) can confer different biological activities. The antineoplastic temozolomide and dacarbazine are examples of commercially available triazenes used in the treatment of solid tumors and acute leukemias. In this study, the following compounds were synthesized triazenes complexed with novel gold (I): 1) [1,3-Bis (2-fluorophenyl) triazenido] (triphenylphosphine) gold (I); 2) [1,3-Bis (2-chlorophenyl) triazenido] (triphenylphosphine) gold (I) 3) [1,3-Bis (2-bromophenyl) triazenido] (triphenylphosphine) gold (I), 4) [1,3-Bis (2-iodophenyl) triazenido] (triphenylphosphine ) gold (I). Cytotoxicity of these compounds was evaluated by the MTT colorimetric assay of cell culture effecting bone marrow of patients with different types of leukemia, in addition to controlling patient without the disease. For the analysis of the antimicrobial activity was utilized quantitative methodology of microdilution with the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). To determine the activity of nuclease cleavage assays were performed in double-stranded plasmid DNA using the method of electrophoresis in agarose gel. The results showed a considerable activity against different types of leukemia (acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia) with a small  $IC_{50}$  value of  $0.0057 \mu\text{mol mL}^{-1}$  for compound 4 in cells of acute myeloid leukemia, all the active compounds in different types of leukemia but not so selective. The antibacterial activity was higher against gram-positive bacteria mainly in different strains of *Staphylococcus aureus* (MIC value of equal to 16  $\mu\text{g/ml}$ ). Any of the four compounds analyzed in this study was able to cleave the plasmid DNA. Thus, all tested triazenes have biological potential, or may be the subject of further studies as alternatives to anticancer and antimicrobial drugs existent.

**Keywords:** Triazenes. Gold. Cytotoxicity. *S. aureus*. Leukemia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MANUSCRITO

Esquema 1.....	35
Figura 1 .....	49
Figura 2.....	59
Figura 3.....	59
Figura 4.....	60
Figura 5.....	60
Figura 6.....	61
Figura 7.....	62
Figura 8.....	63
Figura 9.....	64
Figura 10.....	65
Figura 11.....	66
Figura 12.....	50

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Tabela 1 – Dados da coleta de intensidade e refinamento da estrutura cristalina e molecular dos complexos triazenos 1-4.....	46
Tabela 2 - Comprimentos de ligações (Å) e ângulos de ligações (°) selecionados para os complexos de ouro (I) 1, 2, 3 e 4.....	47
Tabela 3 - Ligações de hidrogênio não-clássicas para os complexos de Au(I).....	47
Tabela 4 – 4 Interações halogênio··halogênio para os complexos triazenos <b>2, 3 e 4</b> ...	48
Tabela 5 - Desvio médio quadrático da planaridade, r.m.s (Å) e ângulo interplanar (°) dos complexos (3), (4), (5) e (6).....	48
Tabela 6 – Valor de IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> ) para os quatro compostos triazenos testados no estudo de acordo com os pacientes e tipo de leucemia.....	38
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (ug mL <sup>-1</sup> ) para os triazenos 1, 2, 3 e 4.....	58



## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo A –Metodologia Adicional.....</b>	<b>84</b>
--	-----------

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>1.1 Objetivos</b> .....	12
1.1.1 Objetivo Principal.....	12
1.1.2 Objetivos Específicos.....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
<b>2.1 Triazenos</b> .....	13
<b>2.2 Câncer e Leucemias</b> .....	19
<b>2.3 Bactérias</b> .....	24
<b>2.4 Ouro</b> .....	25
<b>2.5 Teste de Viabilidade Celular e Clivagem do DNA e</b> .....	30
<b>3. MANUSCRITO – SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE QUATRO TRIAZENOS INÉDITOS COMPLEXADOS COM AU(I)</b> .....	33
<b>Abstract</b> .....	33
<b>Introdução</b> .....	34
<b>Resultados e Discussão</b> .....	35
<b>Conclusão</b> .....	42
<b>Material e Métodos</b> .....	42
<b>Literatura citada – Referências Bibliográficas</b> .....	52
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Os triazenos são uma classe de compostos que se caracteriza por uma cadeia aberta contendo três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=NN) (HÖRNER et al., 2004). Eles são representados por fármacos como a dacarbazina e a temozolomida, usados na prática clínica como antineoplásicos, sendo que o grupo triazeno é o responsável por suas propriedades farmacológicas (MARCHESI et al., 2007). Um dos usos mais prevalentes dos triazenos é no desenvolvimento de moléculas contra o câncer (ÜNSALAN et al., 2011), mas eles também possuem comprovada atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (SHEALY; KRAUTH, 1966; GOSWAMI; PUROHIT, 2001; ZHOU et al, 2005; 2006; 2007; HÖRNER et al., 2008).

Os primeiros antineoplásicos conhecidos exercem seu mecanismo de ação através da interação com o DNA, causando algum dano irreparável ou inibindo a síntese de novo material genético (GOODMAN; GILMAN, 2007). Dentre estes fármacos estão os agentes alquilantes onde se inserem os triazenos (CHABNER; CALABRESI, 1995). Mesmo com a descoberta de medicamentos que atuam em alvos moleculares, os agentes citotóxicos continuam ocupando um importante papel no tratamento de alguns tumores e tornam-se muito efetivos quando combinados com fármacos de última geração (WAXMAN, 2008).

No caso da atividade antimicrobiana, o mecanismo de ação dos triazenos estaria relacionado com a influência destes compostos sobre a parede celular das bactérias (GOSWAMI; PUROHIT, 2001).

Os fármacos baseados no ouro também têm sido investigados como potenciais agentes antineoplásicos devido às suas aplicações no tratamento da artrite reumatóide, principalmente com derivados de fosfina ouro (I) (KOUROUSSIS et al., 2009). Esse metal também propicia uma significativa atividade frente a diferentes microrganismos (BERNERS-PRICE et al, 1988; NOMIYA et al., 2000; NOMIYA et al., 2003).

Após o sucesso da cisplatina no tratamento de várias neoplasias, fármacos baseados na química de coordenação com outros metais passaram a ser muito estudados como agentes antineoplásicos (ARNESANO; NATILE, 2009; HAMBLEY, 2007). Os efeitos colaterais e a resistência adquirida à cisplatina também estimulam a busca por outros agentes citotóxicos baseados em metais (BRUIJNINCX; SADLER, 2008). As propriedades químicas dos complexos metálicos permitem diversas estruturas e atividades biológicas que não se obtém com compostos puramente orgânicos. O ouro (I) e ouro (III) podem formar compostos

estáveis com atividade antineoplásica modificada pela variação dos seus ligantes auxiliares (CHE; SUN, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta o câncer como a segunda principal causa de morte nos países desenvolvidos (LEONE et al., 2010; KAYSER et al., 2011; SILL et al., 2011). Em 2007, a Europa considerou o câncer como principal causa de mortalidade e morbidade prematuras na população (KHAYAT, 2012). Recentemente a sobrevivência de pacientes com a doença aumentou devido ao desenvolvimento de novos regimes terapêuticos, apesar de ter havido um aumento paralelo na frequência de novos casos também (LEONE et al., 2010; KAYSER et al., 2011; SILL et al., 2011).

Os tratamentos contra o câncer possuem altos custos e a pesquisa na busca de agentes inovadores acaba se limitando devido a isso. Dados sugerem que novas terapias contribuem para a melhoria de vida e sobrevivência de pessoas com a doença (KHAYAT, 2012). Apesar da grande variedade de fármacos e terapias disponíveis, as resistências e os efeitos colaterais adversos ainda são um grave problema na terapia antineoplásica. Assim, a busca por fármacos altamente eficientes e seguros continua sendo um objetivo desejável por muitos grupos de pesquisa (ZHU et al., 2012).

O uso indiscriminado de antimicrobianos é o fator que mais contribui atualmente para o problema da resistência bacteriana, aumentando a morbidade e mortalidade, e gerando altos custos para as instituições de saúde (GOTTLIEB; NIMMO, 2011). A resistência representa uma séria ameaça tanto nas comunidades como nos hospitais, uma vez que qualquer espécie de bactéria pode adquirir resistência aos antimicrobianos (BARKER, 2006).

As interações dos compostos triazenos com o DNA vêm sendo muito estudadas pelo fato de poderem interferir no processo de proliferação celular, resultando em novos fármacos antineoplásicos de grande importância. A descoberta de novos agentes quimioterápicos com toxicidade reduzida, máxima atividade contra células tumorais com mínima dosagem, assim como fármacos com propriedades antimicrobianas, são de fundamental importância para o combate a diversas doenças. Desta forma, neste estudo, analisamos a atividade de 4 compostos triazenos inéditos complexados com ouro (I), que são: 1) [1,3-*Bis*(2-fluorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I); 2) [1,3-*Bis*(2-clorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I); 3) [1,3-*Bis*(2-bromofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I) e 4) [1,3-*Bis*(2-iodofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I).

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo principal

Avaliar a capacidade de 4 compostos triazenos inéditos complexados com ouro (I) de produzirem citotoxicidade frente a células leucêmicas de medula óssea humana, clivarem o DNA plasmidial fita dupla e exercerem atividade antibacteriana.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos seguintes compostos triazenos:

- 1) [1,3-*Bis*(2-fluorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I);
- 2) [1,3-*Bis*(2-clorofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I);
- 3) [1,3-*Bis*(2-bromofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I);
- 4) [1,3-*Bis*(2-iodofenil)triazenido](trifenilfosfina)ouro(I)

frente a células de medula óssea de pacientes atendidos no Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), os quais apresentavam diferentes tipos de leucemia, bem como células de indivíduo portador de leucose aguda, utilizando o ensaio colorimétrico (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazolio]- MTT) e o método de exclusão com azul de trypan para avaliar a viabilidade celular;

- Determinar a atividade de clivagem dos DNAs plasmidiais pUC18 e pBSKII por compostos triazenos inéditos em diferentes concentrações, pHs (6,5 e 8,0) e temperaturas (37° e 50° C);

- Procurar indícios sobre os possíveis mecanismos envolvidos nas reações de clivagem do DNA efetuado pelos compostos identificados como ativos;

- Determinar a atividade antibacteriana dos compostos triazenos frente a bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC) e bactérias multirresistentes isoladas no HUSM.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Triazenos

Os fármacos usados no tratamento do câncer, tanto de origem sintética como natural, foram descobertos a partir de testes em animais (CHABNER; ROBERTS, 2005), entre as décadas de 1950 e 1970 (GOODMAN; GILMAN, 2007). A ação destes primeiros antineoplásicos ocorre através da interação com o DNA inibindo a síntese de novo material genético ou causando algum dano irreparável a esta molécula. Isso ocorre através da atuação no processo de proliferação celular, e esta descoberta acabou incentivando estudos sobre a inibição de novos alvos moleculares (GOODMAN; GILMAN, 2007). Os mesmos agentes utilizados na terapia antineoplásica também constituem importantes imunossupressores no tratamento de doenças como artrite reumatóide, anemia falciforme, psoríase ou transplante de órgãos (GOODMAN; GILMAN, 2007). Os fármacos utilizados no tratamento do câncer podem ser divididos em agentes ciclo-celular específicos (CCE) ou ciclo-celular inespecíficos (CCI) de acordo com o seu mecanismo de ação (RAJSKI; WILLIAMS, 1998). Dentre os CCE há os agentes antimetabólitos, agentes hormonais, produtos naturais e enzimas. Os agentes CCI se dividem em produtos naturais, complexos de coordenação da platina e agentes alquilantes (CHABNER; CALABRESI, 1995).

Os agentes alquilantes são muito utilizados na terapia contra vários tipos de cânceres. Alguns exemplos desta classe de fármacos são: cisplatina, dacarbazina, temozolomida, meclorometamina, clorambucil, melfalana, bussulfan e Thiotepa<sup>®</sup>, sendo que os dois últimos são muito usados para o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC). Os fármacos alquilantes são usados no tratamento de vários tipos de cânceres, tanto sólidos quanto hematológicos, e são também muito utilizados em esquemas de poliquimioterapia (KATZUNG, 2010).

A classe dos fármacos alquilantes exerce seus efeitos citotóxicos pela transferência dos grupos alquila para vários componentes celulares. A alquilação com o DNA no núcleo representa a interação responsável pela morte celular. A resistência adquirida aos agentes alquilantes pode envolver aumento da capacidade de reparo de lesões do DNA, permeabilidade da célula ao fármaco diminuída ou produção aumentada de glutathione que inativa o fármaco por conjugação (KATZUNG, 2010).

Produtos químicos causadores de alquilação aberrante no DNA estão presentes em todos os lugares (SEDGWICK; VAUGHAN, 1991; EL GHISSASSI et al., 1995; DAYAL; ERTEL, 1997). Exogenamente agentes mutagênicos estão presentes no ambiente, no tabaco, (BARTSCH; MONTESANO, 1984; JAGERSTAD; KOG, 2005; KAINA et al., 2007) alimentos e certos quimioterápicos através da produção de espécies alquilantes reativas (LAWLEY; THATCHER, 1970). Eles também estão presentes em produtos endógenos gerando espécies reativas eletrofílicas que alquilam o DNA (BARTSCH; MONTESANO, 1984; JAGERSTAD; SKOG, 2005; KAINA et al., 2007).

Entre os agentes alquilantes temos os triazenos que são compostos de cadeia aberta que contêm três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=N-N) (HÖRNER et al., 2004; KIMBALL; HERGES; HALEY, 2002) e são de grande interesse devido a sua atividade biológica ser bem conhecida, principalmente na terapia antineoplásica (KIMBALL; HERGES; HALEY, 2002). Há relatos de que o primeiro triazeno foi sintetizado em 1858 (GRIESS, 1859).

Em 1942, a meclorometamina, que é um agente alquilante do tipo mostarda nitrogenada, foi utilizada para induzir remissão em um paciente com linfoma: e esse fato marcou o início de uma nova era na terapia contra o câncer (RAJSKI; WILLIAMS, 1998). As mostardas nitrogenadas foram os primeiros agentes antineoplásicos clinicamente efetivos e com capacidade de alquilar o DNA (GILMAN; PHILIPS, 1946). Durante a I e II Guerras Mundiais, várias pessoas morreram devido à exposição as mostradas nitrogenadas por atrofia da medula óssea e dos linfonodos. Isso sugeriu que esses gases afetavam a divisão celular em certos tipos de células somáticas e poderiam ser usados para suprimir a divisão de células de câncer em leucemias agudas e linfomas (GILMAN, 1946).

Em 1956 pesquisadores já tinham o conhecimento de que compostos triazenos eram ativos contra alguns tipos de leucemia para os quais havia resistência aos tratamentos convencionais da época (BURCHENAL et al., 1956). Em estudo realizado em 1986 observou-se que estes agentes alquilantes podiam preferencialmente atacar as regiões do genoma que são ricas em guaninas (MATTES; HARTLEY; KOHN, 1986).

O mecanismo de ação dos triazenos ocorre por metilação da posição O<sup>6</sup> da guanina no DNA. Após a replicação do DNA, a O<sup>6</sup>-metilguanina desencadeia uma cascata de sinais intracelulares que param o ciclo celular e desencadeiam a apoptose (GERSON, 2004). Agentes terapêuticos que fazem metilação formam uma grande variedade de adutos com DNA. Todos eles podem contribuir para a morte celular, mas a O<sup>6</sup>-metilguanina parece ser de

especial importância para conduzir à parada do ciclo celular e a apoptose (ROOS; KAINA, 2006).

O primeiro triazeno comercialmente utilizado como anticancerígeno foi o 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxiamida conhecido como dacarbazina e foi sintetizado na década de 1960 por Montgomery, Krauth e Shealy (SHEALY; KRAUTH; MONTGOMERY, 1962). Logo depois surgiu a temozolamida (3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxiamida), outro composto também utilizado na terapia contra o câncer (RACHID et al., 2003). O Berenil<sup>®</sup>, [1,3-Bis (4'-amidofenil)triazeno], é outro triazeno conhecido que tem ação tripanossomicida e leishmanicida (BÉNARD; RIOU, 1980; KONING, 2001) e é muito utilizado para tratar animais domésticos (PEREGRINE; MAMMAN, 1993) podendo agir também como antiviral (PILCH et al., 1995). O Berenil<sup>®</sup> é um composto que se liga ao DNA, podendo também se ligar ao RNA, exibindo características de intercalação (DE CLERCQ; DANN, 1980; PILCH et al., 1995) mas possui propriedades citotóxica e antiviral discretas (DE CLERCQ; DANN, 1980). Uma fraca capacidade citotóxica foi apresentada contra células de leucemia L1210 (MCCONNAUGHY; JENKINS, 1995). A parte ativa de todos estes compostos é representada pelo grupo triazeno, que é responsável pelas propriedades físicas, químicas e antitumorais desses fármacos (MARCHESI, 2007).

A dacarbazina era inicialmente considerada como um antimetabólito, porém, como este derivado triazeno funciona através da alquilação do DNA, foi reclassificada como agente alquilante. Este fármaco precisa ser ativado inicialmente pelo citocromo P-450 no fígado através de uma reação de N-desmetilação, e quando atinge a célula alvo ocorre clivagem espontânea do metabólito que libera um componente alquilante chamado diazometano (CHABNER; CALABRESI, 1995). Após sofrer ativação metabólica no fígado, a dacarbazina destrói as células em qualquer fase do ciclo celular. Seu principal uso é em melanoma metastático ou pode ser combinada com outros fármacos em esquemas terapêuticos para tratamento de outras neoplasias (MARCHESI et al., 2007).

A temozolomida não precisa de ativação metabólica para se transformar no agente metilante citotóxico, ou forma ativa alquilante; isto ocorre em pH fisiológico (BRADA et al., 1999), e ela atua em todas as fases do ciclo celular. Seu principal uso é em pacientes com gliomas malignos (MARCHESI et al., 2007). A temozolomida foi o primeiro fármaco aprovado em 30 anos para uso especificamente no tratamento de glioblastoma multiforme e astrocitoma anaplásico, que geralmente apresentam recorrência ou progridem após a terapia (CARNERO GOMEZ, 2005).



Os efeitos citotóxicos da dacarbazina e da temozolomida estão relacionados com o fato de promoverem a alquilação do DNA impedindo a multiplicação das células tumorais e a síntese de proteínas nestas células. O sítio de alquilação mais freqüente é o N<sup>7</sup> da guanina, porém, o mecanismo de ação é relacionado com a metilação do O<sup>6</sup> da guanina (MARCHESI et al., 2007).

A citotoxicidade da temozolomida parece ser mediada através da metilação com a posição O<sup>6</sup> da guanina (CATAPANO et al., 1987; D'ATRI et al, 1995; WEDGE et al., 1996). Em 1992 Newlands et al. fizeram um estudo que incluiu 51 pessoas, no qual investigavam a eficácia de uma única dose oral de temozolomida. A idade média destes pacientes era de 52 anos sendo que 14 tinham melanoma, 4 câncer de mama, 4 câncer colorretal, 4 câncer de estômago, 3 glioma e 15 outros tipos de câncer. Todos os participantes tinham uma expectativa de vida de pelo menos 2 meses, e os cânceres eram avançados e refratários às formas de terapia padronizadas. Após a administração de temozolomida, em 5 pacientes, a biodisponibilidade oral absoluta foi de quase 100% (NEWLANDS et al., 1992). A temozolomida mostrou, em estudos pré clínicos, uma extensa distribuição tecidual que inclui penetração na barreira hematoencefálica e fluido cerebrospinal (PATEL et al., 1995; BRADA et al., 1999). A vantagem da temozolomida neste caso é de não produzir cardiotoxicidade e poder ser administrada oralmente, o que reduz significativamente os custos para as instituições hospitalares (CARNERO GOMEZ, 2005). Ela demonstrou atividade aditiva ou sinérgica quando administrada *in vitro* com outros agentes quimioterápicos, radiação e inibidores das enzimas poli (ADP-ribose) polimerase e da proteína de reparo do DNA O<sup>6</sup>-alquilguanina- DNA alquiltransferase (OGAT) (WEDGE et al., 1996, WEDGE et al., 1997; LIU et al., 1997).

A diferença para a dacarbazina está no fato de que a temozolomida degrada espontaneamente ao seu metabólito ativo e pode ser ingerida oralmente penetrando na barreira hematoencefálica. Como é bem tolerada, a temozolomida é adequada para ser usada em combinação com outros agentes quimioterápicos quando ocorre resistência à ela (DANSON; MIDDLETON, 2001).

Elas ainda podem ser ativas em células leucêmicas do tipo L1210 (As células L1210 são uma linhagem celular estabelecida a partir de células de camundongo induzidas, experimentalmente, para o desenvolvimento de leucemia linfóide) (MCCONNAUGHIET; JENKINS, 1995), como publicado em 1976 por Venditti (VENDITTI, 1976). Estudos posteriores também comprovaram que a atividade antitumoral da temozolomida *in vivo* frente às células L1210 é mantida quando administrada oralmente (STEVENS et al., 1987) ou na

forma intraperitoneal (NEWLANDS et al., 1997). A temozolomida ainda pode ser eficaz em casos de leucemia aguda conforme um estudo publicado em 2007 (CAPORASO et al., 2007). Um estudo piloto mostrou que a dacarbazina pode induzir uma marcada redução de células blásticas em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA), e estas mesmas células mostraram sensibilidade à temozolomida em um grande número de amostras (D'ATRI et al., 1995).

Como a temozolomida age predominantemente através da metilação da O<sup>6</sup>-guanina no DNA (TAVERNA et al., 1992; LACAL et al., 1996), um obstáculo para este fármaco é a enzima de reparo do DNA, a O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (BOBOLA et al., 1996; WANG et al., 1996). Esta enzima remove os grupos metil que levariam a célula à morte por apoptose, conferindo um importante mecanismo de resistência à temozolomida que se apresenta nas leucemias (HEIGI et al., 2005). Esta enzima representa uma defesa contra os efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos agentes alquilantes (BOBOLA et al., 2007). A ausência da expressão da MGMT foi correlacionada com maior probabilidade de resposta à temozolomida (SEITER et al., 2009) e uma das estratégias quando se tem refratariedade das células leucêmicas é combinar a temozolomida com outros fármacos (SEITER et al., 2002).

O<sup>6</sup>-metilguanina é um importante mutagênico e citotóxico que produz lesões em que ocorre a formação de um aduto de DNA (LAWLEY; THATCHER, 1970), e ela é eficientemente e estequiometricamente reparada pela MGMT (BRONSTEIN; SKOPEK; SWENBERG, 1992; MIJAL et al., 2004). Devido à importância da MGMT na supressão da tumorigênese há várias investigações sobre seu polimorfismo e incidência de câncer (GOODE; ULRICH; POTTER., 2002). As interações gene-ambiente são importantes para a MGMT, pois a suscetibilidade de câncer em animais experimentais é fortemente determinada pela exposição à agentes alquilantes (BUGNI et al., 2007). A suscetibilidade das células neoplásicas para os triazenos pode ser aumentada através da modulação farmacológica da expressão do nível e função da atividade das enzimas de reparo do DNA. E, ainda, os índices terapêuticos dos triazenos podem ser dramaticamente aumentados se o fármaco for administrado em combinação com inibidores da MGMT (MARCHESI et al., 2007).

Os triazenos representam uma classe de agentes antineoplásicos com grande interesse clínico, porém ainda são relativamente pouco usados na prática. Entretanto, a possibilidade de estender o tratamento com os triazenos devido ao seu amplo espectro de ação em doenças neoplásicas é suportado por várias razões. Uma delas é a suscetibilidade dos alvos nas células tumorais, que pode ser razoavelmente predita com base na avaliação dos sistemas de reparo do DNA associados com as doenças malignas (MARCHESI et al., 2007). Uma variedade de

malignidades, incluindo as de origem hematopoética, sensíveis ou refratárias à quimioterapia convencional, são potencialmente sensíveis aos triazenos (NICOLIN et al., 1976; FRANCHI et al., 1992).

Os triazenos também podem induzir mudanças antigênicas dos alvos celulares, processo conhecido como *chemical xenogenization* (CX). No início dos anos 1970, foi descoberta uma característica farmacológica especial dos triazenos em modelos de leucemia murina (BONMASSAR et al., 1970; BONMASSAR et al., 1972; HOUCHEMS et al., 1976; CAMPANILE et al., 1975; NICOLIN et al., 1976). Camundongos foram inoculados com células de leucemia totalmente histocompatíveis e tratados com dacarbazina por 4 a 6 gerações de transplante. As células malignas coletadas dos doadores tratados com dacarbazina foram fortemente rejeitadas por hospedeiros histocompatíveis sem tratamento e também foram imunogênicas (BONMASSAR et al., 1970). As células tratadas com dacarbazina apresentaram novos antígenos de transplante não detectados nas células de origem (HOUCHEMS et al., 1976; ROMANI; FIORETTI; BONMASSAR, 1979). Este mecanismo de CX é baseado na mutação somática induzida pelos triazenos (NARDELLI et al., 1984; GROHMANN et al., 1995; BELLADONNA et al., 1996). Quando surgiu essa ideia, testes foram feitos mostrando que a quinacrina, um composto antimutagênico, foi capaz de suprimir completamente a CX. Mais estudos mostraram que esse processo é resultado da indução pelos fármacos triazenos de mutações pontuais que afetam sequências retrovirais que deixam aparente peptídeos não próprios presentes na classe I do complexo de histocompatibilidade (GROHMANN et al., 1995; BELLADONNA et al., 1996).

Em 1994, D'Atri et al. tentaram estabelecer se as células malignas humanas também eram suscetíveis à CX (D'ATRI et al., 1994). Eles expuseram células de câncer de pulmão, *in vitro*, ao 4-(3-metil-1-triazeno)-ácido benzóico, e usaram a resposta do linfócito T citotóxico como parâmetro de avaliação. Os linfócitos foram clonados e testados contra células alvo tratadas e não tratadas com triazenos. Os clones selecionados foram capazes de matar especificamente as células tratadas com triazenos, mas não aquelas sem tratamento. Isso sugeria que as células malignas humanas também poderiam ser suscetíveis à CX (D'ATRI et al., 1994). Outros estudos mostraram que uma combinação de imuno-quimioterapia com triazenos poderia ter uma potencial aplicação clínica em leucemias humanas (TENTORI et al., 1990; TENTORI et al., 1995).

Em 2011, Zovko et al. sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de um diariltriazeno. A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* contra células HeLa (células de carcinoma cervical). Os resultados mostraram baixa ou nenhuma atividade citotóxica.

Entretanto, quando frações de Cl, Br ou CF<sub>3</sub> foram acrescentadas na posição orto em ambos os anéis benzeno triazeno, a atividade citotóxica aumentou significativamente (ZOVKO et al., 2011).

Como ligantes, os triazenos possuem alta versatilidade devido aos modos de coordenação relacionados com sua geometria. Eles podem formar uma grande variedade de complexos com metais de transição devido à sua capacidade estereoquímica (HÖRNER et al., 2006). Além disso, devido as suas comprovadas atividades citotóxicas, (NICOLIN et al., 1976; TENTORI et al., 1990; FRANCHI et al., 1992; TENTORI et al., 1995; ZOVKO et al., 2011) eles são de grande interesse para a pesquisa de novos fármacos, principalmente na terapia anticâncer (KIMBALL et al., 2002).

## 2.2 Câncer e Leucemias

O câncer ganhou uma dimensão muito grande nas últimas décadas, e é considerado um crescente problema de saúde pública mundial. Segundo uma estimativa da OMS, em 2030, podemos esperar 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença. A maior incidência será nos países de baixa e média renda. Há muitas consequências sociais e econômicas envolvidas quando se trata do câncer, e isto pode afetar o desenvolvimento sócio-econômico de países emergentes como o Brasil. Em nosso país, as estimativas para 2013 mostram que haverão 518.510 novos casos de câncer (INCA, 2011).

Um aspecto fundamental do câncer é representado pela desregulação do controle do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Uma redução de pH é notada em células doentes devido às mudanças no metabolismo associadas com a acelerada divisão celular. Logo, as células doentes poderiam ter uma alta afinidade pelo DNA, comparadas com as células saudáveis, promovendo seletividade (MARTIN; JAIN, 1994).

A diversidade genética intraclonal é uma característica comum do câncer (MARUSYK; POLYAK, 2010), e a partir de uma perspectiva Darwiniana, esta é uma característica de seleção natural (DICK, 2008). As células variantes geneticamente, dentro de um complexo microambiente (NOWELL, 1976; MERLO et al., 2006), representam algo que é essencial para a evolução clonal, progressão, recidiva ou metástase da doença (DICK, 2008).

A leucemia, considerada um tipo de câncer, é uma doença que se origina a partir da série branca do sangue. Em 2012, estimou-se que haveriam 4.570 novos casos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres no Brasil. A primeira divisão das leucemias está nas formas aguda e crônica. Na aguda ocorre um aumento no número de células imaturas no sangue que é muito rápido, e a medula fica incapaz de produzir mais células saudáveis. Na forma crônica ocorre um aumento do número de células maduras anormais da série branca do sangue, que demora muito tempo para progredir. A divisão dos tipos de leucemia também é feita quanto ao tipo de célula que é afetado, ou seja, pode ser linfóide ou mielóide (INCA, 2011).

Os mecanismos que controlam a estabilidade genômica em células hematopoiéticas têm um importante papel no desenvolvimento da leucemia (BONNET; DICK, 1997). O processo de dano ao DNA é importante para a toxicidade hematológica, e é o principal efeito colateral de fármacos anticâncer citotóxicos (LEONE et al., 2001). A complexidade genética é uma consideração importante para o direcionamento terapêutico da doença (DICK, 2008).

A citogenética, imunofenotipagem e análise molecular fornecem dados muito importantes para o entendimento da biologia das malignidades hematológicas (MCKENNA, 2000). Conhecer a biologia celular e molecular das leucemias é muito importante para o sucesso da terapia (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

Para diagnosticar as leucemias através da citogenética, se faz uma análise completa do aspirado de medula óssea e do sangue periférico. Uma cultura de células com estes materiais é realizada com o objetivo de se obter cromossomos metafásicos sem estimulação mitótica. Após é realizado o bandeamento e se analisam os cromossomos. Assim, anomalias numéricas e estruturais podem ser detectadas (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

As análises citogenéticas e moleculares permitem uma definição mais precisa no diagnóstico das leucemias, possibilitam a detecção de alterações cromossômicas e genéticas das células leucêmicas, correlacionando-as com o diagnóstico, a classificação, a caracterização de diferentes estágios, a avaliação da remissão e prognóstico destas enfermidades (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2008). Os achados citogenéticos são o maior indicador do prognóstico para LMA e leucemia linfocítica aguda (LLA), e definem o tratamento. Eles são essenciais para a avaliação dos pacientes e a citogenética deve ser realizada sempre (MCKENNA, 2000).

Uma das anormalidade genéticas encontradas através da análise citogenética é o cromossomo Philadelphia (Ph). Ele resulta da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)]. O Ph é encontrado em 95% dos pacientes com

leucemia mielóide crônica (LMC) e em 20% dos pacientes com LLA de adultos e 2 a 5% de crianças (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

Das leucemias diagnosticadas em adultos, a LMA é a forma mais comum, chegando a 80%. A LMA se caracteriza pelo crescimento descontrolado dos blastos da linha mielóide e na maioria dos casos não existe uma causa evidente para a doença. O diagnóstico é feito pela análise das células em microscópio, identificação dos blastos e citogenética. O tratamento tem como objetivo induzir a remissão, ou seja, o desaparecimento dos blastos na medula óssea utilizando fármacos como a citarabina e a daunorrubicina (HAMERSCHLAK, 2008). As transformações malignas na leucemia mielóide aguda ocorrem ao nível de células tronco imaturas, independentemente do fenótipo da leucemia (BONNET; DICK, 1997).

Exposições ambientais à substâncias químicas, infecções e radiação ionizante como também anormalidades genéticas constitucionais estão associadas com as leucemias na infância, porém ainda não existe total comprovação. A maioria dos casos de leucemia infantil é de LLA com maior incidência ocorrendo entre 2 e 5 anos de idade. Cerca de 15 a 20% das leucemias em crianças são representadas pela LMA. Após os 20 anos de idade ocorre um ligeiro aumento na incidência da LMA, enquanto que na infância e adolescência ela é estável (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

A LMC pode ser facilmente diagnosticada devido aos seus típicos achados morfológicos e hematológicos. Ela ocorre quando há a translocação  $t(9;22)(q34;q11)$  ou a fusão gênica *BCR-ABL* detectado na fase crônica, acelerada ou crise blástica da doença. O cromossomo Ph,  $t(9;22)$ , é detectado em 90% a 95% dos pacientes na análise citogenética. São pouco os pacientes com LMC que são Ph negativos e *BCR-ABL* positivos. Há ainda outras anormalidades genéticas associadas com a progressão da doença que ocorrem em cerca de 70% a 80% dos pacientes (LICHTMAN; LIEVELD, 2001; RABINOWITZ; LARSON, 2004). O cromossomo Ph pode ser detectado também em outras leucemias como a LLA (RABINOWITZ; LARSON, 2004).

O objetivo do tratamento da LMC quando o cromossomo Ph está presente é a eliminação das células com este cromossomo para que ocorra uma remissão completa. O mesilato de imatinibe (Glivec<sup>®</sup>) é a medicação utilizada atualmente como primeira escolha de tratamento e tem resultados efetivos. Usam-se ainda a hidroxiuréia e o interferon no tratamento da LMC (ABRALE, 2012).

A LLA é a forma mais comum de câncer em crianças com prognóstico relativamente bom (KATZUNG, 2010). Ela ocorre devido a uma produção descontrolada de blastos linfóides e bloqueio na produção dos demais componentes sanguíneos. Os sinais e sintomas

são semelhantes aos da LMA e o diagnóstico é feito através de análise microscópica da medula óssea, imunofenotipagem e citogenética, sendo que o tratamento também deve considerar esses três tipos de análise. Vários fármacos são usados em combinação no tratamento desta doença, e quando o cromossomo Philadelphia (Ph) está presente o prognóstico é desfavorável e deve ser acrescentado um inibidor de tirosina-quinase na quimioterapia. A citarabina é um dos fármacos utilizado no tratamento desta leucemia (HAMERSCHLAK, 2008).

A quimioterapia baseada na citarabina induz uma remissão completa na maioria dos pacientes com LMA. Entretanto, remissões a longo prazo ocorrem somente em 25% dos pacientes (MAYER et al., 1994, WEISS et al., 1996). Após a remissão, o tratamento irá depender dos resultados da citogenética e das condições clínicas do paciente e então se intensificam as doses de quimioterápicos ou se parte para os transplantes de medula óssea (MROZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004).

A Leucemia linfocítica crônica (LLC) ocorre mais comumente em adultos, geralmente em pacientes acima dos 50 anos com a incidência aumentando à medida que avança a idade. Pacientes em estágios iniciais da doença têm um prognóstico relativamente bom, e a terapia não muda o curso da doença (KATZUNG, 2010). Ela é resultante de uma lesão adquirida, sem caráter hereditário, no DNA dos linfócitos na medula óssea. Ainda não se sabe o que exatamente produz essa lesão no DNA (ABRALE, 2012).

Pacientes com câncer possuem inúmeras células tumorais espalhadas pelo corpo no momento do diagnóstico. Se a administração tolerável de um medicamento eficaz for capaz de matar 99,99% de células tumorais, o tratamento deveria induzir uma remissão com melhora sintomática. Entretanto, ainda haveriam células espalhadas pelo corpo incluindo aquelas que poderiam ser resistentes ao fármaco devido à heterogeneidade dos tumores. Além disso, algumas células tumorais podem permanecer em locais do organismo onde a concentração efetiva de fármaco é difícil de ser alcançada. Combinações de fármacos com diferentes toxicidades e mecanismos de ação são frequentemente aplicados pois superam os limites de morte celular dos fármacos individualmente, podendo ser usados quase na dose limite, produzindo menos efeitos citotóxicos aditivos e, além disso, subclones resistentes a apenas um dos agentes podem potencialmente ser erradicados. O sinergismo dos fármacos é muito importante para o desenvolvimento de esquemas combinados de quimioterápicos. Por exemplo, a combinação da citarabina com antraciclina em leucemia mielóide aguda e vinblastina com cisplatina em tumor de testículo mostram o sinergismo dos fármacos contra o câncer mas não contra tecidos normais (KATZUNG, 2010).

Assim, os esquemas combinados de quimioterápicos apresentam vantagens, pois as drogas quando combinadas, podem diminuir a resistência tumoral e causar efeitos sinérgicos. Além disso, os efeitos colaterais podem ser reduzidos já que as doses de cada medicamento serão menores e o efeito tóxico ocorrerá em locais distintos do organismo (GOODMAN; GILMAN, 2007; ROCHA MAIA et al., 2010).

Através de estudos clínicos *in vivo*, foi provado que os triazenos possuem atividade antineoplásica em pacientes com leucemia aguda (TURRIZIANI et al., 2006; SEITER, 2002 e 2009), e que eles podem ser considerados como uma nova classe de agentes antineoplásicos para tratamento desta doença (TURRIZIANI et al., 2006). Domingues et al., em 2010, evidenciaram a atividade citotóxica de seis compostos triazenos inéditos frente a células de leucemia mielóide aguda e leucócitos sadios (DOMINGUES, 2010).

Os estudos no desenvolvimento de fármacos contra o câncer através de triagem empírica ou desenvolvimento racional de novos compostos estão em curso há mais de 3 décadas. Ensaio simples *in vitro* são realizados para medir a sensibilidade em células de tumores humanos e são usados frequentemente como testes de triagem primária para novos agentes. Em circunstâncias ideais, os fármacos anticâncer deveriam erradicar as células do câncer sem prejudicar os tecidos normais. Mas, atualmente, não existem agentes totalmente desprovidos de toxicidade e o seu uso clínico envolve uma ponderação sobre as vantagens e toxicidade em busca de um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2010).

A quimioterapia é comprovadamente efetiva no tratamento do câncer ocupando um importante lugar no arsenal terapêutico atual. Entretanto nos últimos anos tem havido um platô na evolução de resultados clínicos obtidos com os tratamentos quimioterápicos. Em alguns tipos de câncer, as mesmas limitações encontradas desde o início da quimioterapia (na década de 1940 com as mostardas nitrogenadas) ainda são observadas atualmente. A terapia antineoplásica começou com o desenvolvimento do uso clínico dos antagonistas do ácido fólico no tratamento de leucemias, e mostardas nitrogenadas em meados dos anos 1940 até metade da década de 1950 (FARBER et al., 1948). O desenvolvimento destes fármacos ocorreu principalmente devido à observações clínicas experimentais que induziram a um desenho racional de fármacos (GILMAN, 1946). Segundo Galmarini et al. (2012), para obter resultados na quimioterapia deve-se compreender a história natural de cada tipo de câncer em nível clínico e entender as barreiras fisiológicas que causam falhas nos tratamentos (GALMARINI; GALMARINI; GALMARINI, 2012).

De acordo com Galmarini et al, os quimioterápicos passaram por algumas fases desde seu surgimento. Primeiro foi a fase empírica ou quando a observação clínica era soberana.



Depois veio a fase racional ou das explicações biológicas para observações clínicas. Em seguida a fase logística ou era do empirismo racional onde o foco não era como desenvolver novos antineoplásicos, mas o conhecimento da logística entre o aumento do seu uso clínico e a obtção de resultados melhores. E, por último, a fase das terapias alvo na qual estamos, com destaque para o mesilato de imatinibe, um fármaco alvo molecular específico, usado no tratamento da LMC. A quimioterapia já provou que é muito efetiva em leucemias como a LLA infantil e LMC, porém ainda há muitas malignidades que precisam de novas possibilidades terapêuticas para serem combatidas. Ainda segundo este autor, o ideal para se obterem novos fármacos seria compreender a história clínica natural das neoplasias e os mecanismos de resistência aos fármacos existentes como ponto de partida para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (GALMARINI; GALMARINI; GALMARINI, 2012).

### 2.3 Bactérias

A introdução dos antimicrobianos na prática clínica foi o mais importante acontecimento da medicina moderna. A disponibilidade destes fármacos facilitou os cuidados, mas também gerou a resistência dos microrganismos, o que é uma das grandes ameaças para a saúde humana atualmente. Antes da era dos antibióticos, muitas infecções incuráveis eram rotina em hospitais e afetavam também as práticas cirúrgicas, e pacientes em tratamento contra o câncer, aumentando a mortalidade e morbidade. O principal fator que contribui para este problema até hoje é o uso indiscriminado dos antimicrobianos (GOTTLIEB; NIMMO, 2011).

A resistência vem sendo observada em hospitais, clínicas gerais e medicina veterinária. Alguns estudos mostram que uma grande proporção de antibióticos é usada de forma desnecessária e que isso varia marcadamente entre os países (WHO, 2011). A ineficácia crescente dos fármacos antimicrobianos faz com que os profissionais de saúde optem por alternativas mais tóxicas, mais caras e menos prováveis de terem disponibilidade oral. Tudo isso está relacionado com o aumento da morbidez e dos custos em saúde (WHO, 2011).

Qualquer espécie de bactéria pode adquirir resistência aos antimicrobianos. A resistência continua a se desenvolver e representa uma ameaça nas comunidades e em hospitais (BARKER, 2006). Assim, as propriedades medicinais de alguns derivados triazenos

têm sido investigadas. A literatura revela que derivados triazenos com substituintes amino são associados com uma boa atividade contra microrganismos gram-positivos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus*) e gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) (SRINIVAS et al., 2006; BLOTNY, 2006; ZHOU et al., 2006; NISHIGAKI et al., 1969).

A atividade antimicrobiana dos compostos triazenos é bem documentada. Em 1966, Shealy et al. relataram atividade contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei* (SHEALY; KRAUTH, 1966).

Um estudo realizado em 2001 mostrou hidroxitriazenos com atividade frente a bactérias gram-positivas (GOSWAMI; PUROHIT, 2001). Em 2005, 2006 e 2007, Zhou et al. sintetizaram uma série de triazenos com estrutura semelhante aos antibióticos aminoglicosídeos que foram capazes de inibir etapas da replicação bacteriana (ZHOU et al., 2005; ZHOU et al., 2006; ZHOU et al., 2007). E em 2008, Hörner et al. realizaram estudos com 15 compostos triazenos inéditos e evidenciaram que 12 deles possuíam alguma atividade antibacteriana contra bactérias como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium* sp. e *Enterobacter cloacae* (HÖRNER et al., 2008).

Complexos contendo ouro também mostram atividade frente a microrganismos. Os complexos tetraédricos bis-dentados de fosfina Au (I) apresentam moderada atividade antimicrobiana (BERNERS-PRICE et al., 1988). Complexos com Au (I) como Ph<sub>3</sub>PAu (imidazolato) mostram seletiva e significativa atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (NOMIYA et al., 2000). Análogos da auranofina também podem ter efeito seletivo contra bactérias gram-positivas (NOMIYA et al., 2003).

## 2.4 Ouro

Desde 2500 a.C. os árabes, chineses e indianos exploram o ouro para fins medicinais (HIGBY, 1982). No século XVII, usou-se o ouro para tratar sintomas como desmaios, febres e melancolia. No final do século XIX, foi usado para tratar sífilis e depois para curar o alcoolismo (FRICKER, 1999). Em 1890 o bacteriologista alemão Robert Koch descobriu que o ouro possuía propriedades bactericidas (KOCH, 1890). Isso marcou o início do uso do ouro com fins medicinais através de observação científica. O cianeto de ouro foi letal para o bacilo

da tuberculose, *in vitro*, e foi utilizado em 1920 para o tratamento da doença (UNVERZAGT, 1927).

Logo, passou-se a utilizar a terapia com ouro para outras doenças como artrite reumatóide, pois achava-se que se tratava de uma infecção bacteriana. Usou-se também contra o lúpus, colite ulcerativa e outras condições auto-imunes (MERCHANT, 1998). Há muito tempo que o ouro é considerado o mais nobre dos metais e um tesouro para o homem. É o único metal inerte ao oxigênio, umidade e enxofre, mesmo a temperaturas elevadas, mas pode ser atacado por halogêneos. Au (I) e Au (III) estão presentes em medicamentos e complexos de ouro submetidos a avaliação biológica (GIELEN; TIEKINK, 2005).

Os complexos de Au (I) têm a tendência de formar complexos de coordenação que são lineares e podem ser catiônicos, neutros ou aniônicos. Os ligantes mais favoráveis são os que contêm enxofre, selênio e átomos de fósforo (fosfinas). Doadores como nitrogênio (aminas, cianeto) e dialquil (fenil, metil) também são possíveis. As geometrias lineares de coordenação dominam o Au (I), mas estruturas com números de coordenação mais altos são conhecidos, como por exemplo os complexos planares trigonais com número de coordenação três como  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)_3]^+$  e  $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{AuCl}]$  (SCHMIDBAUR; FRANKE, 1972). No entanto, estes complexos são bastante instáveis e facilmente perdem ligantes fosfina para reverter para a geometria linear mais favorecida (BELLON, MANASSERO, SANSONI, 1969; KLANBERG, MUETTERTIES, GUGGENBERGER, 1968).

A rica química de coordenação e as propriedades redox dos complexos metálicos permitem que eles tenham diversas estruturas e propriedades químicas e biológicas que não se consegue ter com compostos puramente orgânicos. Ouro (I) e (III) podem formar cátions lipofílicos estáveis com propriedades anticâncer que podem ser modificadas pela variação de seus ligantes auxiliares (CHE; SUN, 2011).

Há muito tempo, o ouro vem sendo um metal valioso para aplicações biológicas (SCHMIDBAUR, 1999). Entre os agentes terapêuticos baseados em metal que não a platina, tem sido dada atenção especial aos compostos com ouro (SHAW III, 1999). A descoberta da cisplatina como antineoplásico despertou interesse em se pesquisar o potencial anticâncer de metais de transição como o ouro (RONCONI; SADLER, 2007). O sucesso da platina (II) no tratamento de algumas doenças malignas abriu esse campo de investigação (GUO; SADLER, 2000).

Quando a cisplatina foi inserida na clínica em 1979, houve um grande interesse para a investigação de possíveis fármacos contra o câncer baseados em metais (GUO; SADLER,

2000). Outros centros metálicos que não a platina foram estudados pois poderiam produzir efeitos específicos ou melhores contra o câncer *in vitro* e *in vivo* e poderiam se tornar fármacos clinicamente úteis (KEAN et al., 1985).

Os fármacos baseados na cisplatina representam a mais importante classe de agentes antineoplásicos (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003), porém os quimioterápicos baseados na platina possuem baixa seletividade para as células malignas e significativa toxicidade (ROSENBERG, 1977; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003) relacionada também com sua dose (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). A maior limitação para a aplicação clínica é o desenvolvimento de resistência adquirida pelas células tumorais (DESOIZE; MADOULET, 2002).

O comportamento cinético, a estabilidade termodinâmica dos complexos metálicos em ambiente biológico e a dependência das propriedades farmacológicas e biológicas em relação à formação dos adutos nos centros metálicos, faz com que uma mudança no íon metálico possa alterar a atividade antineoplásica dos compostos (DESOIZE, 2004). A primeira geração de compostos baseados em ouro, os tiolatos de ouro (I), foram usados para o tratamento da artrite reumatóide (GIELLEN; TIEKINK 2005). Em seguida surgiu a segunda geração destes fármacos, com destaque para a auranofina, um fármaco de ouro ativo oralmente (HILL; SUTTON, 1980). A auranofina foi aprovada em 1976 pelo FDA, também para uso contra a artrite reumatóide e é utilizada para este fim até hoje (ABDOU, et al., 2009; BERGLOF; BERGLOF; WALZ, 1978). Os seus análogos (complexos de fosfina ouro (I)) possuem atividade antitumoral *in vitro* e citotoxicidade frente a células tumorais *in vivo*. Estes complexos mostram um amplo espectro de atividade anticâncer, especialmente em linhagens celulares resistentes à cisplatina (ABDOU, et al., 2009).

O desenvolvimento de resistência à cisplatina é um problema sério que incentiva estudos sobre quais os mecanismos que fazem as células tumorais se tornarem resistentes a este fármaco (SIDDIK, 2003). Após serem expostas à baixas e prolongadas doses do fármaco, muitas linhagens de células tumorais se tornam resistentes (KARTALOU; ESSIGMANN, 2001). Em 2007, um estudo mostrou que a auranofina poderia superar a resistência da cisplatina em células humanas de câncer de ovário por induzir a apoptose (MARZANO et al., 2007). Vários mecanismos estão envolvidos nesta resistência, e ocorrem como consequência de alterações intracelulares que impedem a cisplatina de interagir com o DNA ou interferem nos sinais de danos ao DNA ativando as vias apoptóticas (SIDDIK, 2003; DONG et al., 1997). Através do teste de viabilidade com MTT, as células resistentes à cisplatina foram

sensíveis à auranofina, e as concentrações de auranofina necessárias para diminuir a viabilidade das células foi muito menor que as da cisplatina (MARZANO et al., 2007).

A eficaz geometria linear da auranofina faz com ela tenha ampla utilização (HILL; SUTTON, 1980). O possível papel do ligante fosfina na auranofina é aumentar a solubilidade lipídica para facilitar sua absorção no intestino. Diferente da primeira geração, que era injetável e causava danos aos rins, a auranofina tem uma boa biodistribuição ao longo do corpo. Assim, a concentração de ouro nos rins com efeitos prejudiciais é bem inferior para a auranofina, que é um fármaco baseado no ouro e solúvel em água. Porém, ainda assim, existem efeitos colaterais deletérios associados com essa terapia. Então, a vantagem de se usar esses fármacos está no fato de que não existe cura para a artrite reumatóide, apenas alívio para os sintomas (GIELLEN; TIEKINK, 2005).

Desde 1979, estudos mostram que a auranofina apresenta efeitos antiproliferativos *in vitro* em culturas de células de câncer humano. A auranofina foi capaz de forma rápida e preferencial inibir a síntese de DNA. Em resposta à auranofina, observou-se declínio da respiração celular, viabilidade das células, RNA e síntese de proteínas. Também se observou que os efeitos eram dose-dependentes e pareciam ser irreversíveis (SIMON et al., 1979 a ; SIMON et al., 1979 b).

Assim, examinou-se este composto em modelos de tumores em animais. O resultado foi que a auranofina inibiu o crescimento de leucemia linfocítica P388 e, em alguns excedeu os resultados obtidos com o 5-fluorouracil (SIMON et al., 1981), um potente agente anticâncer que teve sua primeira utilização em ensaios clínicos publicada em 1957 (HEIDELBERGER et al., 1957). O uso da auranofina como agente anticâncer era uma característica dos complexos coordenados com o ouro e representava, já naquela época, uma potencial aplicação terapêutica (SIMON et al., 1981). As propriedades anticâncer de vários complexos de fosfina ouro (I) (BERNERS-PRICE; FILIPOVSKA, 2008) e as propriedades anti-HIV dos complexos de ouro (I) e (III) tem sido muito estudadas desde então (FONTEH et al., 2010).

Uma variedade de cátions complexados com ouro (I) com ligantes fosfina tem mostrado potente atividade anticâncer *in vivo* e *in vitro*, em décadas recentes (SHAW III, 1999; BHABAK, BHUYAN, MUGESH, 2011; BERNERS-PRICE; FILIPOVSKA, 2008). Berners-Price et al. reportaram recentemente complexos mononucleares de ouro (I) com atividade anticâncer (BERNERS-PRICE; FILIPOVSKA, 2008; BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007). Um estudo mostrou que estes complexos foram altamente seletivos para as

células de câncer e com alvo nas selenoproteínas mitocondriais e tioredoxina redutase (HICKEY et al., 2008).

Compostos de ouro (I) possuem toxicidade relativamente baixa permite que este elemento possa ser componente de fármacos para consumo humano (ABDOU et al., 2009). Um estudo realizado em 2010, mostrou que alguns compostos complexados com ouro apresentaram valores de IC<sub>50</sub> duas vezes mais baixos quando comparados com a cisplatina e auranofina, em diferentes linhagens celulares, incluindo células de leucemia promielocítica (HL60) (GANDIN, 2010). Os fármacos baseados em ouro utilizados clinicamente devem ser considerados pró-fármacos que são submetidos a um rápido metabolismo *in vivo* para formar espécies farmacologicamente ativas (SHAW III, 1999; EISLER, 2003).

Alguns complexos contendo ouro (I) possuem solubilidade adequada e estabilidade em soluções aquosas, exibindo atividade anticancerígena inigualável atingindo as mitocôndrias e a enzima tioredoxina redutase em células cancerosas (BERNERS-PRICE; FILIPOVSKA, 2008; RUBBIANI et al., 2010).

A introdução de substituintes lipofílicos em cátions baseados em ouro mostra que isso geralmente aumenta a absorção celular e a atividade citotóxica. Porém, a solubilidade em meio aquoso pode diminuir, resultando em diminuição da biodisponibilidade em sistemas biológicos. Desta forma, o desenho de fármacos baseados em metais precisa ser balanceado de forma que considere suas propriedades citotóxicas mas que possua solubilidade em meio aquoso (CHE; SUN, 2011).

A química farmacêutica do ouro se dedica mais recentemente ao desenvolvimento de agentes antitumorais baseados em Au (I) e Au (III). As motivações para essas investigações se baseiam principalmente na evidência de que há uma ligação entre desordens inflamatórias e o câncer (GIELLEN; TIEKINK 2005).

Um estudo de longo prazo para triagem antitumoral de fármacos antiartríticos mostrou que pacientes submetidos a terapia com auranofina tinham risco reduzido para sofrer de câncer (FRIES et al., 1985). No entanto, a primeira menção de uma ligação entre inflamação e câncer remonta a 1863, quando se observou leucócitos em tecidos neoplásicos, e se passou a discutir as possíveis ligações entre as duas condições (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Outras razões para o desenvolvimento de complexos de ouro como agentes antitumorais, está relacionado com as semelhanças químicas e as estratégias de distribuição destes fármacos. Como os fármacos com Au (I) são bem tolerados em maior ou menor grau pelos pacientes, e se sabe que são pró-fármacos, a

utilização de Au (I) como uma plataforma para entrega de moléculas biologicamente ativas para o tratamento do câncer é um estímulo para o seu estudo (GIELLEN; TIEKINK 2005).

O potencial antitumoral dos complexos de ouro é demonstrado em experimentos, porém não são muitos os que têm sido inseridos em ensaios clínicos (TIEKINK, 2002). A auranofina apresentou citotoxicidade em células HeLa (SIMON et al., 1979 a), foi comprovadamente ativa contra células P388 de leucemia *in vivo* e possui uma bem documentada atividade antitumoral (SIMON et al., 1979 a). Uma série de complexos fosfina ouro (I) terciários com ligantes “*thiosugar*” foi ativo contra leucemia P388 e melanoma B16, *in vitro*, e P388 *in vivo* (MIRABELLI et al., 1986) indicando a importância do ligante fosfina ouro (I).

Devido ao seu tradicional uso como agente antiartrítico, os compostos de ouro são óbvios candidatos como possíveis alternativas aos fármacos antitumorais com platina (KEAN et al., 1985), pois mostram significativas propriedades tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SHAW III, 1999).

Complexos com Au (I) ou Au (III) podem ter um papel importante na medicina terapêutica, e já são usados para tratamento de artrite e condições asmáticas, e seu potencial contra doenças como o câncer e doenças tropicais está sendo investigado. Estes avanços indicam que a investigação contínua de complexos de ouro, e complexos com outros metais, é claramente justificada como novos agentes terapêuticos benéficos (GIELLEN; TIEKINK 2005).

Em pesquisa realizada em 2011, observou-se que complexos com ouro (I) foram citotóxicos para células cancerosas humanas (carcinoma cervical epitelioide, carcinoma de pulmão, carcinoma de mama, carcinoma de nasofaringe, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cólon, carcinoma de fígado e leucemia promielocítica) e induziram autofagia com a sua eficácia dependendo dos ligantes auxiliares. Logo, este pode ser um novo caminho para o desenvolvimento de complexos de ouro (I) contra o câncer (TIAN et al., 2011).

## 2.5 Teste de Viabilidade Celular e Clivagem do DNA

Para a análise da viabilidade celular de uma molécula uma técnica muito utilizada é a prova do {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (MTT), que é um

indicador colorimétrico (MOSMANN, 1983). As desidrogenases mitocondriais promovem a redução enzimática do MTT nas células viáveis; com isso formam-se cristais formazana insolúveis em água e solúveis apenas em solventes orgânicos. Então no meio de cultura com as células adiciona-se dimetil sulfoxido (DMSO), um solvente orgânico que solubiliza os cristais e o produto desta reação pode ser lido por espectrofotometria. Esta reação colorimétrica possibilita a identificação de células viáveis de acordo com a absorbância (MOSMANN, 1983).

Os fármacos antineoplásicos representam um ponto crítico dentro dos estudos de compreensão da farmacologia. Muitos exercem sua atividade através de uma combinação de apoptose e/ou necrose, apesar dos mecanismos moleculares de ação de alguns deles ainda não estarem bem elucidados clinicamente. Para melhorar a eficácia destes fármacos em uma fase específica do ciclo celular pode-se usar um escalonamento de doses apropriadas ou combinação com outros medicamentos (HAMED; ROTH, 2011). Para determinar a concentração farmacológica de um medicamento são usadas informações sobre a quantidade necessária para atingir uma determinada resposta biológica. Muitas vezes essa resposta é dada através da  $IC_{50}$  sem levar em conta a forma da curva ou dinâmica do processo (HAMED; ROTH, 2011). O valor da  $IC_{50}$  é calculado para cada fármaco e é definido como a concentração do medicamento que causa 50% de redução na viabilidade celular, ou dose necessária para atingir 50% de redução no crescimento celular (DOMINGUES et al., 2010).

Moléculas capazes de clivar o DNA, como os triazenos, são de grande interesse por poderem atuar como agentes quimioterápicos (SCHID; HUTCHINSON, 1974; FREY, et al. 1996). Muitos fármacos possuem esse efeito por clivarem o DNA de forma hidrolítica levando as células à morte (MIZUTANI et al., 2002). Vários pesquisadores têm relatado a capacidade dos triazenos em clivar o DNA. (BURR; MSELATI; THOMAS, 2003; HÖRNER, 2003; PARAGINSKI et al., 2006). Quando um composto cliva de forma hidrolítica os ácidos nucleicos, os fragmentos podem ser religados pela enzima T4-DNA ligase, mecanismo que ocorre quando utilizamos nucleases naturais; isso não ocorre se a clivagem é feita por mecanismo oxidativo, uma vez que são gerados radicais livres e fragmentos que não podem ser religados através da ação de enzimas (ROSSI et al., 2002; SCARPELLINI et al., 2003).

A hidrólise do DNA ou RNA catalizada por essas enzimas nucleases, que são as chamadas tesouras moleculares é muito importante para a área da biotecnologia e desenvolvimento de medicamentos (AN et al., 2006; SHAO et al., 2009). Essas enzimas sintéticas que clivam o DNA podem tornar-se enzimas de restrição direcionadas para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos (TAKASAKI; CHIN, 1994). Por isso, compostos



triazenos que clivam o DNA são interessantes por imitarem a função biológica de enzimas, sendo portanto chamadas nucleases artificiais ou químicas. O Berenil<sup>®</sup>, por exemplo, é um triazeno capaz de promover este tipo de clivagem (BURR; MSELATI; THOMAS, 2003).

Para estudar a capacidade dos fármacos de clivarem o DNA, são usadas técnicas de DNA recombinante e sequenciamento genético (BASHKIN, 1999; MISHRA, 2002). A capacidade de reconhecer e cortar em um local específico uma sequência definida de DNA é característica da enzima nuclease, encontrada em bactérias como *Escherichia coli* (BLACKBURN & GAIT, 1997). A importância desta enzima está no fato de que ela pode ser usada na manipulação de genes pois é uma nuclease de restrição, podendo ser usada na tecnologia do DNA recombinante e técnicas de sequenciamento genético (BASHKIN, 1999; MISHRA, 2002). Logo, moléculas capazes de clivar o DNA são de grande interesse por poderem atuar como agentes quimioterápicos (FREY, et al. 1996).

O design de pequenas moléculas que consigam se ligar e reagir com sequências específicas de DNA é muito importante à medida que se entende como a informação genética é expressada em nível molecular. O melhor entendimento de como atingir alvos específicos no DNA conduzirá ao desenvolvimento de novos antineoplásicos e agentes de diagnóstico altamente sensíveis (ERKKILA; ODOM; BARTON, 1999).

**MANUSCRITO – O referido manuscrito foi encaminhado para a tradução e o mesmo será submetido ao European Journal of Medicinal Chemistry.**

**Síntese, caracterização e análise da atividade biológica de quatro triazenos inéditos complexados com Au(I)**

**Abstract**

The complexes 1,3-*bis*(2-fluorophenyl)triazenide- $\kappa N$ -triphenylphosphine-  $\kappa P$ -gold (I) **1**, 1,3-*bis*(2-chlorophenyl)triazenide- $\kappa N$ -triphenylphosphine-  $\kappa P$ -gold (I) **2**, 1,3-*bis*(2-bromophenyl)triazenide- $\kappa N$ -triphenylphosphine-  $\kappa P$ -gold (I) **3** e 1,3-*bis*(2-iodophenyl)triazenide- $\kappa N$ -triphenylphosphine-  $\kappa P$ -gold (I) **4** were obtained by the deprotonation of the ligands triazenes adding triphenylphosphine gold (I), under room temperature. In this study we investigated the biological potential of four triazenes compounds for cytotoxicity to bone marrow cells from patients with different types of leukemia untreated and also against a control by colorimetric assay with MTT. Furthermore was also examined the antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacteria by broth microdilution method. All compounds showed significant cytotoxicity in tested different types of leukemia (acute myeloid leukemia, chronic myelogenous leukemia, acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia) and activity in strains of *Staphylococcus aureus*, and only compound 4 showed no significant antibacterial activity.

Keywords: Triazene. Complexes Au (I). Cytotoxicity. *Staphylococcus aureus*. Leukemia.

## 1 Introdução

O câncer tem sido a principal ameaça para a vida humana em todo mundo devido aos maus hábitos alimentares, aumento da poluição e também a maior expectativa de vida da população (ARNESANO; NATILE, 2009). Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos tem como objetivo maximizar as respostas terapêuticas através do aumento em sua seletividade (YOSHIKAWA et al. 2001). O mecanismo de ação dos fármacos antineoplásicos ocorre através da interação com o DNA inibindo a síntese de material genético ou causando algum dano irreparável (GOODMAN; GILMAN, 2007).

Dentre estes fármacos estão os agentes alquilantes, onde se encontram os triazenos (CHABNER; CALABRESI, 1995). O uso dos triazenos no desenvolvimento de moléculas contra o câncer é muito prevalente e eles têm sido usados na clínica contra diversificados tipos de tumores, incluindo as leucemias (SMITH; SCUDIERO; MICHEJDA, 2001; SANADA et al., 2004). Os triazenos possuem uma cadeia aberta com três átomos de nitrogênio interligados em sequência (HÖRNER et al., 2004), são representados por medicamentos como a temozolomida e dacarbazina e o grupo triazeno é comprovadamente o responsável por suas propriedades farmacológicas (MARCHESI et al., 2007).

Os fármacos baseados na química de coordenação com metais passaram a ser os principais compostos na luta contra o câncer após o sucesso da cisplatina no tratamento de várias neoplasias (ARNESANO; NATILE, 2009; HAMBLEY, 2007). A cisplatina apresenta diversos efeitos colaterais e também resistência adquirida, o que limita o seu uso clínico apesar de ser altamente eficaz em diferentes tipos de câncer (ZHANG; LIPPARD, 2003; KELLAND, 2000; BOULIKAS et al., 2007; SANTINI, 2011). Essas desvantagens relacionadas à cisplatina estimulam a pesquisa de outros fármacos citotóxicos baseados em metais com propriedades melhoradas (BRUIJNINCX & SADLER, 2008).

Os fármacos que apresentam o ouro em sua estrutura química também têm sido investigados como potenciais agentes antineoplásicos devido às suas aplicações no tratamento da artrite reumatóide, principalmente com derivados de fosfina ouro (I) (KOUROUSSIS et al., 2009). Por causa dessas evidências de que existe relação entre as desordens inflamatórias e o câncer, há um grande interesse no desenvolvimento de agentes antitumorais baseados em ouro (GIELLEN; TIEKINK 2005; KOUROUSSIS et al., 2009).

As interações dos compostos triazenos com o DNA vêm sendo interesse de muitos grupos de pesquisa no mundo todo, devido a capacidade que eles apresentam de interferir no

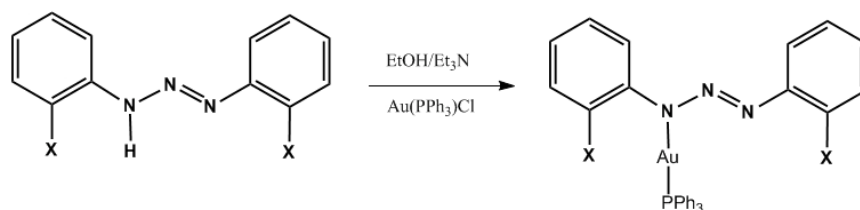
processo de proliferação celular resultando em novos fármacos antitumorais de grande importância, assim como os compostos baseados no ouro (GIELEN; TIEKINK 2005; CAPORASO et al., 2007; HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al, 2010). Desta forma, neste estudo nós apresentamos a síntese, caracterização e análise biológica de quatro compostos triazenos complexados com ouro I.

## 2 Resultados e Discussão

## 2 Resultados e Discussão

### 2.1. Química

Uma nova série de complexos triazenídicos *orto*-halo-substituídos com fragmento isolobal  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)]^+$ , complexos **1** – **4**, foram preparados de acordo com o Esquema 1. Estes complexos foram obtidos através da reação dos respectivos ligantes triazenidos, previamente sintetizados a partir de reagentes comerciais (Aldrich), em etanol com adição de algumas gotas de trietilamina, utilizado como agente desprotonante, seguido da adição de cloreto de trifetilfosfina de ouro (I) sólido.



Esquema 1: Síntese dos complexos triazenídicos *orto*-halo-substituídos com fragmento isolobal  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)]^+$  **1** – **4**. X = F para (**1**), Cl para (**2**), Br para (**3**) e I para (**4**).

### 2.2. Estrutura cristalina

#### 2.2.1. Caracterização da estrutura por difração raios X

Dados cristalinos e parâmetros experimentais para os complexos  $[1,3\text{-bis}(2\text{-fluorofenil})\text{triazenido-}\kappa\text{N}^1](\text{trifenilfosfina-}\kappa\text{P})\text{ouro(I)}$  (**1**),  $[1,3\text{-bis}(2\text{-clorofenil})\text{triazenido-}\kappa\text{N}^1](\text{trifenilfosfina-}\kappa\text{P})\text{ouro(I)}$  (**2**),  $[1,3\text{-bis}(2\text{-bromofenil})\text{triazenido-}\kappa\text{N}^1](\text{trifenilfosfina-}\kappa\text{P})\text{ouro(I)}$  (**3**),  $[1,3\text{-bis}(2\text{-iodofenil})\text{triazenido-}\kappa\text{N}^1](\text{trifenilfosfina-}\kappa\text{P})\text{ouro(I)}$  (**4**).

$\kappa P$ ouro(I) (**3**) e [1,3-*bis*(2-iodofenil)triazenido- $\kappa N^1$ ](trifenilfosfina-  $\kappa P$ ouro(I) (**4**), estão representados na Tabela 2, as distâncias e ângulos de ligações selecionadas estão listadas nas Tabelas 3 e a Figura 1 mostra as estruturas moleculares dos complexo **1** – **4**, representadas em elipsoides térmicos. As Figuras 2 e 3 mostram a cela unitária de **1** nos planos (0 1 1) e (1 1 0), respectivamente, incluindo as partes unidimensionais formadas *via* interações secundárias C–H...N e C–H...F. As Figuras 1 – 4 (Supplementary Information) mostram a cela unitária de **2** nos planos (0 1 1) e (1 1 0), incluindo arranjos supramoleculares unidimensionais formados *via* ligações de hidrogênio não clássicas do tipo C–H...N, C–H...Cl e C–H...C e as Figuras 6 – 8 (Supplementary Information) mostram as celas unitárias de **3** e **4**, incluindo arranjos unidimensionais *via* interações intermoleculares C–H...N e C–H...C.

A Figura 9 (Supplementary Information) mostra que as interações halogênio...halogênio observadas em **2**, **3** e **4**, as quais apresentam geometria Tipo I (RAMASUBBU et. al. 1986; WALSH et.al. 2001; FORNI et. Al. 2004; METRANGOLO et. Al. 2001) onde os ângulos C–X...X' e C'–X'...X são iguais ( $\angle C22-Cl...Cl' = \angle C22'-Cl'...Cl = 156,199 (0)^\circ$   $\angle C22-Br...Br' = \angle C22'-Br'...Br = 145,218 (0)^\circ$  e  $\angle C12-I...I' = \angle C12'-I'...I = 153,974 (0)^\circ$ ).

#### 4.2. Estrutura cristalina dos complexos **1** - **4**

O complexo de Au(I) **1** cristaliza no sistema cristalino ortorrômbico com grupo espacial  $P2_12_12_1$ . Já os complexos **2**, **3** e **4** cristalizam no sistema cristalino monoclinico com grupo espacial  $P2_1/n$ , este grupo espacial envolve uma transformação especial do grupo espacial  $P2_1/c$  com a troca dos eixos cristalográficos *a* e *c*, sendo que o eixo *a* corresponde a diagonal dos eixos cristalográficos *ac* do grupo espacial padrão  $P2_1/c$ . Cada cela unitária contém quatro fórmulas elementares ( $Z = 4$ ).

As estruturas cristalinas de **1** – **4** apresentam complexos neutros mononucleares de ouro (I) com número de coordenação dois. O íon triazenido desprotonado atua como ligante N- $\eta^1$ monodentado com dois elétrons doadores, enquanto que uma molécula neutra de trifenilfosfina completa a esfera de coordenação do íon metálico apresentando uma geometria linear levemente distorcida (Figura 1).

As distâncias de ligação Au–N de 2.064(5), 2.0814(14), 2.092(0) e 2.099(2) Å, em 1, 2, 3 e 4, respectivamente, são similares à soma dos raios covalentes 2.04 Å (ALLEN et. al. 1987) E correspondem à ligação simples covalente.

As estruturas cristalinas são estabilizadas por ligações de hidrogênio não clássicas intermoleculares (**Tabela 4**). A estrutura cristalina do complexo **1** revela pares centrossimétricos de moléculas, gerados *via* ligações de hidrogênio não clássicas

intermoleculares com geometria bifurcado ( $D-H \cdots (A1, A2)$  ( $D = \text{átomo doador}$ ,  $A = \text{átomo aceptor}$ ), ( $C35-H35 \cdots (N13', F2')$ ), código de simetria ( $'$ ) $1-x, -0.5+y, 1.5-$ , formado um arranjo unidimensional que cresce ao longo do eixo cristalográfico  $[1\ 0\ 0]$ . Além disto, estes pares centrossimétricos estão associados *via* interações intermoleculares  $C52'-H52' \cdots F1$ . A estrutura cristalina do complexo **2** apresenta arranjos supramoleculares unidimensionais infinitos ao longo dos eixos cristalográficos  $[0\ 1\ 0]$  e  $[1\ 0\ 1]$  *via* ligações de hidrogênio não clássicas intermoleculares  $C34'-H34' \cdots N11$  e  $C53''-H53'' \cdots N12$ , códigos de simetria: ( $'$ )  $x, 1+y, z$  e ( $''$ )  $0.5+x, 0.5-y, 0.5+z$ . Os complexos **3** e **4** são isoestruturais, apresentam arranjos supramoleculares infinitos ao longo do eixo cristalográfico  $[0\ 1\ 0]$  formados por ligações de hidrogênio não clássicas  $C15-H15 \cdots N11$ ,  $C44-H44 \cdots N11$  e  $C36-H36 \cdots C33$  para o complexo **3** e  $C25-H25 \cdots N13$ ,  $C44-H44 \cdots N13$  e  $C56-H56 \cdots C53$  para o complexo **4**.

As estruturas cristalinas de **2**, **3** e **4** apresentam interações halogênio  $\cdots$  halogênio ( $C-X \cdots X-C$ ), formando dímeros centrossimétricos gerado por um centro de inversão com localização na cela unitária em  $[1\ 0\ 0]$  para **2**;  $[0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}]$  para **3** e  $[\frac{1}{2}\ 0\ \frac{1}{2}]$  para **4**, e apresentam distâncias  $X \cdots X$  iguais a 3.3715(1), 3.3781(0) e 3.5893(0) Å, valores maiores que a soma dos raios de van der Waals, 3,5; 3,7 e 3,96 Å, para **1**, **2**, **3** e **4**, respectivamente (Tabela 5). Estas interações Halogênio  $\cdots$  Halogênio são denotadas como Tipo I ( $\theta_1 = \theta_2$ ) onde os átomos de halogênio estão realacionados por um centro de inversão, como descrito na literatura (GONNADE, et. al.2007; KASTAS, et. al. 2012; HATHWAR, et. al., 2011).

Os ângulos interplanares entre os fragmentos moleculares dos complexos **1** – **4**, Tabela 6 (Figura 10 - Supplementary Information), demonstra que a deslocalização dos elétrons  $\pi$  no grupo triazenido desprotonado  $[N-N-N]^-$ , resultando em um significativo desvio da planaridade.

## 2.3. Atividade biológica

### 2.3.1. Citotoxicidade

A atividade citotóxica dos compostos trizenos deste estudo, investigada pelo método de redução do MTT em células de medula óssea de pacientes com leucemia, mostrou resultados promissores. Foram usadas células de medula óssea de 12 pacientes com suspeita clínica de leucemia e 1 paciente controle sem a doença. Essas células foram expostas aos

compostos durante 24 horas para avaliar seus efeitos antiproliferativos. A avaliação destes resultados pode ser vista através da Tabela 6, em que estão dispostos os valores da IC<sub>50</sub> para cada composto testado de acordo com o tipo de leucemia que cada paciente apresentava. A sensibilidade das células ao tratamento com o triazeno foi expressa em termos de IC<sub>50</sub> (concentração do fármaco que produz 50% de inibição do crescimento das células, calculado por regressão não linear onde os valores de absorvância em 570 nm foram plotados contra o logaritmo da concentração do triazeno). A atividade antineoplásica dos triazenos foi comprovada em pacientes com leucemia aguda em alguns estudos (TURRIZIANI et al., 2006; SEITER, 2002 e 2009), e Turriziani et al. em 2006, também mostraram que estes compostos poderiam representar uma nova classe de fármacos antineoplásicos para o tratamento desta doença (TURRIZIANI et al, 2006).

As células leucêmicas, segundo Gadjeva em 2002, apresentam um metabolismo mais acelerado e um maior decréscimo na porcentagem de viabilidade quando expostas a um composto citotóxico. Assim, é esperado que nas células sadias essa viabilidade seja maior (GADJEVA, 2002). Uma saída é a seletividade do tratamento através de fármacos direcionados especificamente contra os oncogenes que induzem o crescimento celular (COOPER, 2001). Porém em nosso paciente controle, que possuía contagem elevada de leucócitos mas nenhum tipo de leucemia, a citotoxicidade dos compostos se manteve como nas células leucêmicas. Isso indica que os triazenos testados não possuem atividade seletiva.

Tabela 6 - Valor de IC<sub>50</sub> (μmol mL<sup>-1</sup>) para os quatro compostos triazenos testados no estudo de acordo com os pacientes e tipo de leucemia.

Número do paciente/ Tipo de leucemia	Composto 1 (F) IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> )	Composto 2 (Cl) IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> )	Composto 3 (Br) IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> )	Composto 4 (I) IC <sub>50</sub> (μmol mL <sup>-1</sup> )
1 LMA	0,264	3,260	Não realizado	0,225
2 LMA	Não realizado	Não realizado	10,28	16,42
3 LMA	5,743	3,220	Não realizado	1,769
<b>4 LMA</b>	0,4088	<b>0,0107</b>	0,1059	<b>0,0057</b>
5 LMC	0,037	Não realizado	Não realizado	0,1544
6 LMC	2,054	5,688	17,54	26,24
7 LMC	1,897	2,927	15,17	0,0724
8 LMC	Não realizado	Não realizado	2,061	22,89
9 LMC	3,001	17,66	13,75	4,386
10 LLC	1,388	2,931	0,1746	0,3636

11 LLA	0,6427	7,415	0,0775	0,6385
12 LLA	Não realizado	Não realizado	1,991	0,6694
13 CONTROLE	0,7817	0,0188	0,0740	2,0

\* Não realizado por falta de número suficiente de células para a técnica.

LMA = leucemia mielóide aguda; LMC = leucemia mielóide crônica; LLA = leucemia linfocítica aguda; LLC = leucemia linfocítica crônica; CONTROLE = paciente com leucose aguda mas sem leucemia.

O composto 4 apresentou  $IC_{50}$  de  $0,0057 \mu\text{mol mL}^{-1}$ , para um paciente com LMA, sendo portanto, o melhor resultado para este estudo (considerando valores de  $IC_{50}$  até  $3,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ). Em 1995, dados já mostravam que células de um paciente com LMA eram sensíveis à temozolomida e dacarbazina, dois triazenos comercialmente disponíveis (D'ATRI et al., 1995). Em pesquisa realizada em 2010, o valor de  $IC_{50}$  para a dacarbazina frente a um paciente com LMA foi de  $132,4 \mu\text{mol mL}^{-1}$  (DOMINGUES et al., 2010). Além disso, para 3 compostos triazenos deste estudo os valores da  $IC_{50}$  para 3 pacientes que apresentavam LMA variaram de 1,83 até  $116,6 \mu\text{M/mL}$  (DOMINGUES et al., 2010). Também em 2010, 3 complexos com ouro (I) mostraram uma atividade citotóxica contra linhagens de câncer incluindo leucemia HL60 com valores médios de  $IC_{50}$  cerca de 15 a 20 vezes mais baixos que aqueles obtidos com a cisplatina e comparáveis com a fosfina ouro (I). Os valores de  $IC_{50}$  entre todos os compostos e linhagens celulares testados variaram de 0,08 até  $29,21 \mu\text{M}$ , sendo que o valor mais alto se refere à cisplatina (GANDIN et al., 2010).

O segundo melhor valor de  $IC_{50}$  foi  $0,0107 \mu\text{mol mL}^{-1}$  para o composto 2, nas células do mesmo paciente. A LMA é o tipo de leucemia mais diagnosticada em adultos (HAMERSCHLAK, 2008). O tratamento antineoplásico para a LMA é baseada na citarabina que induz remissão completa na maioria dos pacientes. Porém podem ocorrer remissões a longo prazo, e se isto acontece a dose dos medicamentos é intensificada (MROZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004). Neste fato reside a importância de se obterem novos fármacos para o tratamento desta doença.

Considerando os resultados apresentados, podemos perceber que nenhum dos compostos apresentou atividade seletiva frente aos diferentes tipos de leucemia, pois as células saudáveis do nosso controle apresentaram alta porcentagem de morte celular também. O composto 4 que foi o mais ativo frente a uma LMA apresentou maior porcentagem de morte celular na dose de  $12,5 \mu\text{g/mL}$  (93,53% de morte celular) não sendo, portanto, dose dependente. O tratamento padrão para esta neoplasia, atualmente, consiste no fármaco citarabina. Segundo Katzung em 2010, a dose de citarabina que não causa toxicidade ao paciente seria de  $100 \text{mg/m}^2/\text{dia}$  (KATZUNG, 2010).



Os compostos triazenos utilizados neste estudo não apresentaram clivagem do DNA em nenhuma das condições testadas. Segundo estudo feito por Paraginski et al em 2007, um dos triazenos testados foi capaz de clivar eficientemente o DNA plasmidial superenovelado para o DNA circular aberto a 50 °C em pH 8,0. Ele foi quantificado por densitometria das bandas após eletroforese em gel de agarose. Depois, foram realizadas as clivagens na presença de sequestradores de radicais livres (glicerol, DMSO e tiouréia). Este estudo, assim como no de Hörner et al. em 2003, concluiu que o mecanismo de clivagem dos triazenos em questão, era hidrolítico (HÖRNER et al., 2003; PARAGINSKI et al., 2007).

Muitos triazenos têm aplicações clínicas importantes no desenvolvimento de moléculas contra o câncer (KIMBALL; HALEY, 2002); porém existem os fenômenos de resistência adquirida relacionados aos agentes alquilantes. A transferência de grupos alquila para vários componentes celulares é a forma dos fármacos alquilantes de exercerem seu efeitos citotóxicos e a interação responsável pela morte celular é a alquilação com o DNA que acontece no núcleo (KATZUNG, 2010).

Há mais de três décadas existem estudos para o desenvolvimento de fármacos contra o câncer. Em circunstâncias ideais, os fármacos antineoplásicos deveriam erradicar as células malignas sem prejudicar as normais. Mas, atualmente, não existem agentes totalmente desprovidos de toxicidade e o seu uso clínico envolve uma ponderação sobre as vantagens e toxicidade em busca de um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 2010).

### 2.3.2. Atividade Antibacteriana

O uso indiscriminado de antimicrobianos é o principal causador de resistência aos fármacos disponíveis atualmente (GOTTLIEB; NIMMO, 2011). A resistência é observada tanto nas comunidades como também em ambientes hospitalares. A crescente ineficácia dos antimicrobianos faz com que se opte por alternativas mais tóxicas e caras que aumentam a morbidez e os custos na área da saúde (WHO, 2011).

Em nosso estudo, todos os compostos apresentaram uma significativa atividade frente aos microrganismos gram-positivos, com exceção do composto 4. Destacamos a atividade do composto 1 frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, com valor de CIM igual a 16µg/mL

para a cepa ATCC 25923 e 64µg/mL para a ATCC 29213. Ele também foi ativo frente as cepas multiresistentes de *S. aureus* com valor igual a 32µg/mL para uma delas, e igual a 64µg/mL para as outras duas. Também mostrou atividade frente a cepa ATCC 7468 de *Micrococcus luteus* e duas diferentes cepas multiresistentes de *Staphylococcus epidermidis*. Os demais resultados encontram-se na Tabela 7 nas Informações suplementares. A maior atividade dos triazenos nas bactérias gram-positivas provavelmente se deve ao fato da membrana das bactérias gram-negativas ser mais complexa que as gram-positivas, o que representaria uma barreira para a penetração dos compostos (BUSH; JACOBY, 2010; DOMINGUES et al., 2010).

Dados da literatura mostram que os triazenos possuem comprovada atividade contra microrganismos gram-positivos incluindo *Staphylococcus aureus* (SRINIVAS et al., 2006; BLOTNY, 2006; ZHOU et al., 2006; NISHIGAKI et al., 1969; SHEALY; KRAUTH, 1966; GOSWAMI; PUROHIT, 2001; HÖRNER et al., 2008), e além disso complexos contendo ouro também possuem atividade frente a diferentes bactérias (BERNERS-PRICE et al, 1988; NOMIYA et al., 2000; NOMIYA et al., 2003).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes bacterianos causadores de infecções comunitárias e hospitalares de todo o mundo. Esta bactéria apresenta numerosos fatores de virulência incluindo toxinas que enfraquecem o sistema imune permitindo a disseminação bacteriana pelo organismo (ADHIKARI et al., 2012). O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) se propagou de forma global e trata-se de um patógeno problema para a saúde pública em todo o mundo. O MRSA é altamente prevalente na América Latina sendo que, os antimicrobianos disponíveis atualmente para o seu tratamento compreendem agentes tópicos, orais e para infusão intravenosa. Dentre os agentes intravenosos a vancomicina ainda é o tratamento de escolha para os MRSA. Porém, seu uso frequente resultou no surgimento de cepas resistentes a este fármaco (LUNA et al., 2010). Assim uma das opções para o tratamento de MRSA inclui a daptomicina que possui efeito bactericida para infecções causadas por essa bactéria (BOUCHER; SAKOULAS, 2007).

Todas as cepas multiresistentes de *S. aureus* desse estudo são MRSA, mas sensíveis a vancomicina. Para se obter um tratamento bem sucedido nas infecções causadas por MRSA ele deve ser feito a longo prazo, incluindo o monitoramento do possível surgimento de padrões de resistência aos antimicrobianos, e também o desenvolvimento de novas terapias (BAUDEL et al., 2009).

### 3. Conclusão

Os quatro compostos que fizeram parte deste estudo apresentaram promissora atividade citotóxica frente a diferentes tipos de leucemia, tanto agudas quanto crônicas. Sabe-se que os triazenos possuem atividade antineoplásica comprovada em tumores sólidos e leucemias, e por isto são muito usados na prática clínica, como por exemplo a dacarbazina e a temozolomida. Além disso, compostos contendo ouro também exibem interessante atividade anticancerígena devido a relação existente entre os processos inflamatórios e o desenvolvimento do câncer (GIELLEN; TIEKINK, 2005).

Todos os compostos foram ativos frente aos leucócitos normais ou o controle revelando uma atividade citotóxica não seletiva.

O provável mecanismo de ação dos compostos apresentados neste estudo é o mesmo que o dos agentes alquilantes, onde se incluem os triazenos.

Os resultados frente as bactérias gram-positivas também indicam que estes compostos possuem promissor potencial antimicrobiano.

### 4. Material e Métodos

#### 4.1. *Materiais e métodos físicos*

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos por um espectrômetro de ressonância magnética e nuclear da marca BRUKER 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  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2. *Síntese*

#### 4.2.1. Síntese do [1,3-bis(2-fluorofenil)triazenido- $\kappa N^1$ ](trifenilfosfina- $\kappa P$ )ouro(I) **1**

Para a solução de 1,3-bis-(2-fluorofenil)triazeno (0.1mmol, 0.695g) em etanol (3 mL), foi adicionado trietilamina (0.1 mmol, 0.016 mL, 10% excesso), foi observado a mudança de coloração de amarelo claro para amarelo escuro. Após, sob agitação, foi adicionado cloreto de trifenilfosfina de ouro (I), [AuPPh<sub>3</sub>]Cl, (0.1 mmol, 0.0495g) sólido. A reação prosseguiu por 12 horas a temperatura ambiente. Solução alaranjada obtida foi filtrada. Cristais alaranjados foram obtidos por lenta evaporação do solvente, lavados com porções de MeOH e secos sob vácuo. P.F. 187° C; IR (KBr)  $\nu/cm^{-1}$ :  $\nu(C=C)$  em 1629  $cm^{-1}$ ;  $\delta(C=C)_{Ar}$  = 1494 $cm^{-1}$ ;  $\nu(N=N)$  = 1434  $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-F)$  = 1301 $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-N)$  = 1224 $cm^{-1}$ ;  $\nu(N-N)$  = 1188  $cm^{-1}$ ;  $\nu_{fosfina}$  = 1103 $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-H)_{fora\ do\ plano}$  = 839 - 694  $cm^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d):  $\delta$  = 7,78 – 7,68 (m,  $J$  = 7,73 Hz, 7H, ArH); 7,52 – 7,51 (d,  $J$  = 7,52 Hz, 9 H, ArH); 7,28 (s,  $J$  = 7,28 Hz, <sup>1</sup>H, ArH); 7,12 – 7,07 (dd,  $J$  = 7,09 Hz, 3H, ArH); 7,02 – 6,97 (m,  $J$  = 6,99 Hz, 2H, ArH).; <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d):  $\delta$  = 134,35(d,  $J_{CP}$  = 13,7 Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, *orto*); 131,55 (s, Ph); 129,11 (d,  $J_{CP}$  = 11,8 Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, *meta*); 124,10 (s, Ph); 123,39 (d,  $J_{CF}$  = 7,7 Hz); 120,43 (s, Ph); 116,10 (s, Ph); 115,90 (s, Ph). UV-Vis  $\lambda_{max}/nm$ . (DMSO) 271; 275; 294 e 38. EA para CHN (%), calcd.: C 52,11; H 3,35; N 6,08; exper.: C 51,86; H 3,245; N 6,045.

#### 4.2.2. Síntese do [1,3-bis(2-clororofenil)triazenido- $\kappa N^1$ ](trifenilfosfina- $\kappa P$ )ouro(I) **2**

O composto **2** foi preparado da mesma forma do composto **1**, substituindo o ligante 1,3-bis-(2-fluorofenil)triazeno pelo ligante 1,3-bis-(2-clorofenil)triazeno (0.1 mmol, 0.0266 g). Cristais alaranjados foram obtidos por lenta evaporação do solvente, lavados com porções de MeOH e secos sob vácuo. P.F. 177°C; IR (KBr)  $\nu/cm^{-1}$ :  $\nu(C=C)$  em 1581  $cm^{-1}$ ;  $\delta(C=C)_{Ar}$  = 1463 $cm^{-1}$ ;  $\nu(N=N)$  = 1379  $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-Cl)$  = 1292 $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-N)$  = 1251 $cm^{-1}$ ;  $\nu(N-N)$  = 1180  $cm^{-1}$ ;  $\nu_{fosfina}$  = 1101 $cm^{-1}$ ;  $\nu(C-H)_{fora\ do\ plano}$  = 748 - 692  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d):  $\delta$  = 7.84 – 7.82 (d,  $J$  = 7.83 Hz, 3H, ArH); 7.74 – 7.61 (m,  $J$  = 7.68 Hz, 8 H, ArH); 7.50 – 7.49 (d,  $J$  = 7.49 Hz, 9H, ArH); 7.32 – 7.28 (t,  $J$  = 7.30 Hz, 1H, ArH); 6.80 – 6.76 (t,  $J$  = 6.78 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d):  $\delta$  = 134.45(s, Ph); 132.02 (d,  $J_{CP}$  = 9.8 Hz, Ph); 130.70 (s, Ph); 130.49 (s, Ph); 128.49 (d,  $J_{CP}$  = 12.1 Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, *meta*); 127.18 (s, Ph); 124.81 (s, Ph); 124.27 (s, Ph); 119.27 (s, Ph); 117.54 (s, Ph); 114.99 (s, Ph). UV-Vis  $\lambda_{max}/nm$ . (DMSO) 269; 275; 299 e 381. EA para CHN (%), calcd.: C 49.74; H 3.20; N 5.80; exper.: C 46.89; H 3.09; N 5.4.

#### 4.2.3. Síntese do [1,3-bis(2-bromofenil)triazenido- $\kappa N^1$ ](trifenilfosfina- $\kappa P$ )ouro(I) **3**

O composto **3** foi preparado da mesma forma do composto **1**, substituindo o ligante 1,3-bis-(2-fluorofenil)triazeno pelo ligante 1,3-bis-(2-bromofenil)triazeno (0.1 mmol, 0.0355 g). Cristais alaranjados foram obtidos por lenta evaporação do solvente, lavados com porções de MeOH e secos sob vácuo. P.F. 181°C; IR (KBr)  $\nu/cm^{-1}$ :  $\nu(C=C)$  em 1618  $cm^{-1}$ ;  $\delta(C=C)_{Ar} = 1460\ cm^{-1}$ ;  $\nu(N=N) = 1434\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-Br) = 1301\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-N) = 1249\ cm^{-1}$ ;  $\nu(N-N) = 1176\ cm^{-1}$ ;  $\nu_{fosfina} = 1101-1024\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-H)_{fora\ do\ plano} = 748 - 694\ cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ ):  $\delta = 7,72 - 7,68$  (m,  $J = 7,67$  Hz, 9H, ArH); 7.50 (tdd,  $J = 7.2$  Hz, 11H, ArH); 7.29-7.23 (m,  $J = 7.25$  Hz, 2H, ArH); 6.94 – 6.89 (m,  $J = 6.91$  Hz, 1H, ArH).;  $^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ ):  $\delta = 132.02$ (d,  $J_{CP} = 9.8$  Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, *orto*); 130.70 (s, Ph); 130.49 (s, Ph); 128.49 (d,  $J_{CP} = 12.1$  Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, *meta*); 127.18 (s, Ph); 124.81 (s, Ph); 124.27 (s, Ph); 119.27 (s, Ph); 117.54 (s, Ph); 114.99 (s, Ph). UV-Vis  $\lambda_{max}/nm$ . (DMSO) 270; 275; 301 e 385. EA para CHN (%), calcd.: C 44.31; H 2.85; N 5.17; exper.: C 44.265; H 2.685; N 5.12.

#### 4.2.4. Síntese do [1,3-bis(2-iodofenil)triazenido- $\kappa N^1$ ](trifenilfosfina- $\kappa P$ )ouro(I) **4**

O composto **4** foi preparado da mesma forma do composto **1**, substituindo o ligante 1,3-bis-(2-fluorofenil)triazeno pelo ligante 1,3-bis-(2-iodofenil)triazeno (0.1 mmol, 0.045 g). Cristais alaranjados foram obtidos por lenta evaporação do solvente, lavados com porções de MeOH e secos sob vácuo. P.F. 164°C; IR (KBr)  $\nu/cm^{-1}$ :  $\nu(C=C)$  em 1573  $cm^{-1}$ ;  $\delta(C=C)_{Ar} = 1454\ cm^{-1}$ ;  $\nu(N=N) = 1434\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-I) = 1245\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-N) = 1168\ cm^{-1}$ ;  $\nu(N-N) = 1159\ cm^{-1}$ ;  $\nu_{fosfina} = 1099\ cm^{-1}$ ;  $\nu(C-H)_{fora\ do\ plano} = 746 - 675\ cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ ):  $\delta = 7.69 - 7.67$  (d,  $J = 7.68$  Hz, 8H, ArH); 7.56 – 7.46 (m,  $J = 7.51$  Hz, 12 H, ArH); 7.28 – 7.24 (m,  $J = 7.26$  Hz, 2H, ArH); 6.93 – 6.90 (t,  $J = 6.92$  Hz, 2H, ArH).;  $^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ ):  $\delta = 134.35$  (d,  $J_{CP} = 13.7$  Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 133.56 (s, Ph); 132.00 (s, Ph); 129.11 (d,  $J_{CP} = 11.8$  Hz, AuPC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 128.22 (s, Ph); 124.88 (s, Ph); 121.81 (s, Ph); 117.11 (s, Ph). UV-Vis  $\lambda_{max}/nm$ . (DMSO) 270; 275; 301 e 386. EA para CHN (%), calcd.: C 39.71; H 2.56; N 4.63; exper.: C 43.435; H 2.78; N 4.7.

### 4.3. 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 Devide 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 (BUSH & JACOBY, 2010) 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 (BURLA et. al., 2005; SHELDRICK, 1997). 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 (FARRUGIA, 1999). As representações gráficas das estruturas foram geradas com o programa DIAMOND (BRANDENBURG, 2005). As coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio dos anéis fenila foram obtidas geometricamente [ $C(sp^2)-H = 0.93 \text{ \AA}$ ], [ $N(sp^3)-H = 0.89 \text{ \AA}$ ] e refinados na forma anexada aos respectivos átomos de carbono e nitrogênio, incluindo parâmetros térmicos isotrópicos, com valores  $U_{ISO}(H)$  relacionados a  $1.2 U_{eq}Csp^2$ ,  $1.2 U_{eq}Nsp^2$  e  $1.2U_{eq} Nsp^3$ , respectivamente (SHELDRICK, 1997).

#### 4.4. Espectros de UV-Vis

Os estudos dos espectros eletrônicos, na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), foram realizados com soluções dos complexos em DMSO na faixa de 190-590 nm. A figura XX mostra as principais transições dos grupamentos [N=N] em 388; 381; 385 e 386 nm para **1**, **2**, **3** e **4**, respectivamente, transições relacionadas as transições  $n \rightarrow \pi^*$ , comprimento de onda correspondente à cor amarela observada e à cor violeta absorvida, característica de compostos triazenídicos. As bandas observadas em aproximadamente 300 nm são atribuídas as transições  $\pi \rightarrow \sigma^*$  referente a ligação C-X (X = F, Cl, Br e I). Bandas na faixa de 275 nm, transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos, e as transições do grupo [N=N=N] são caracterizadas na faixa de 300 nm.

Tabela 1- Dados da coleta e intensidade e refinamento da estrutura cristalina e molecular dos complexos triazenos 1-4.

Compostos	1	2	3	4
Empirical formula	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> F <sub>2</sub> PAu	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> PAu	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> PAu	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> I <sub>2</sub> PAu
Formula weight	691.45	724.35	813.3	907.25
Temperature	100(2) K	100(2) K	296(2) K	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Crystal system	Orthorhombic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (N° 19)	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> /n (N° 14)	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> /n (N° 14)	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> /n (N° 14)
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 11.0879 (2) Å <i>b</i> = 13.2870 (2) Å <i>c</i> = 17.5634 (3) Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	<i>a</i> = 16.0576 (3) Å <i>b</i> = 8.9348 (2) Å <i>c</i> = 18.8246 (3) Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 99.9940 (10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	<i>a</i> = 16.2257(2) Å <i>b</i> = 9.1796(1) Å <i>c</i> = 18.9095(3) Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 99.076(1)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	<i>a</i> = 16.3145 (2) Å <i>b</i> = 9.41900 (10) Å <i>c</i> = 18.6788 (2) Å $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 97.0060(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	2587.95(8) Å <sup>3</sup>	2659.81 (9) Å <sup>3</sup>	2781.22 Å <sup>3</sup>	2848.87 (6) Å <sup>3</sup>
Z	4	4	4	4
Density (calculated)	1.775 Mg/m <sup>3</sup>	1.809 Mg/m <sup>3</sup>	1.94 Mg/m <sup>3</sup>	2.115 Mg/m <sup>3</sup>
Absorption coeficiente	5.785 mm <sup>-1</sup>	5.818 mm <sup>-1</sup>	8.245 mm <sup>-1</sup>	7.412 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1344	1408	1551.6	1696
Crystal size	0.35 X 0.20 X 0.09 mm <sup>3</sup>	0.39 X 0.38 X 0.027 mm <sup>3</sup>	0.08 X 0.133 X 0.32 mm <sup>3</sup>	0.27 X 0.26 X 0.23 mm <sup>3</sup>
Theta range for data collection	1.92 to 27.16°	2.53 to 30.25°	2.47 to 29.43	2.50 to 30.11°
Index ranges	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14; -17 ≤ <i>k</i> ≤ 17; -22 ≤ <i>l</i> ≤ 22	-22 ≤ <i>h</i> ≤ 22; -12 ≤ <i>k</i> ≤ 10;- 26 ≤ <i>l</i> ≤ 26	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14; -17 ≤ <i>k</i> ≤ 17; -22 ≤ <i>l</i> ≤ 22	-23 ≤ <i>h</i> ≤ 13; -13 ≤ <i>k</i> ≤ 13; -26 ≤ <i>l</i> ≤ 26
Reflections collected	22539	28318		31132
Independent reflections	5729 [ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0.0336]	7899 [ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0.0181]	[ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0.0336]	8384 [ <i>R</i> <sub>(int)</sub> = 0.0310]
Completeness to theta = 27.16°	99.9%	99.6%		99.8%
Max. and min. Transmission	0.6240 and 0.2366	0.3026 and 0.2100		0.2805 and 0.2395
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data/restrains/parameters	5729/0/334	7899/0/426		8384/0/335
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.083	1.047		0.968
Final R índices [I>2σ(I)]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0302; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0797	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0161; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0380	<i>R</i> <sub>1</sub> = ; <i>wR</i> <sub>2</sub> =	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0233; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0588
R índices (all data)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0329; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0808	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0222; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0406	<i>R</i> <sub>1</sub> = ; <i>wR</i> <sub>2</sub> =	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0349; <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0653
Largest diff. Peak and hole	0.904 and -0.371 e.Å <sup>-3</sup>	0.876 and -0.617 e.Å <sup>-3</sup>	e.Å <sup>-3</sup>	0.816 and -1.173 e.Å <sup>-3</sup>

Tabela 2 - Comprimentos de ligações (Å) e ângulos de ligações (°) selecionados para os complexos de ouro (I) 1, 2, 3 e 4. Desvio padrão entre parênteses.

Ligações selecionadas	1	2	3	4
Au–N <sub>Triazeno</sub>	2.064(5)	2.0814(14)	2.092(0)	2.099(2)
Au–P	2.2341(15)	2.2345(4)	2.2411(0)	2.2413(7)
N11–N12	1.331(7)	1.2817(19)	1.2809(0)	1.327(3)
N12–N13	1.282(7)	1.3285(19)	1.3261(0)	1.278(3)
C11–N11	1.398(7)	1.409(2)	1.4102(0)	1.409(3)
C21–N13	1.415(8)	1.409(2)	1.4105(0)	1.409(4)
C12–X1	1.331(7)	1.7377(19)	1.9014(0)	2.101(3)
C22–X2	1.361(6)	1.7472(18)	1.9058(0)	2.095(3)
P–C31	1.812(6)	1.8184(17)	1.8241(0)	1.804(3)
P–C41	1.813(6)	1.8197(17)	1.8246(0)	1.825(3)
P–C51	1.808(6)	1.8110(17)	1.8171(0)	1.826(3)
N <sub>Triazeno</sub> –Au–P	177.68(14)	176.19(4)	175.864(1)	174.07(7)
N11–N12–N13	113.6(5)	112.79(14)	112.514(1)	112.9(2)

X = F para 1, Cl para 2, Br para 3 e I para 4.

Tabela 3 - Ligações de hidrogênio não-clássicas para os complexos de Au(I)

D–H...A	D–H (Å)	H...A (Å)	∠ D–H...A (°)	Operadores de Simetria
<b>Complexo 1</b>				
C35–H35...N13	0.950 ( )	2.566 (0)	129.43 (1)	-x, -1/2+y, 1/2-z
C52–H52...F1	0.950 ( )	2.626 (0)	117.92 (1)	1-x, 1/2+y, 1.5-z
C35–H35...F2	0.950 ( )	2.649 (0)	160.28 (1)	1-x, 1/2+y, 1.5-z
C44–H44...F2	0.950 ( )	2.536 ( )	162.93 (1)	-1+x, y, z
<b>Complexo 2</b>				
C34–H34...N11	0.926 (0)	2.576 (0)	142.24 (1)	x, -1+y, z
C53–H53...N12	0.949 (0)	2.632 (0)	164.57 (1)	-1/2+x, 1/2-y, -1/2+z
C42–H42...Cl2	0.893 (0)	2.924 (0)	133.15 (1)	2-x, -y, -z
C45–H45...C32	0.953	2.830	140.15	1.5-x, 1/2+y, -1/2-z
C46–H46...C43	0.906	2.766	156.26	1.5-x, 1/2+y, -1/2-z
<b>Complexo 3</b>				
C15–H15...N11	0.930 ( )	2.653 (0)	139.63 (1)	1/2-x, -1/2+y, 1/2-z
C44–H44...N11	0.930 ( )	2.679 (0)	147.21 (1)	x, -1+y, z
C36–H36...C33	0,930 ( )	2,820 (0)	151.59 (1)	1/2-x,, -1/2+y, 1.5-z
<b>Complexo 4</b>				
C25–H25...N13	0.930 ( )	2.641 (0)	148.36 (1)	1/2-x, 1/2+y, 1.5-z
C44–H44...N13	0.930 ( )	2.729 (0)	152.18 (1)	x, -1+y, z
C56–H56...C53	0.930 ( )	2.853 (0)	151.20 (1)	1/2-x, -1/2+y, 1/2-z



Tabela 4 - Interações halogênio...halogênio para os complexos triazenos **2**, **3** e **4**.

Interação	Distância (Å)	Códigos de simetria
Cl...Cl'	3.3715(1)	2-x, -y, -z
Br...Br'	3.3781(0)	-x, 1-y, 1-z
I...I'	3.5893(0)	1-x, -y, 1-z

Tabela 5 - Desvio médio quadrático da planaridade, r.m.s (Å) e ângulo interplanar (°) dos complexos (3), (4), (5) e (6). Desvio padrão entre parêntesis.

Fragmento	r.m.s (Å)	Ângulo Interplanar (°)
Complexo (3)		
C11-C16/C21-C26	0.0107/0.0078	35.08 (0.29)
C11-C16/N11-N12-N13	0.0107/0.0000	25.08 (0.66)
C21-C26/ N11-N12-N13	0.0078/0.0000	10.42 (0.71)
Complexo (4)		
C11-C16/C21-C26	0.0016/0.0055	28.14 (0.08)
C11-C16/N11-N12-N13	0.0016/0.0000	7.84 (0.20)
C21-C26/ N11-N12-N13	0.0055/0.0000	28.74 (0.17)
Complexo (5)		
C11-C16/C21-C26	0.0029/0.0061	26.15 (0.15)
C11-C16/N11-N12-N13	0.0029/0.0000	11.09 (0.32)
C21-C26/ N11-N12-N13	0.0061/0.0000	28.34 (0.28)
Complexo (6)		
C11-C16/C21-C26	0.0049/0.0028	23.34 (0.17)
C11-C16/N11-N12-N13	0.0019/0.0000	22.62 (0.32)
C21-C26/ N11-N12-N13	0.0028/0.0000	17.10 (0.32)

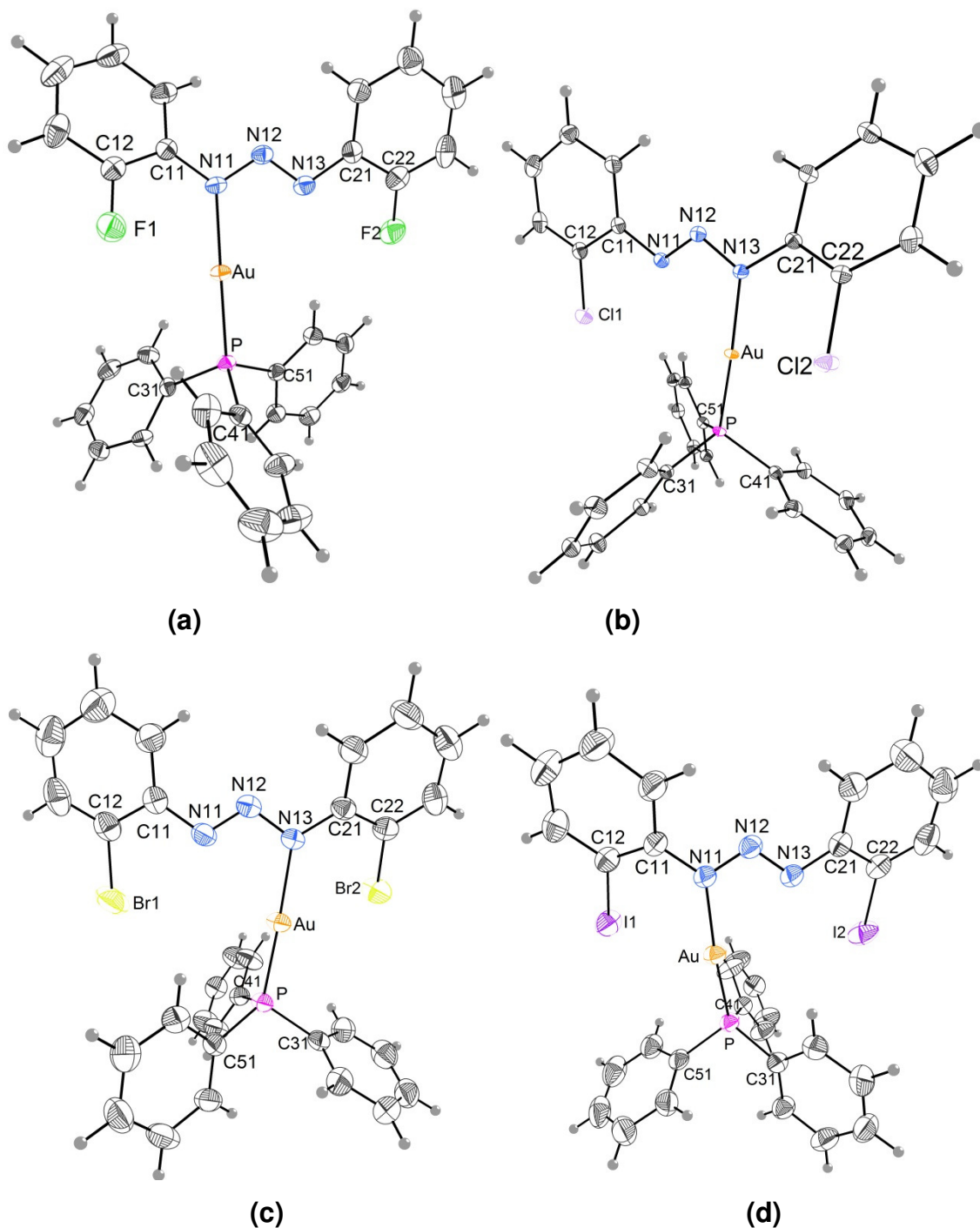


Figure 1 - Molecular structure of (a) 1,3-bis(2-fluorophenyl)triazenide- $\kappa$ N-triphenylphosphine-  $\kappa$ P-gold (I) **1**; (b) 1,3-bis(2-chlorophenyl)triazenide- $\kappa$ N-triphenylphosphine-  $\kappa$ P-gold (I) **2**; (c) 1,3-bis(2-bromophenyl)triazenide- $\kappa$ N-triphenylphosphine-  $\kappa$ P-gold (I) **3**; (d) 1,3-bis(2-iodophenyl)triazenide- $\kappa$ N-triphenylphosphine-  $\kappa$ P-gold (I) **4**.

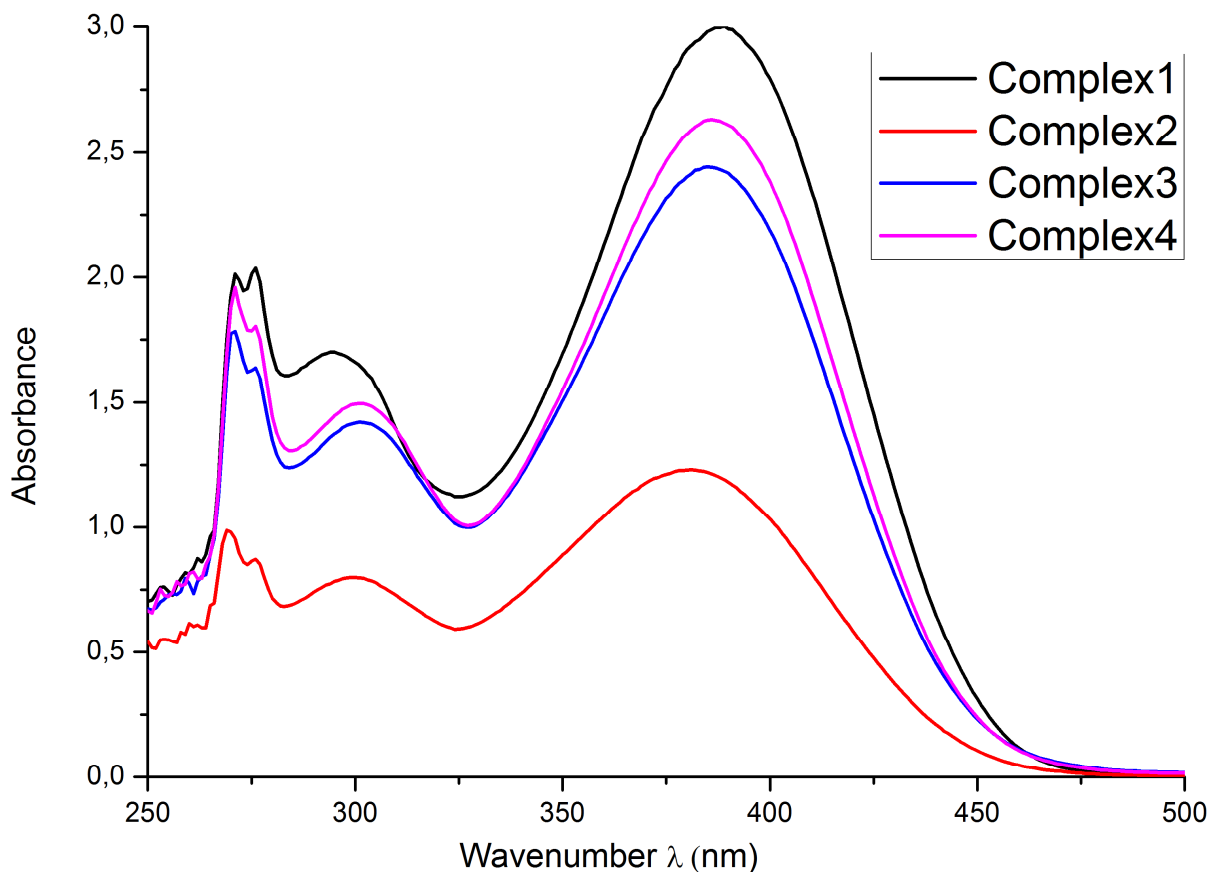


Figura 12 - Espectro dos compostos **1**, **2**, **3** e **4** na região do UV-Vis (250-500 nm) em DMSO na concentração igual a 166.666  $\mu$ M.

#### 4.5. Farmacologia

##### 4.5.1. Citotoxicidade pelo método da redução do (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazolio]- MTT:

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados a partir de amostras de medula óssea obtidas de pacientes do setor de Hematologia-Oncologia do HUSM. O excedente da rotina, que seria descartado, foi separado e encaminhado ao nosso laboratório para as análises. No momento da coleta da medula óssea os pacientes não estavam sob uso de medicamentos oncológicos e o diagnóstico de leucemia foi posteriormente confirmado com as análises citogenética, de imunofenotipagem e biologia molecular.

As amostras foram cultivadas em meio RPMI 1640 com soro bovino fetal em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C por 20-24 horas. Após este período foram retirados 50µL da cultura e misturados com o corante azul de tripan. O corante azul de tripan tem a capacidade de atravessar as membranas nas células normais e ser expulso para o meio extracelular em seguida. Já nas células em processo de morte celular programada não há a capacidade de expulsar o corante para o meio extracelular, o que mantém a cor azul. Logo, as células que ficaram azuis após a incubação com os compostos em estudo, foram consideradas inviáveis (GAIL; LOIS; ANNA, 2000). Então, foi realizada a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com aumento de 400X. A concentração de células foi ajustada para 3x10<sup>8</sup> células/mL.

A citotoxicidade dos compostos foi testada em diferentes tipos de células de leucemia usando o ensaio de redução do MTT (MOSMANN, 1983). As concentrações usadas dos compostos foram 100µM, 50µM and 12,5µM. Para realização do ensaio colorimétrico, foram utilizadas placas de 96 poços. Em cada poço foi utilizada a concentração de 3x10<sup>8</sup> células/poço, que foram incubadas com os trizenos por 20 horas a 37° C. Passadas as 20 horas, foram acrescentados aos poços 10µL da solução de MTT (5 mg/mL) e então as placas foram incubadas novamente por mais um período de 4 horas. Após o período total de incubação (24 horas), foram adicionados 100µ de solução de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica de cada poço foi obtida a 570 nm, em leitor de microplacas ELISA, possibilitando determinação do potencial citotóxico de cada substância testada em relação ao controle não tratado. Os ensaios foram realizados em triplicata e também foram utilizados controles negativos, ou seja sem o composto.

Para determinar a IC<sub>50</sub>, os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de morte celular. Os dados foram então inseridos no programa GraphPad Prism 5.0 para análise dos resultados. A IC<sub>50</sub> mostra a concentração da substância necessária para produzir 50% de redução de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

4.5.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM):

A atividade antibacteriana foi realizada em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Foram utilizadas 11 cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC):

*Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 29213, *Escherichia coli* 35218, *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Enterococcus faecalis* 29212; além de 12 isolados clínicos multiresistentes: *Staphylococcus aureus* (3 diferentes cepas), *Staphylococcus epidermidis* (2 diferentes cepas), *Pseudomonas aeruginosa* (2 diferentes cepas), *Acinetobacter* sp. (2 diferentes cepas), *Klebsiella pneumoniae* (2 diferentes cepas), *Escherichia coli* (1 cepa). Os isolados clínicos foram provenientes do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, e identificados pelo sistema automatizado SIEMENS MicroScan<sup>®</sup> como multiresistentes (ANVISA, 2010). O método usado para este ensaio foi a concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica da microdiluição em caldo Mueller-Hinton, seguindo o documento do *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2012. A CIM é determinada pela menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo após 24 horas de incubação.

Os inóculos contendo as bactérias foram preparados por meio da diluição das bactérias com solução salina estéril até chegar na densidade de 0.5 na escala de McFarland, fazendo a leitura em 625 nm em espectrofotômetro. Então 100µL do inóculo foram pipetados em uma placa de 96 poços que já continha caldo Mueller Hinton e o composto diluído que após as sucessivas diluições ficou em diferentes concentrações (de 0,25 até 128µL). Os compostos foram diluídos em etanol/água (1:1). As placas foram então incubadas por 24 horas em estufa de 35 ± 2° C. Os ensaios foram realizados em triplicata (CLSI, 2012).

## 5. Literatura Citada- Referências Bibliográficas

ADHIKARI, R. P. et al. Novel Structurally Designed Vaccine for *S. aureus*  $\alpha$ - Hemolysin: Protection against Bacteremia and Pneumonia. **PLoS ONE**. v. 7, n. 6, p. e38567, 2012.

ANVISA - Nota Técnica nº 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília, DF, 2010.

ALLEN, F. H.; KENNARD, O.; WATSON, D. G.; BRAMMER, L.; ORPEN, A. G.; TAYLOR, R.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1987**, 2, S1; Cambridge Structure Database.

ARNESANO, F.; NATILE, G. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, p. 2070–2081, 2009.

BAUDEL, J. et al. Does nonadherence to local recommendations for empirical antibiotic therapy on admission to the intensive care unit have an impact on inhospital mortality? **Ther Clin Risk Manag.** v. 5 (2009) 491-498.

BERNERS-PRICE, S. J. et al. Antimicrobial and Anticancer Activity of Tetrahedral, Chelated, Diphosphine Silver(I) Complexes: Comparison with Copper and Gold. *J. Inorg. Biochem.* v. 33, p. 285–295, 1988.

BLOTNY, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. **Tetrahedron.** v. 62, n. 41, p. 9507-9522, 2006.

BOUCHER, H. W.; SAKOULAS, G. Perspectives on Daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.** v. 45, p. 601-608, 2007.

BOULIKAS, T. et al. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy.** v. 5, p. 537-583, 2007.

BURLA, M. C. et al. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement, *J. Appl. Cryst.* 38 (2005) 381–388.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrob Agents Ch.** p. 969-976, 2010.

BRANDENBURG, K.; DIAMOND 3.1a. 1997 - 2005, Version 1.1a. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.

BRUIJNINCX, P. C. A. & SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity, **Curr. Opin. Chem. Biol.** v.12, p. 197-206, 2008.

CAPORASO, P. et al. Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. **DNA Repair.** n. 6, p. 1179-1186, 2007.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica;** Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.

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.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem celular**, 2 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre-S, cap.15, p.: 633-674, 2001.

DOMINGUES, V. O. et al. *In Vitro* Evaluation of Triazines: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, n. 12, p. 2226-2237, 2010.

FARRUGIA, L.J.; **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, 1999.

GADJEVA, V. Structure-based design of nitrosoureas containing tyrosine derivatives as potential antimelanoma agents. **Eur. J. Med. Chem.** v. 37, p. 295–300, 2002.

GAIL, M. S.; LOIS, C.; ANNA. P. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. **Mol Vis.** v. 6, p. 157-163, 2000.

GANDIN, V. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochemical Pharmacology.* v. 79, p. 90-101, 2010.

GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents the use of metals in medicine.* The Atrium, Southern Gate, Chichester, England John Wiley & Sons Ltd, 2005. 644 p.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2007.

GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D. N. Synthesis and Antimicrobial Activities of some Hydroxytriazines : A New Class of Biologically Active Compounds. **Analytical Sciences.** v. 17, p. 789-791, 2001.

GOTTLIEB, T.; NIMMO, G. R. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at the Antimicrobial Resistance Summit 2011. **Conference Report.** v. 194, n. 6, 2011.

HAMBLEY, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Dalton Trans.** v. 43, 4929-4937, 2007.

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

HÖRNER, M. et al. 3-(4-Acetylphenyl)-1-(4-nitrophenyl)-triazene. **Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.** v. C60, p. 303-304, 2004.

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

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KELLAND, L. R. Preclinical Perspectives on Platinum Resistance. **Drugs.** v. 59, p. 1-8, 2000.

KIMBALL, D. B.; HALEY, M. M. Triazenes: a versatile tool in organic synthesis, **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 41, p. 3338-3351, 2002.

KOUROUSSIS, C. et al. Continuous Administration of Daily Low-Dose Temozolomide in Pretreated Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase II Study. **Oncology.** v. 76, p. 112-117, 2009.

LUNA, C. M. et al. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Braz J Infect Dis.** v. 14, n. 2, p. 121-129, 2010.

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

METRANGOLO, P.; RESNATI, G.; **Chem Eur. J.** v. 7, p. 2511, 2001.

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

NISHIGAKI, S. et al. Synthetic Antibacterials. I. Nitrofurylvinyl-s-triazine Derivatives. **J. Am. Chem. Soc.** v. 12, p. 39-42, 1969.



NOMIYA, K. et al. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activities of two isomeric gold(I) complexes with nitrogen-containing heterocycle and triphenylphosphine ligands, [Au(L)(PPh<sub>3</sub>)] (HL:spyrazole and imidazole) **J. Inorg. Biochem.** v. 78, p. 363–370, 2000.

NOMIYA, K. et al. Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold(I) complexes with AuSP and AuNP cores showing selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of [Au(2-Hmpa)(PPh<sub>3</sub>)] and 3 [Au(6-Hmna)(PPh<sub>3</sub>)] (2-Hmpa: 2-mercaptopropionic acid, 3 2 6-Hmna: 6-mercaptonicotinic acid) **J. Inorg. Biochem.** v. 95, p. 208–220, 2003.

PARAGINSKI, G. L. **Triazenos: clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia Salina* leach.** 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SANADA, M. et al. Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of *Mgmt* and *Mlh1* mutations. **DNA Repair.** v. 3, p. 413-420, 2004.

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

SEITER, K. et al. Phase I study of temozolamide in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Clinical Oncology.** v. 20, n. 15, p. 3249-3253, 2002.

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

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

SHELDRICK, G.M.; SHELXL-97, **Program for Crystal Structure Refinement**, University of Göttingen, Germany, 1997.

SMITH, R. H. J.; SCUDIERO, D. A.; MICHEJDA, C. J. 1,3-dialkyl-3-acyltriazenes, a novel class of antineoplastic alkylating agents. **J Med Chem.** v. 33, p. 2579-2583, 2001..

SRINIVAS, K. et al. Synthesis and antibacterial activity of various substituted s-triazines. **Eur. J. Med. Chem.** v. 41, p. 1240-1246, 2006.

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

WALSH, R. B.; PADGETT, C. W.; METRANGOLO, P.; RESNATI, G.; HANKS, T. W.; PENNINGTON, W. T.; *Cryst. Growth Des.*, 2, 165, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 4 out. 2012.

YOSHIKAWA, R. et al. Dual Antitumor Effects of 5-Fluorouracil on the Cell Cycle in Colorectal Carcinoma Cells: A Novel Target Mechanism Concept for Pharmacokinetic Modulating Chemotherapy. **Cancer Res.** v. 61, p. 1029-1037, 2001.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 7, p. 481-489, 2003.

ZHOU, Y. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors; 3,5-Diamino-piperidinyl triazines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, p. 5451-5456, 2006.

## INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para os triazenos 1, 2, 3 e 4.

Bacterial strain	Composto 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	=16	=64	=64	= 128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	= 64	> 128	= 128	> 128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	= 128	> 128	> 128	> 128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51288	= 128	> 128	> 128	> 128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	= 128	> 128	> 128	= 128
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	=32	=32	=64	=64
<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 14028	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 1	= 32	=128	> 128	= 128
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 2	= 64	= 128	> 128	= 128
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 3	= 64	= 128	= 128	= 128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 4	= 64	= 128	= 128	= 128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 5	= 64	= 128	> 128	= 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n° 6	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n° 7	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Acinetobacter</i> sp n° 8	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Acinetobacter</i> sp n° 9	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n° 10	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n° 11	> 128	> 128	> 128	> 128
<i>Escherichia coli</i> n° 12	> 128	> 128	> 128	> 128

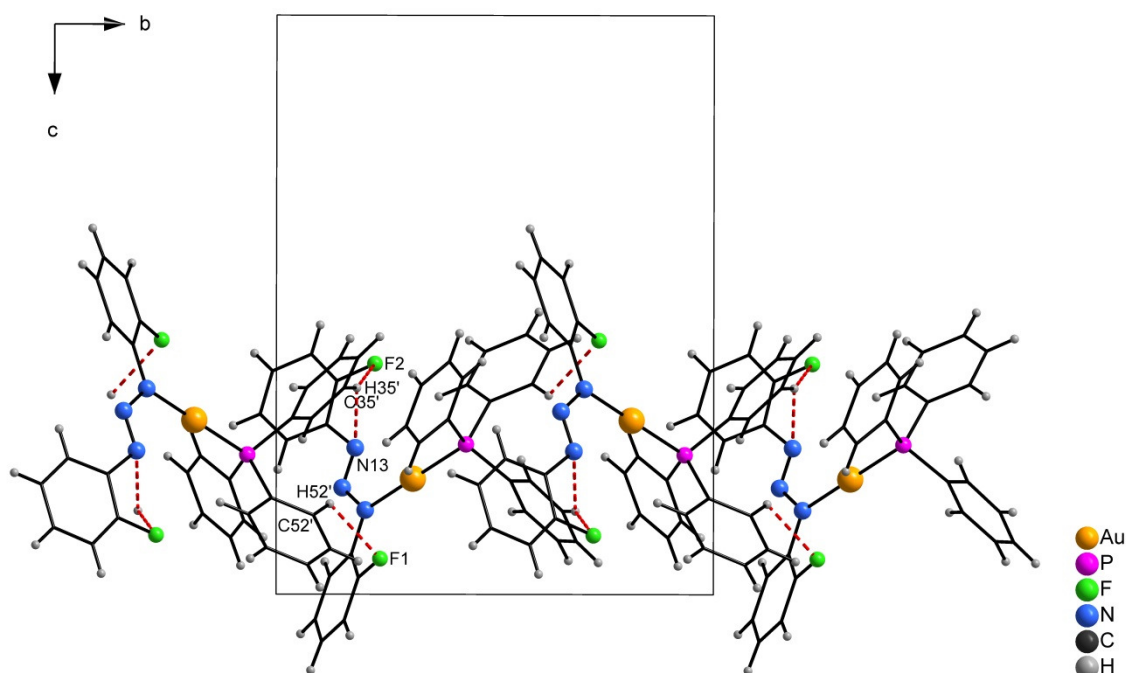


Figura 2 - Arranjo supramolecular 1-D de **1** visualizado no plano *bc*. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [0 1 0] *via* ligações de hidrogênio não-clássicas C35'–H35'...N13, C52'–H52'...F1 e C35'–H35'...F2. Códigos de simetria: ('):  $1-x, -0.5+y, 1.5-z$

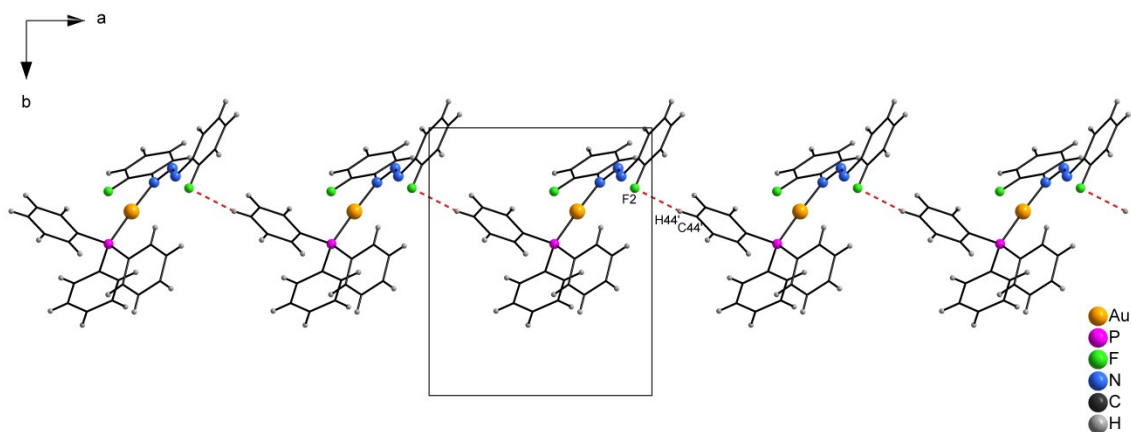


Figura 3 - Arranjo supramolecular 1-D de **1** visualizado no plano *ab*. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [1 0 0] *via* ligações de hidrogênio não-clássicas C44'–H44'...F2. Códigos de simetria: ('):  $1+x, y, z$

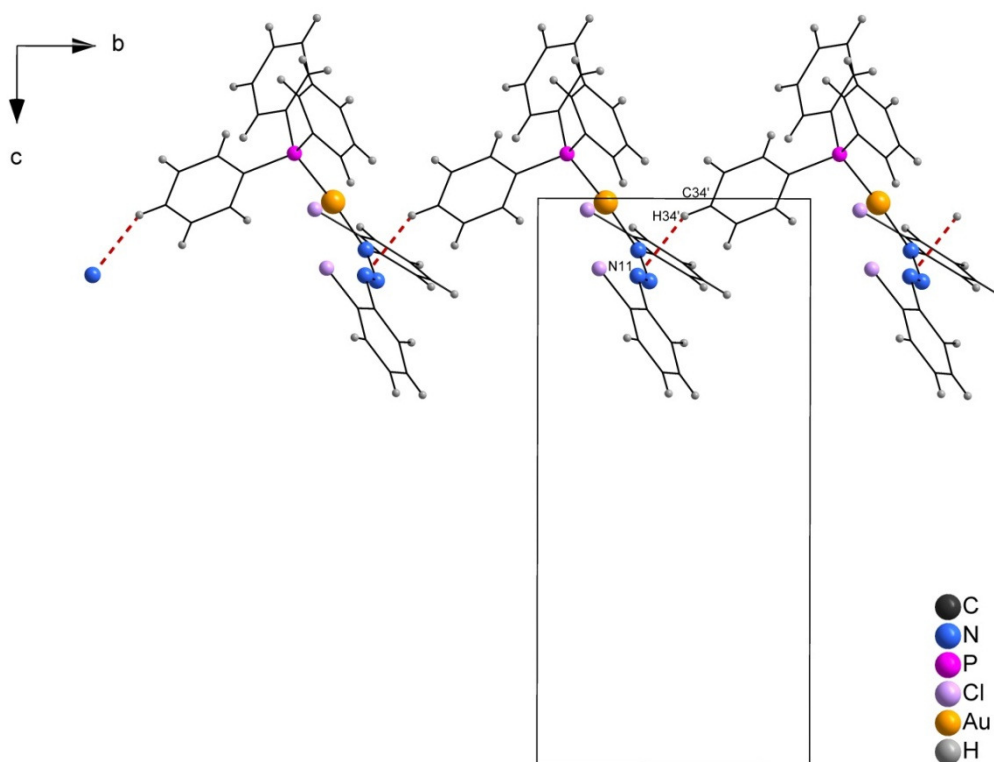


Figura 4 - Arranjo supramolecular 1-D de **2** com visualização no plano *bc*. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [0 1 0] via ligações de hidrogênio não-clássicas C34'–H34'...N11. Códigos de simetria: ('):  $x, 1+y, z$ .

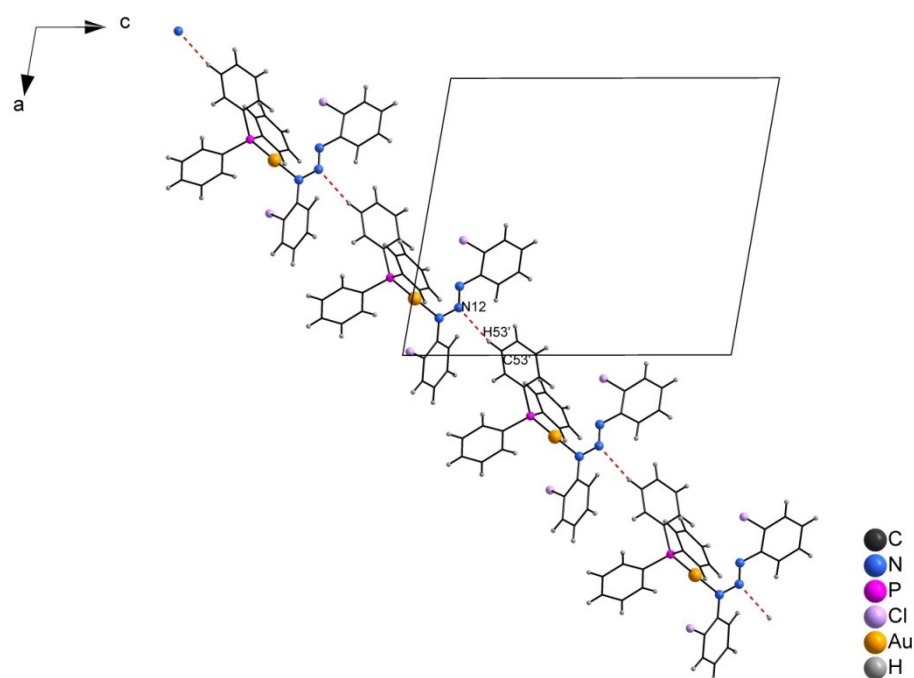


Figura 5 - Arranjo supramolecular 1-D de **2** com visualização no plano *ac*. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [1 0 1] via ligações de hidrogênio não-clássicas C53'–H53'...N12. Códigos de simetria: ('):  $0.5+x, 0.5-y, 0.5+z$ .

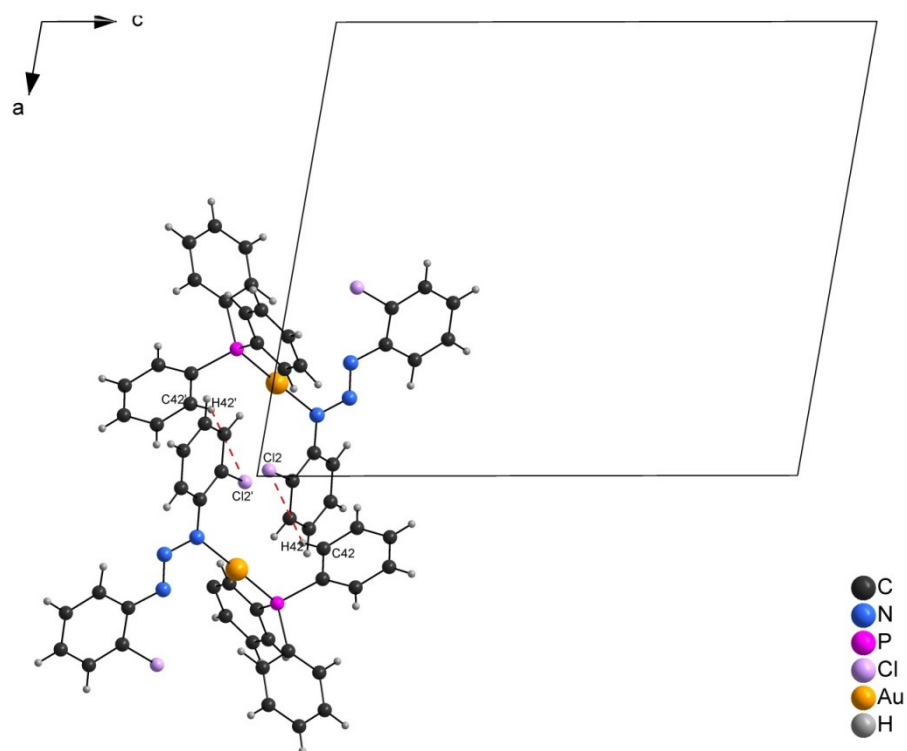


Figura 6 - Projeção no eixo cristalográfico  $b$  dos dímeros centrossimétricos de **2** formados *via* ligações de hidrogênio não-clássicas C42'–H42'...Cl2, por um centro de inversão localizado em [1 0 0]. Códigos de simetria: ('):2- $x$ , - $y$ , - $z$ .

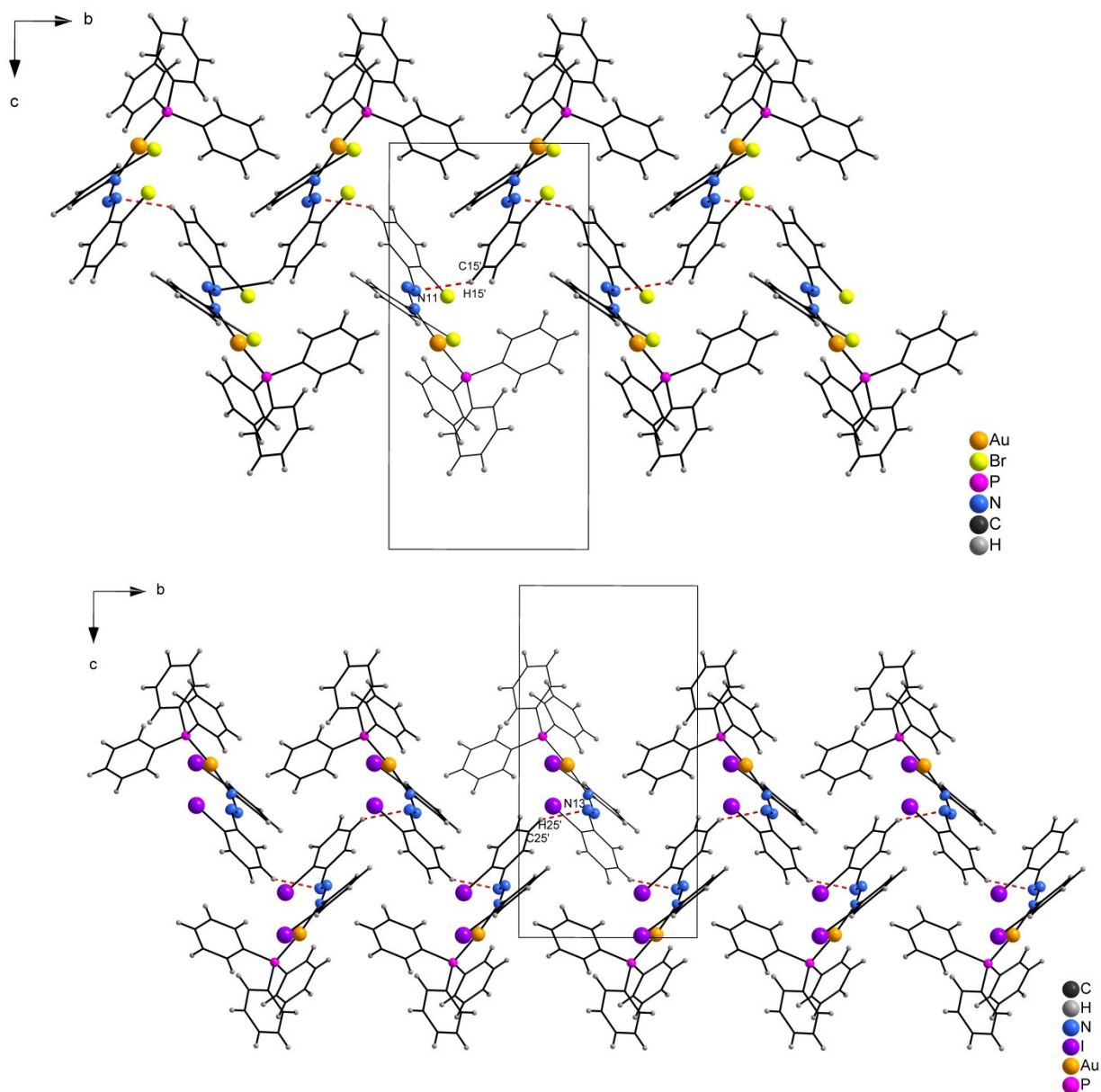


Figura 7 - Arranjo supramolecular 1-D de **3** e **4** com visualização no plano bc. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [0 1 0] via ligações de hidrogênio não-clássicas C15'–H15'...N12 e C25'–H25'...N13, respectivamente. Códigos de simetria: (') : 0.5-x, 0.5+y, 0.5-z para **3** e 0.5-x, -0.5+y, 1.5-z para **4**.

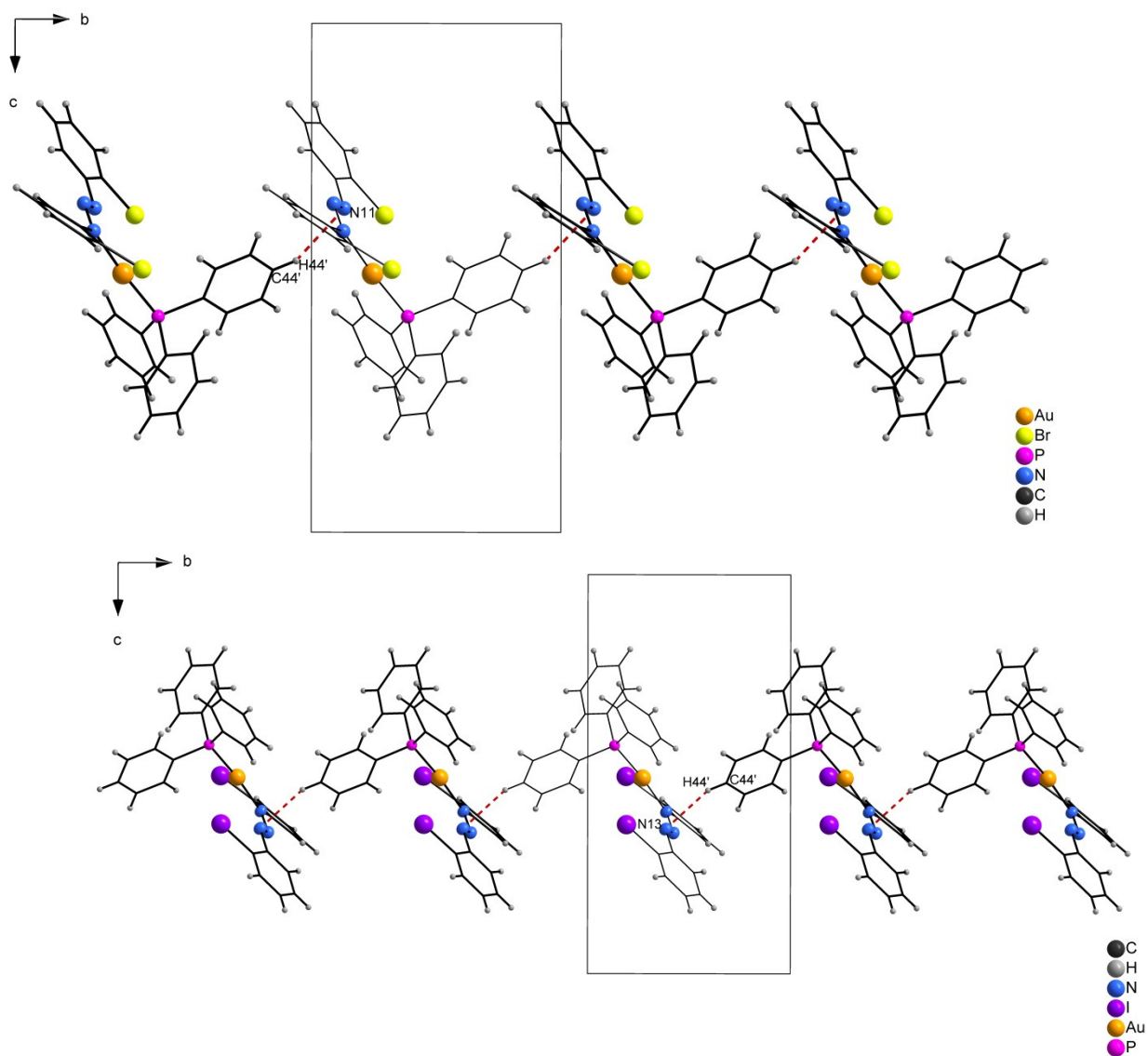


Figura 8 - Arranjo supramolecular 1-D de **3** e **4** com visualização no plano *bc*. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico  $[0\ 1\ 0]$  via ligações de hidrogênio não-clássicas C44'–H44'...N12 para **3** e C44'–H44'...N13 para **4**. Códigos de simetria: ('):  $x, -1+y, z$  (**3**) e  $x, 1+y, z$  (**4**).



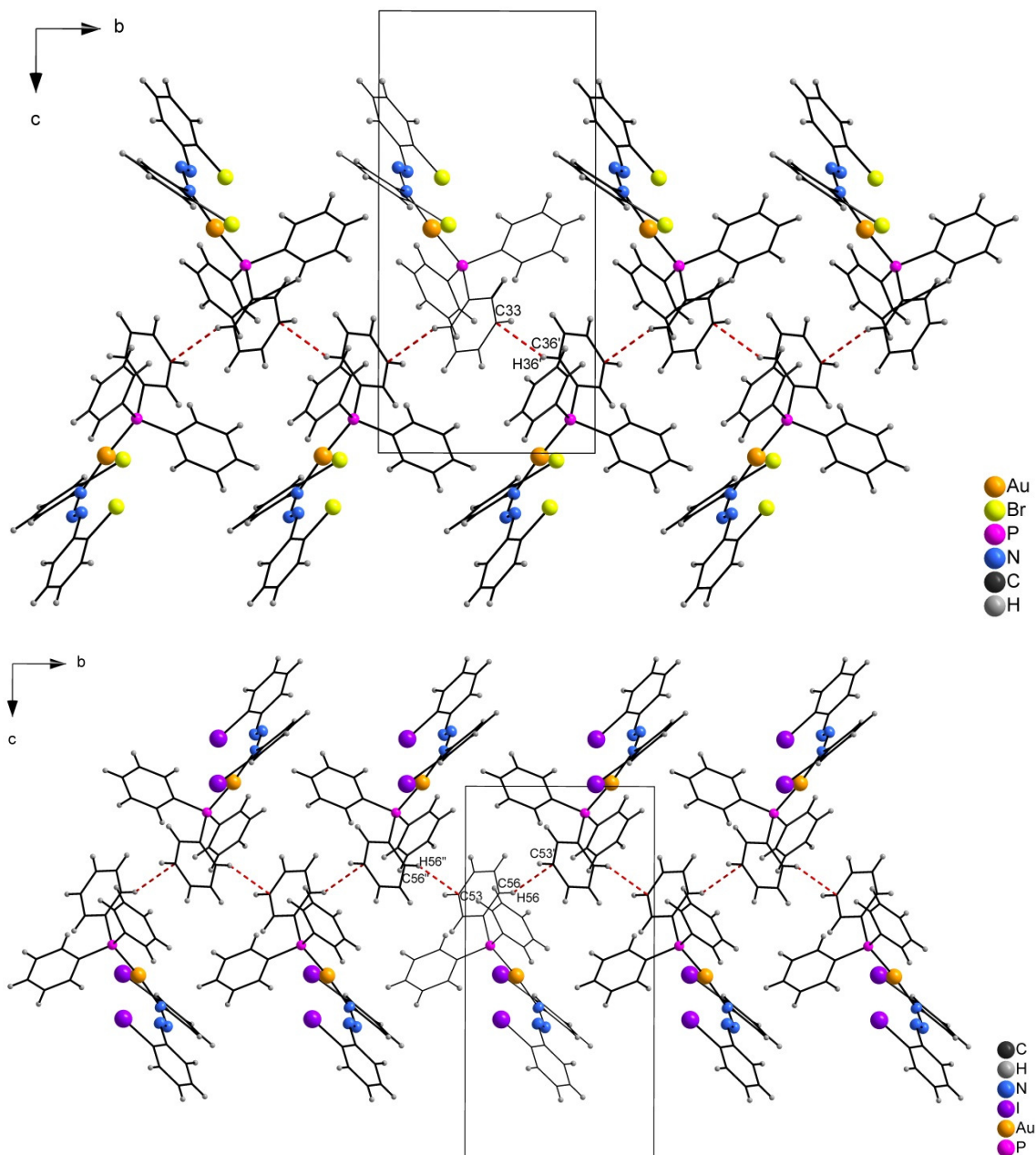
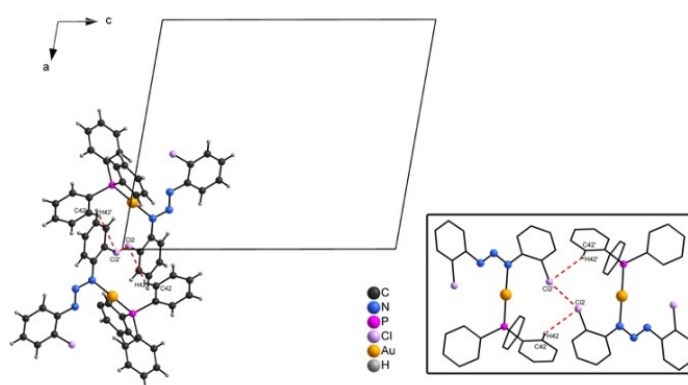
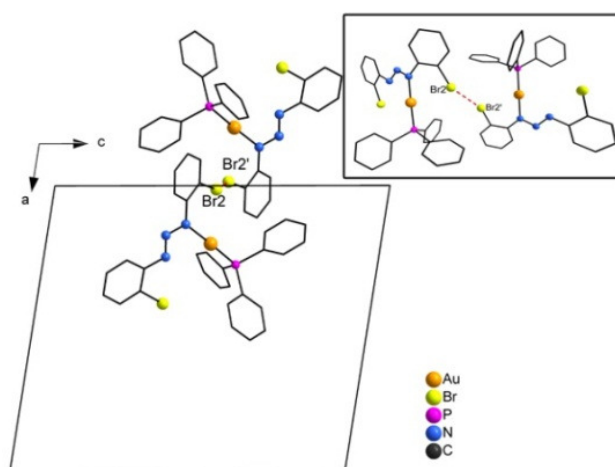


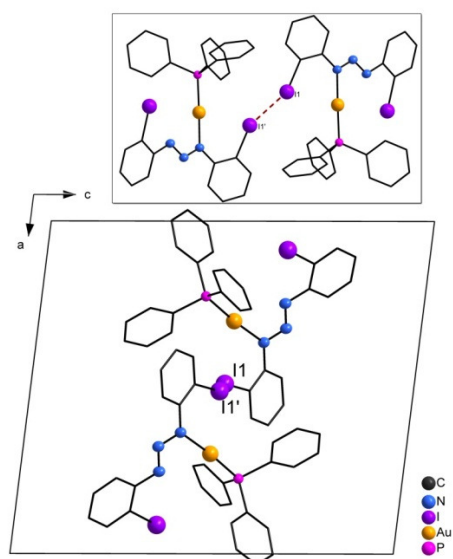
Figura 9- Arranjo supramolecular 1-D de **3** e **4** com visualização no plano bc. Arranjo unidimensional ocorre a longo do eixo cristalográfico [0 1 0] *via* ligações de hidrogênio não-clássicas C36'–H36'...C33 para **3** e C56'–H56'...C53 para **4**. Códigos de simetria: ('): 0.5-x, 0.5+y, 1.5-z (**3**) e ('): 0.5-x, 0.5+y, 0.5-z, ('): 0.5-x, -0.5+y, 0.5-z (**3**).



(a)



(b)



(c)

Figura 10- Projeção no eixo cristalográfico  $b$  dos dímeros centrossimétricos de **2** em (a), **3** em (b) e **4** em (c) formados *via* interações halogênio...halogênio, por um centro de inversão localizado em  $[1\ 0\ 0]$  (**2**),  $[0\ \frac{1}{2}\ \frac{1}{2}]$  (**3**) e em  $[\frac{1}{2}\ 0\ \frac{1}{2}]$  (**4**). Códigos de simetria: ( $\bar{\cdot}$ ):  $2-x, -y, -z$  para (**2**);  $-x, 1-y, 1-z$  para (**3**);  $1-x, -y, 1-z$  para (**4**).

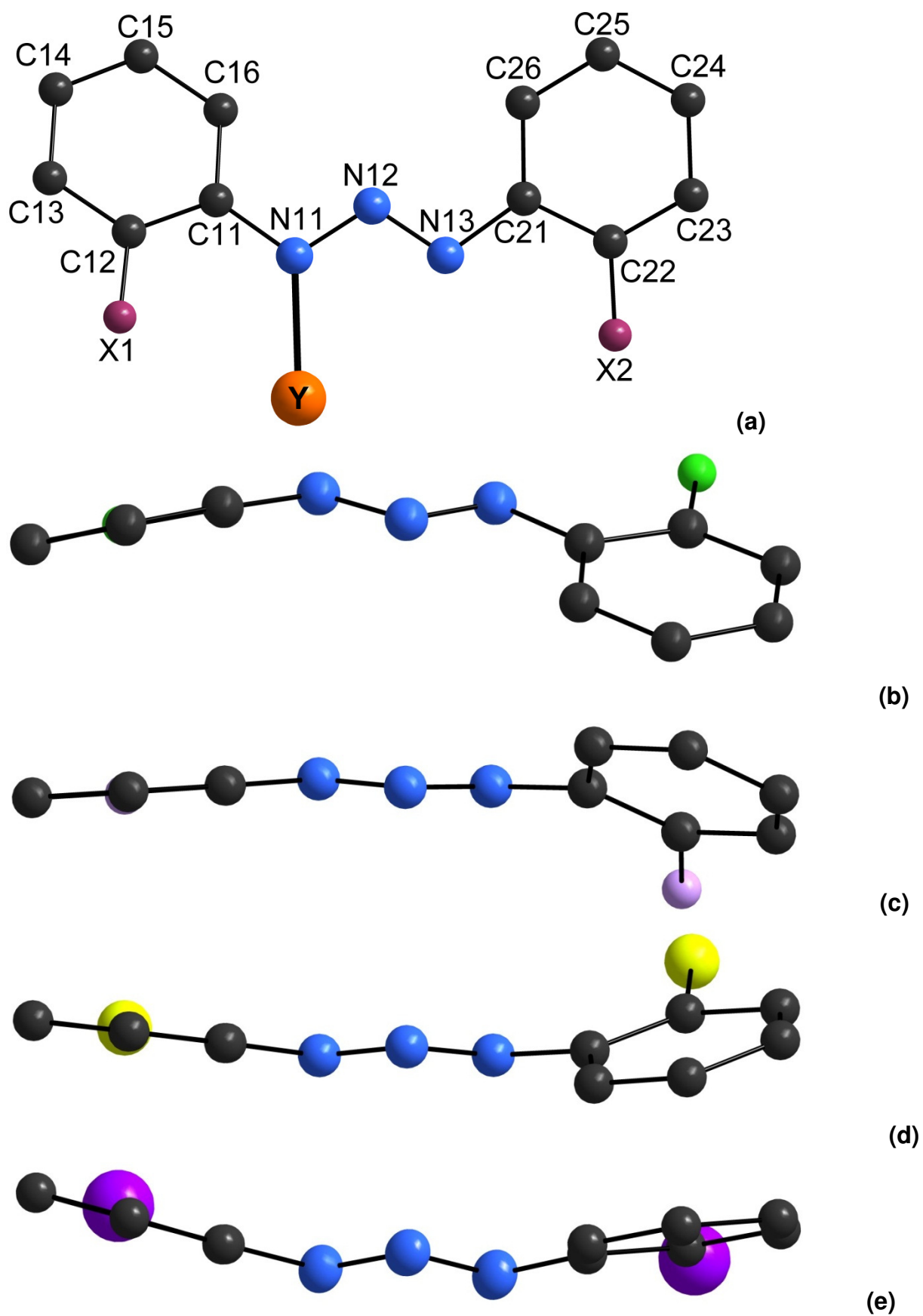


Figura 11 - Projeção dos íons triazenídicos (a) Átomos genéricos indicando X1 e X2 = F, Cl, Br e I, e Y = AuP(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>; (a) [FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F]<sup>-</sup>, (b) [ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl]<sup>-</sup>, (c) [BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Br]<sup>-</sup> e (d) [IC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>I]<sup>-</sup> indicando o desvio da planaridade.

#### 4 REFERÊNCIAS

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

ADHIKARI, R. P. et al. Novel Structurally Designed Vaccine for *S. aureus*  $\alpha$ - Hemolysin: Protection against Bacteremia and Pneumonia. **PLoS ONE**. v. 7, n. 6, p. e38567, 2012.

AN, Y. et al. Cleavage of double-strand DNA by linear and triangular trinuclear copper complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 100, p. 1586–1593, 2006.

ARNESANO, F.; NATILE, G. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, p. 2070–2081, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **O que você deve saber sobre Leucemia Mielóide Crônica**. São Paulo, [2012?].

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**. v. 357, p. 539–545, 2001.

BARNARD, P. J.; BERNERS-PRICE, S. J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. **Coord. Chem. Rev.** v. 251, p. 1889, 2007.

BARKER, J. J. Antibacterial drug discovery and structure based design. **Drug Discovery Today**. v. 11, p. 391-404, 2006.

BARTSCH, H.; MONTESANO, R. Relevance of nitrosamines to human cancer. **Carcinogenesis**. v. 5, p. 1381–1393, 1984.

BASHKIN, J. K. Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 3, p. 752–758, 1999.

BELLADONNA, M. L. et al. A retroviral peptide encoded by mutated env p15E gene is recognized by specific CD8+ T lymphocytes on drug-treated murine mastocytoma P815. **Int J Immunopharmacol**. v.18, p. 563–76, 1996.

BELLON, P. L.; MANASSERO M.; SANSONI, M. Two-coordination in gold(I) species: the crystal and molecular structure of cyanotriphenylphosphinegold. **Ricerca Scientifica**. v. 39, p. 173–175, 1969.

BÉNARD, J.; RIOU, G. F. In vivo effects of intercalating and non intercalating drugs on the tertiary structure of kinetoplast deoxyribonucleic acid. **Biochem**. v. 19, p. 4197-41201, 1980.

BERGLOF, F. E.; BERGLOF, K.; WALZ, D. T. Auranofin: an oral chrysotherapeutic agent for the treatment of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol**. v. 5, p. 68- 74, 1978.

BERNERS-PRICE, S. J. et al. Antimicrobial and Anticancer Activity of Tetrahedral, Chelated, Diphosphine Silver(I) Complexes: Comparison with Copper and Gold. **J. Inorg. Biochem**. v. 33, p. 285–295, 1988.

BERNERS-PRICE, S. J.; FILIPOVSKA, A. The Design of Gold-Based, Mitochondria Targeted Chemotherapeutics. **Australian Journal of Chemistry**. v. 61, n. 9, p. 661–668, 2008.

BHABAK, K. P.; BHUYAN, B. J.; MUGESH, G. Bioinorganic and medicinal chemistry: aspects of gold(I)-protein complexes. **Dalton Trans**. v. 40, p. 2099, 2011.

BLACKBURN, G. M.; GAIT, M. J. **Nucleic acids in Chemistry and Biology**. 2a ed. New York: Oxford University Press, 1997. 528 p.

BLOTNY, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. **Tetrahedron**. v. 62, n. 41, p. 9507-9522, 2006.

BOBOLA, M. S. et al. Role of O6- methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. **Clin Cancer Res**. n. 2, p. 735-741, 1996.

BOBOLA, M. S.; BLANK, A.; BERGERD, M. S.; SILBER, J. R. O6-methylguanine-DNA methyltransferase deficiency in developing brain: Implications for brain tumorigenesis. **DNA Repair**. v. 6, p. 1127–1133, 2007.

BONMASSAR, E. et al. Immunological alteration of leukemic cells in vivo after treatment with an antitumor drug. **Proc Natl Acad Sci USA**. V. 66, p. 1089–1095, 1970.

BONMASSAR, E. et al. Antigenic changes of L1210 leukemia in mice treated with 5-(3,3-dimethyl-1- triazeno)imidazole-4-carboxamide. **Cancer Res**. v. 32, p. 1446–1450, 1972.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat. Med.** v. 3, p. 730–737, 1997.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncology Reports**, v. 10, n. 6, p. 1663–1682, 2003.

BRADA, M. et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. **British Journal of Cancer**. v. 81, n. 6, p. 1022–1030, 1999.

BRONSTEIN, S. M.; SKOPEK, T. R.; SWENBERG, J. A. Efficient repair of *O*6-ethylguanine, but not *O*4-ethylthymine or *O*2 ethylthymine, is dependent upon *O*6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. **Cancer Res.** v. 52, p. 2008–2011, 1992.

BRUIJNINCX, P. C. A. & SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity, **Curr. Opin. Chem. Biol.** v.12, p. 197-206, 2008.

BUGNI, J. M. et al. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. **DNA Repair**. v. 6, p. 1116–1126, 2007.

BURCHENAL, J. H. et al. Chemotherapy of leukemia. VII. Effect of substituted triazenes on transplanted mouse leukemia. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 91, p. 398-401, 1956.

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

CAMPANILE, F. et al. Increased immunogenicity of two lymphoma lines after drug treatment of athymic (nude) mice. **J Natl Cancer Inst.** v. 55, p. 207–9, 1975.

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**. n. 6, p. 1179-1186, 2007.

CARNERO GOMEZ, R. Calidad de vida relacionada com La salud de Temodal® em El tratamiento del glioblastoma multiforme. **Rev Esp Econ Salud**. v. 4, n. 3, p. 154-160, 2005.

CATAPANO, C. V.; BROGGINI, M.; ERBA, E.; PONTI, M.; MARIANTI, L.; CITTI, L.; D'INCALCI, M. *In vitro* and *in vivo* methazolastone-induced DNA damage and repair in

L1210 leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. **Cancer Res.** v. 47, p. 4884, 1987.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.

CHABNER, B.A.; ROBERTS, T.G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat. Rev. Cancer.** v. 5, p. 65-72, 2005.

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

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem celular**, 2 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre-S, cap.15, p.: 633-674, 2001.

DANSON, S. J.; MIDDLETON, M. R. Drug Evaluation Temozolomide: a novel oral alkylating agent. **Expert Review of Anticancer Therapy.** v. 1, n. 1, p. 13-19, June 2001.

D'ATRI, S. et al. Untreated or drug-treated tumor cells are differentially recognized by allogeneic lymphocytes. **Int J Immunopharmacol.** v. 16, p. 569–79, 1994.

D'ATRI, S. et al. Chemosensitivity to triazene compounds and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase levels: Studies with blasts of leukaemic patients. **Oxford Journals, Medicine Annals of Oncology.** v. 6, n. 4, p. 389-393, 1995.

DAYAL, B.; ERTEL, N. H. Studies on *N*-nitroso bile acid amides in relation to their possible role in gastrointestinal cancer. **Lipids.** v. 32, p. 1331–1340, 1997.

DE CLERCQ, E; DANN, O. Diaryl amidine derivatives as oncornaviral DNA polymerase inhibitors. **Journal Medicinal Chemistry,** v. 7, p. 787- 195, 1980.

DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** v. 42, n. 3, p. 317–325, 2002.  
DESOIZE, B. Metals and metal compounds in cancer treatment. **Anticancer Research.** v. 24, n. 3, p. 1529–1544, 2004.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood.** v. 112, p. 4793–4807, 2008.

DOMINGUES, V. O. et al. *In Vitro* Evaluation of Triazenes: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, n. 12, p. 2226-2237, 2010.

DONG, Y. et al. Serine protease inhibition and mitochondrial dysfunction associated with cisplatin resistance in human tumor cell lines: targets for therapy. **Biochem. Pharmacol.** v. 53: p. 1673–1682, 1997.

EISLER, R. Chrysotherapy: a synoptic review. **Inflamm. Res.** v. 52, n. 12, p. 487–501, 2003.

EL GHISSASSI, F. et al. Formation of 1,*N*6-ethenoadenine and 3,*N*4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. **Chem. Res. Toxicol.** v. 8, n. 2, p. 278–283, 1995.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. **Chem. Rev.** v. 99, p. 2777-2795, 1999.

FARBER, S. et al. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. **N Engl J Med.** v. 238, p. 787–793, 1948.

FONTEH, P. N.; KETER, F. K.; MEYER, D. HIV therapeutic possibilities of gold compounds. **BioMetals.** v. 23, n. 2, p.185, 2010.

FRANCHI, A. et al. Cytotoxic effects of dacarbazine in patients with acute myelogenous leukemia: a pilot study. **Haematologica.** v. 77, p. 146–50, 1992.

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

FRICKER, S. P. **Medicinal chemistry of organogold compounds.** New York: John Wiley & Sons Ltd, 1999.

FRIES, J. F.; BLOCH, D.; SPITZ, P.; MITCHELL, D. M. Cancer in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Long-Term Study of Mortality. **Am. J. Med.** v. 78 (Suppl. A), n. 1, p. 56–59, 1985.



GADJEVA, V. Structure-based design of nitrosoureas containing tyrosine derivatives as potential antimelanoma agents. **Eur. J. Med. Chem.** v. 37, p. 295–300, 2002.

GALMARINI, D.; GALMARINI, C. M.; GALMARINI, F. C. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** v. 84, p. 181–199, 2012.

GANDIN, V. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. **Biochemical Pharmacology.** v. 79, p. 90-101, 2010.

GERSON, S. L. MGMT: its role in cancer a etiology and cancer therapeutics. **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, p. 296-307, 2004.

GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents the use of metals in medicine. The Atrium, Southern Gate, Chichester, England John Wiley & Sons Ltd, 2005. 644 p.

GILMAN, A. Therapeutic applications of chemical warfare agents. **Fed Proc.** v. 5, p. 285–292, 1946.

GILMAN, A., PHILIPS, F. S. The Biologic Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. **Science.** v. 103, n. 2675, p. 409, 1946.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 11, p. 1513–1530, 2002.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2007.

GOSWAMI, A. K.; PUROHIT, D. N. Synthesis and Antimicrobial Activities of some Hydroxytriazenes : A New Class of Biologically Active Compounds. **Analytical Sciences.** v. 17, p. 789-791, 2001.

GOTTLIEB, T.; NIMMO, G. R. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at the Antimicrobial Resistance Summit 2011. **Conference Report.** v. 194, n. 6, 2011.

GRIESS, P. On new nitrogenous derivatives of the phenyl-and benzoyl-series. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 9, p. 594-597, 1859.

GROHMANN, U. et al. Multiple point mutations in an endogenous retroviral gene confer high immunogenicity on a drug-treated murine tumor. **J Immunol**. v. 154, p. 4630–4641, 1995.

GUO, Z.; SADLER, P. J. Medicinal inorganic chemistry. **Adv. Inorg. Chem**. v. 49, p. 183-306, 1999.

HAMBLEY, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Dalton Trans**. v. 43, p. 4929-4937, 2007.

HAMED, S. S.; ROTH, C. M. Mathematical modeling to distinguish cell cycle arrest and cell killing in chemotherapeutic concentration response curves. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**. v. 38, p. 385–403, 2011.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr (Rio J)**. n. 84(4 Supl), p. 52-57, 2008.

HEIDELBERGER, C. et al. Fluorinated pyrimidine, a new class of tumor-inhibitory compounds. **Nature**. v. 179, p. 663-666, 1957.

HEIGI, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med**. n. 352, p. 997-1003, 2005.

HICKEY, J. L. et al. Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols **J. Am. Chem. Soc.** v. 130, p. 12570-12571, 2008.

HIGBY, G. J. Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. **Gold Bull**. v. 15, p. 130–140, 1982.

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

HÖRNER, M. et al. 3-(4-Acetylphenyl)-1-(4-nitrophenyl)-triazene. **Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun**. v. C60, p. 303-304, 2004.

HÖRNER, M.; DE OLIVEIRA, G. M.; OLIVEIRA, J. S.; TELES, W. M.; FILGUEIRAS, C. A. L.; BECK, J. J. **Organomet. Chem.** v. 691, p. 251, 2006.

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

HOUCHEMS, D. P. et al. Drug mediated immunogenic changes of virus-induced leukemia in vivo. **Cancer Res.** v. 36, p. 1347–1352, 1976.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2012 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

JAGERSTAD, M.; SKOG, K. Genotoxicity of heat-processed foods. **Mutat. Res.** v. 574, p. 156–172, 2005.

KAINA, B. et al. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair.** v. 6, p. 1079–1099, 2007.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Mechanism of resistance to cisplatin. **Mutat. Res.** v. 478, p. 23–43, 2001.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clinica.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KAYSER, S. et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2,853 adult patients with newly diagnosed AML. **Blood.** v. 117, p. 2137–2145, 2011.

KEAN, W. F. et al. The history of gold therapy in rheumatoid disease. **Semin. Arthritis Rheum.** v. 14, p. 180-186, 1985.

KHAYAT, D. Innovative Therapies: Costs and Context. **Cancer.** v. 118, p. 2367-2371, 2012.

KIMBALL, D. B.; HALEY, M. M. Triazenes: a versatile tool in organic synthesis, **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 41, p. 3338-3351, 2002.

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

KLANBERG, F.; MUETTERTIES, E. L.; GUGGENBERGER, L. J. **Inorg. Chem.** v. 7, n. 11, p. 2272–2278, 1968.

KOCH, R. Uber bakteriologische forschung. Dtsch. Med. Wochenschr. v. 16, p. 756–757, 1890.

KONING, de H. P. Transporters in African trypanosomes: role in drug action and resistance. **Int. J. Parasitol.** v. 31, p. 512-522, 2001.

KOUROUSSIS, C. et al. Continuous Administration of Daily Low-Dose Temozolomide in Pretreated Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase II Study. **Oncology.** v. 76, p. 112-117, 2009.

LACAL, P. M. et al. In vitro inactivation of human O6-alkylguanine DNA alkyltransferase by antitumor triazene compounds. **J Pharmacol Exp Ther.** n. 279, p. 416-422, 1996.

LAWLEY, P. D.; THATCHER, C. J. Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. **Biochem. J.** v. 116, p. 693–707, 1970.

LEONE, G. et al. Therapy related leukemias: susceptibility, prevention and treatment, **Leuk. Lymphoma.** v. 41, p. 255–276, 2001.

LEONE, G. et al. Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. **Chem. Biol. Interact.** v. 184, p. 39–45, 2010.

LICHTMAN, M. A.; LIEVELD, J. L. **Chronic myelogenous leukemia and related disorders.** 6a ed. New York: McGraw-Hill; 2001. 1136 p.

LUNA, C. M. et al. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Braz J Infect Dis.** v. 14, n. 2, p. 121-129, 2010.

LIU, L.; CHATTERJEE, S.; GERSON, S. L. Blockade of base excision repair appears to mediate cytotoxicity to temozolomide in mismatch repair deficient tumor cells. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** v. 38: 288, 1997.

MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**. v. 9, p. 153–66, 2009.

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

MARTIN, G. R.; JAIN, R. K. Noninvasive Measurement of Interstitial pH Profiles in Normal and Neoplastic Tissue Using Fluorescence Ratio Imaging Microscopy. **Cancer Res**. v. 54, p. 5670-5674, 1994.

MARZANO, C. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 42, p. 872–881, 2007.

MARUSYK, A.; POLYAK, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1805, p. 105–117, 2010.

MATTES, W. B.; HARTLEY, J. A.; KOHN, K. W. DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards. **Nucleic Acids Research**. v. 14, n. 7, 1986.

MAYER, R. J. et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. **N. Engl. J. Med**. n. 331, p.896-903, 1994.

MCCONNAUGHIE, A. W.; JENKINS, T. C. Novel acridine-triazene-prototypic combilexins: synthesis, DNA binding, and biological activity. **J. Med. Chem**. v. 38, p. 3488-3501, 1995.

MCKENNA, R. W. Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. **Clinical Chemistry**. v. 46, n. 8(B), p. 1252–1259, 2000.

MERCHANT, B. Gold, the Noble metal and the paradoxes of its toxicology **Biologicals**. v. 26, p. 49–59, 1998.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Rev. Cancer**. v. 6, p. 924–935, 2006.

MIJAL, R. S. et al. The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct *O*6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by *O*6-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. **Chem. Res. Toxicol**. v.17, p. 424–434, 2004.

MIRABELLI, C. K. et al. Correlation of the in Vitro Cytotoxic and in Vivo Antitumor Activities of Gold(1) Coordination Complexes **J. Med. Chem.** v. 29, p. 218–223, 1986.

MISHRA, N. Nucleases: Molecular Biology and Applications. ed., **Wiley Publisher.** p. 344, 2002.

MITRA, S. et al. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal Controlled Release.** v. 74: 317-323, 2001.

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

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

MROZEK, K.; HEEREMA, N. A.; BLOOMFIELD, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Rev.** n. 18, p. 115-36, 2004.

NARDELLI, B. et al. Chemical xenogenization of murine lymphoma cells with triazene derivatives: immunotoxicological studies. **Cancer Immunol Immunother.** v. 17, p. 213–7, 1984.

NEWLANDS, E. S. et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). **Br J Cancer.** v. 65, p. 287–291, 1992.

NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews.** n. 23, p. 35-61, 1997.

NICOLIN, A. et al. Antigenic changes of L5178Y lymphoma after treatment with 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide in vivo. **J Natl Cancer Inst.** v. 56, p. 89–93, 1976.

NISHIGAKI, S. et al. Synthetic Antibacterials. I. Nitrofurylvinyl-s-triazine Derivatives. **J. Am. Chem. Soc.** v. 12, 39-42, 1969.

NOMIYA, K. et al. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activities of two isomeric gold(I) complexes with nitrogen-containing heterocycle and triphenylphosphine ligands, [Au(L)(PPh<sub>3</sub>)] (HLspyrazole and imidazole) **J. Inorg. Biochem.** v. 78, p. 363–370, 2000.

NOMIYA, K. et al. Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold(I) complexes with AuSP and AuNP cores showing selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of [Au(2-Hmpa)(PPh<sub>3</sub>)] and 3 [Au(6-Hmna)(PPh<sub>3</sub>)] (2-Hmpa: 2-mercaptopropionic acid, 3, 2, 6-Hmna: 6-mercaptocotinic acid) **J. Inorg. Biochem.** v. 95, p. 208–220, 2003.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science.** v. 194, p. 23–28, 1976.

PATEL, M. et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of temozolomide. **Proc Am Soc Clin Oncol** v. 14, p. 461, 1995.

PARAGINSKI, G. L. et al. Avaliação da atividade de clivagem do DNA plasmidial por cinco compostos triazenos inéditos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 33.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA, 6., 2006, Curitiba. *Resumos*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2006. p.90B, res. n.363.

PARAGINSKI, G. L. **Triazenos: clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia Salina* leach.** 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PEREGRINE, A S; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta tropical.** v. 54, p. 185-203, 1993.

PILCH, D. S. et al. Berenil [1,3-Bis(4'-amidinophenyl)triazene] binding to DNA duplexes and to a RNA duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. **Biochem.** v. 34, n. 31, p. 9962-9976, 1995.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. et al. **Leucemias Agudas: Abordagem Imunomolecular no Diagnóstico e na Pesquisa.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

RABINOWITZ, I.; LARSON, R. S. **Chronic myeloid leukemia.** 11a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 2258 p.

RACHID, Z. et al. Synthesis of pyrimidinopyridine–triazene conjugates targeted to abl tyrosine kinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 13, p. 2297-3300, 2003.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chem Rev.** v. 98, n. 8, p. 2723-2796, 1998.

ROCHA MAIA, V. et al. Administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas. *Protocolos de Enfermagem*, HEMORIO, 2010.

ROMANI, L.; FIORETTI, M. C.; BONMASSAR, E. *In vitro* generation of primary cytotoxic lymphocytes against L5178Y leukaemia antigenically altered by 5-(3,3\_-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide in vivo. **Transplantation**. v. 28, p. 218–22, 1979.

RONCONI, L.; SADLER P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemintry Review.**, v.251, n.13-14, p.1633-1648, 2007.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol. Med.** v. 12, n. 9, p. 440–450, 2006.

ROSENBERG, B. Noble metal complexes in cancer chemotherapy. **Adv Exp Med Biol**. v. 91, p. 129-150, 1977.

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

RUBBIANI, R. et al. Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties. **J. Med. Chem.** v. 53, p. 8608 - 8618, 2010.

SCARPELLINI, M. et al. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorg. Chem.** v. 42, p. 8353-8365, 2003.

SCHID, F. A.; HUTCHINSON, D. J. **Cancer Res.** n. 7, p. 1671-1677, 1974.

SCHMIDBAUR, H.; FRANKE, R. Organogold-Chemie. X. Methylgold(I) und Gold(I)-halogenide als komplexbildende Zentren für Trimethylphosphin und Trimethylphosphit. **Chem. Ber.** v. 105, p. 2985–2997, 1972.

SCHMIDBAUR, H. **Gold: Progress in Chemistry Biochemistry and Technology**. Ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1999.



SEDGWICK, B.; VAUGHAN, P. Widespread adaptive response against environmental methylating agents in microorganisms. **Mutat. Res.** v. 250, p. 211–221, 1991.

SEITER, K. et al. Phase I study of temozolamide in relapsed/refractory acute leukemia. **Journal of Clinical Oncology.** v. 20, n. 15, p. 3249-3253, 2002.

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

SHAO, Y. et al. Synthesis and DNA cleavage activity of 2-hydrazinyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine containing hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 17, p. 4274–4279, 2009.

SHAW III, C. F. Gold-based therapeutic agents. **Chemical Reviews.** v. 99, n. 9, p. 2589–2600, 1999.

SHEALY, Y. F.; KRAUTH, C. A.; MONTEGOMERY, J. A. J. Imidazoles. I. Coupling Reactions of 5-Diazoimidazole-4-carboxamide<sup>1,2</sup>. **Org. Chem.** v. 27, n. 6, p. 2150, 1962.

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

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.** v. 22, p. 7265–7279, 2003.

SILL, H. et al. Therapy-related myeloid neoplasms: Pathobiology and clinical characteristics. **Br. J. Pharmacol.** v. 162, p. 792–805, 2011.

SIMON, T. M.; KUNISHIMA, D. H.; VIBERT, G. J.; LORBER, A. Inhibitory effects of a new oral gold compound on HeLa cells. **Cancer (Phila.).** v. 44, p. 1965-1975, 1979 a.

SIMON, T. M., KUNISHIMA, D. H., VIBERT, G. J., AND LORBER. A. Cellular antiproliferative action exerted by Auranofin. **J. Rheumatol.** v. 6 (Suppl 5), p. 91-97, 1979 b.

SIMON, T. M. et al. Auranofin Using Mouse Lymphocytic Leukemia P388 Screening Trial with the Coordinated Gold Compound. **Cancer Res.** v. 41, p. 94-97, 1981.

SRINIVAS, K. et al. Synthesis and antibacterial activity of various substituted s-triazines. **Eur. J. Med. Chem.** v. 41, p. 1240-1246, 2006.

STEVENS, M. F. G. et al. Antitumor activity and pharmacokinetics of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M&B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. **Cancer Res.** n. 47, p. 5846-5852, 1987.

TAKASAKI, B. K.; CHIN, J. Cleavage of the Phosphate Diester Backbone of DNA with Cerium(III) and Molecular Oxygen. **J. Am. Chem. SOC.** v. 114, p. 1121-1122, 1994.

TAVERNA, P. et al. Influence of O6-methylguanine on DNA damage and cytotoxicity of temozolomide in L1210 mouse leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas. **Anticancer Drugs.** n. 3, p. 401-405, 1992.

TENTORI, L. et al. IL-2 reverses the inhibition of cytotoxic T-cell responses induced by 5-(3,3\_ dimethyl-1-triazeno)- imidazole-4-carboxamide (DTIC) in vitro. **Int J Immunopharmacol.** v.12, p. 831-840, 1990.

TENTORI, L. et al. Antitumor and antimetastatic effects of dacarbazine combined with cyclophosphamide and interleukin-2 in Lewis lung carcinoma (3LL). **Cancer Immunol Immunother.** v. 41, p. 375-383, 1995.

TIAN, S. et al. Anticancer gold(I)-phosphine complexes as potent autophagy-inducing Agents. **Chem. Commun.** v. 47, p. 9318-9320, 2011.

TIEKINK, E. R. T. Gold derivatives for the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v. 42, p. 225-248, 2002.

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

ÜNSALAN, S. et al. Synthesis and characterization of triazenes derived from sulfonamides. **Marmara Pharmaceutical Journal.** N.15, p. 11-17, 2011.

UNVERZAGT, W. Erfahrungen mit Goldtherapie bei Tuberkulose. **Dtsch. Med. Wochenschr.** v. 53, p. 1985-1986, 1927.

VENDITTI, J. M. Antitumor activity of DTIC (NSC-45388) in animals. **Cancer Treat Rep.** n.60, p. 135-140, 1976.

WANG, G. et al. Retrovirus-mediated transfer of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene into a murine hematopoietic stem cell line and resistance to the toxic effects of certain alkylating agents. **Biochem Pharmacol.** n. 51, p. 1221-1228, 1996.

WAXMAN, E. S. Advances in chemotherapy for non-small cell lung cancer. **Seminar in Oncology Nursing**, v. 24, n.1, p.49 - 56, 2008.

WEDGE, S. R.; PORTEOUS, J. K.; NEWLANDS, E. S. 3-Aminobenzamide and/or O6 benzylguanine evaluated as an adjunct to temozolomide or BCNU treatment in cell lines of variable mismatch repair status and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity. **Br J Cancer.** v. 74, p. 1030-1036, 1996.

WEDGE, S. R.; PORTEOUS, J. K.; GLASER, M. G.; MARCUS, K.; NEWLANDS, E. S. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. **Anticancer Drugs.** v. 8a, p. 92-97, 1997.

WEISS, M. et al. Cytarabine with high-dose mitoxantrone induces rapid complete remission in adult acute lymphoblastic leukemia without the use of vincristine or prednisone. **J Clin Oncol.** n. 14, p. 2480-2485, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 4 out. 2012.

ZHOU, Y. et al. Structure-Guided Discovery of Novel Aminoglycoside Mimetics as Antibacterial Translation Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 49, n. 12, p. 4942-4949, 2005.

ZHOU, Y. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors; 3,5-Diamino-piperidinyl triazines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, p. 5451-5456, 2006.

ZHOU, Y. et al. Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: Novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 17, n. 5, p. 1206-1210, 2007.

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.

ZOVKO, T. C. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 2971-2983, 2011.

## ANEXOS

### ANEXO A – METODOLOGIA ADICIONAL

#### Extração do DNA plasmidial

A cepa DH5 da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para esta técnica. Os plasmídios foram inseridos nas células bacterianas pelo método de cloreto de cálcio gelado para posterior extração. Para realizar o processo de extração as bactérias foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 µg/ml). O DNA superenovelado (pBSKII e pUC18) foi extraído de acordo com procedimentos descritos por Ausubel, em 1995, através da técnica da lise alcalina (AUSUBEL et al., 1995). O DNA extraído foi analisado quanto à pureza através de leituras espectrofotométricas UV-Vis a 260 e 280 nm, sendo que razão de absorvância entre esses comprimentos de onda de 1,9 a 2,0 indicou que o DNA estava suficientemente livre de proteínas (AUSUBEL et al., 1995).

#### Screening de clivagem do DNA plasmidial pelos triazenos:

Para este ensaio, adicionamos em microtubos eppendorfs 1µg de DNA plasmidial (pBSKII ou pUC18), os compostos em estudo em diferentes concentrações (3,75 mM; 1,875 mM; 0,375 mM) diluídos em etanol/água (1:1) e em pH 6,5 (200 mmol L<sup>-1</sup> PIPES buffer) e 8,0 (200 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl buffer) totalizando um volume final de 20 µL em cada microtubo. As soluções foram incubadas em estufas de 37 e 50° C por 24 horas e após analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio, voltagem de 70V por 3 horas. Utilizamos o tampão de corrida TBE 0,5X (TBE 10X: 0,89 M Tris.HCl pH 8,0, 0,89 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) (AUSUBEL et al., 1995). Através do transiluminador UV a 312 nm, as bandas de DNA são visualizadas e fotografadas usando máquina fotográfica digital e quantificadas usando o programa de computador Scion Image Beta 4.03 (Scion Corp). Se o

composto demonstrasse ser apto a clivar o DNA, os possíveis mecanismos de clivagem dos compostos triazenos seriam investigados por reações na presença de glicerol, DMSO, tiouréia (ROSSI *et al.*, 2002; HÖRNER, 2003) e também em atmosfera de argônio (HORN *et al.*, 2005). A clivagem do DNA é medida através da conversão do DNA superenovelado para as formas circular e linear (HORN *et al.*, 2005).