

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
CITOTÓXICA E NUCLEASE QUÍMICA DE
COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE PLATINA (II)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Litiérri Razia Garzon

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
CITOTÓXICA E NUCLEASE QUÍMICA DE COMPLEXOS
TRIAZENIDOS DE PLATINA (II)**

Litiérri Razia Garzon

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: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

Garzon, Litiérri Razia
Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e
nuclease química de complexos triazenidos de platina
(ii). / Litiérri Razia Garzon.-2015.
58 f.; 30cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Triazeno 2. Atividade antibacteriana 3.
Citotoxicidade 4. Nuclease química 5. Platina I. Hörner,
Rosmari II. Título.

© 2015

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

E-mail: liti_razia@msn.com

**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 ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E
NUCLEASE QUÍMICA
DE COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE PLATINA (II)**

elaborada por
Litiérri Razia Garzon

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

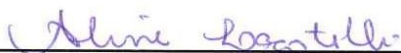
COMISSÃO EXAMINADORA:



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



Luciana Maria Fontanari Krause, PhD. (UNIFRA)



Aline Locatelli, Dr.^a (UPF)

Santa Maria, 30 de abril, 2015.

*Aos meus amores - pais, avós, namorado -
por todo apoio, exemplo, dedicação e carinho.
Às pessoas enfermas,
que depositam na ciência a esperança de sua cura.*

AGRADECIMENTOS

Mais árduo que a pesquisa, é encontrar palavras certas para agradecer de forma justa às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, e àquelas sem as quais eu jamais teria conseguido estar aqui. Deixo registrado meu profundo agradecimento. Minha imensa gratidão.

*À **Deus**, pela vida e pelas oportunidades a mim confiadas.*

*Aos meus **pais, Antônio Carlos e Neusa**, que abriram mão dos seus sonhos para eu poder estar aqui realizando os meus. Por todas as noites em claro cuidando ou esperando por mim. Pelos dias de trabalho duro para me proporcionarem muito mais do que eu precisava. Pelos puxões de orelha, também sou grata, foram através deles que me mostraram o certo e o errado. Obrigada por levarem a vida tão leve e me mostrarem que há beleza em tudo que fizemos juntos.*

*Ao meu príncipe, **Álvaro**, por me permitir mais que um conto de fadas, mas sim uma vida real de plena felicidade e máxima realização. Por sempre compreender minha ausência e os dias difíceis. Que junto aos nossos pequenos, **Barão e Morena**, ensinaram-me que amar nunca é de mais.*

*À minha rainha, **Enedi**, que partiu sem nunca embrutecer. Pelos olhos azuis mais ternos que já vi na vida. Pelo afago silencioso e de olhos fechados que me causavam turbulência na alma.*

*Às minhas amigas-irmãs de uma vida inteira, **Ana Paula, Laura L. e Laura C.**, por saberem a importância de hoje desde que isso era só um futuro distante. E mais além, por me permitirem o sabor da irmandade.*

*Aos meus queridos **amigos** por sempre estarem presentes e tornarem meus dias mais engraçados, leves e completos.*

*Em especial a minha irmã de alma, **Melise**, por me permitir entender que “o sangue não significa nada quando o laço maior é o amor”. Obrigada por estar comigo sempre, este trabalho também é teu.*

*A todas as colegas e amigas do **Laboratório de Bacteriologia** pelo companheirismo, união, apoio, carinho e cumplicidade.*

*À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner**, por me conceder a oportunidade e colaborar na realização deste trabalho.*

Ao Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos da UFSM, em especial

ao **Prof. Dr. Manfred Höner** pela síntese e caracterização dos compostos investigados nesta dissertação.

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

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM** e ao **Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**.

“A persistência é o caminho do êxito”

(CHAPLIN, C.)

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E NUCLEASE QUÍMICA DE COMPLEXOS TRIAZENIDOS DE PLATINA (II)

AUTORA: LITIÉRRY RAZIA GARZON
ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER
Santa Maria, 30 de abril de 2015.

Apesar do grande número de medicamentos antimicrobianos e antitumorais existentes, o arsenal terapêutico encontra-se limitado em virtude do surgimento de mecanismos de resistência bacteriana e refratariedade, além da toxicidade de alguns fármacos. Tal fato tem contribuído para os avanços nas investigações científicas, especialmente, aquelas que visam a obtenção de novos agentes ativos contra doenças infecciosas e o câncer, com mecanismos inovadores e menor toxicidade. Nessa perspectiva, devido a grande versatilidade e diversas propriedades farmacológicas demonstradas pelos triazenos (TZCs) este estudo teve como objetivo a avaliação *in vitro* da atividade biológica de dois compostos TZCs inéditos complexados com Platina (II): {*trans*[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]-*bis*-(piridina)(cloro)platina(II)} (C1) e {*cis*[1-(2-nitrofenil)-3-(2-bromofenil)triazenido]}(ditrifetilfosfina)(cloro)platina(II)} (C2). A atividade antibacteriana foi realizada pelo método convencional da microdiluição em caldo, através da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), frente às cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência múltipla às drogas (RMD). A citotoxicidade foi investigada através do ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) frente às células de medula óssea provenientes de pacientes diagnosticados com leucemia, atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. A atividade de nuclease química foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. De acordo com os resultados, observou-se que ambos os compostos TZCs possuem atividade antibacteriana. O complexo C1 demonstrou atividade frente a *E. faecalis* 51299, *S. saprophyticus* 15305, *E. faecalis* 29212, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213. O complexo C2 foi capaz de inibir o crescimento de uma bactéria RMD, *S. epidermidis* 27. Os complexos estudados demonstraram atividade de estreito espectro sendo ativos somente frente a bactérias Gram positivas. Além disso, C1 promoveu elevada porcentagem de morte celular frente às células de paciente com Leucemia Mieloide Crônica (LMC) de 50,23% à 75,59%. No que se refere à atividade de nuclease, nas condições investigadas, os compostos não foram aptos a clivar o DNA plasmidial. Esse estudo reflete a ampla atividade antimicrobiana e citotóxica dos compostos TZCs.

Palavras-chave: Triazeno. Atividade antibacteriana. Citotoxicidade. Nuclease química. Platina.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

ANTIBACTERIAL ACTIVITY ASSESSMENT, AND CYTOTOXIC NUCLEASE COMPLEX CHEMICAL PLATINUM TRIAZENIDOS (II)

AUTHOR: LITIÉRRRI RAZIA GARZON

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Santa Maria, April 30th, 2015.

Despite the large number of antimicrobials and anti-tumor drugs, therapeutic arsenal is limited due to the emergence of bacterial resistance mechanisms and refractoriness, besides the toxicity of certain drugs. This has contributed to advances in scientific research, especially those aimed at obtaining new active agents against infectious diseases and cancer, with innovative and less toxicity mechanisms. From this perspective, due to the great versatility and diverse pharmacological properties demonstrated by triazenes (TZCs) This study aimed to evaluate in vitro biological activity of two compounds unpublished TZCs complexed with platinum (II): {trans [1- (2-bromophenyl) -3- (2-nitrophenyl) triazenido] bis (pyridine) (chloro) platinum (II)} (C1) and cis- {[1- (2-nitrophenyl) -3- (2-bromofenil) triazenido]} (ditrifenilfosfina) (chloro) platinum (II)} (C2). The antibacterial activity was performed by the conventional method of broth microdilution, by evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) against the bacterial strains benchmark American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates with multiple resistance to drugs (RMD). Cytotoxicity was assessed by colorimetric assay based on reduction of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) compared to the bone marrow cells from patients diagnosed with leukemia treated at the University Hospital of Santa Maria. The chemical nuclease activity was verified by electrophoresis in agarose gel. According to the results showed that both compounds have antibacterial activity TZCs. The C1 complex showed activity against *E. faecalis* 51299, 15305 *S. saprophyticus*, *E. faecalis* 29212, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 29213. The C2 complex was able to inhibit growth of a bacterium RMD *S. epidermidis* 27. The studied complexes showed narrow spectrum of activity being active only against Gram positive bacteria. In addition, C1 promoted high percentage of cell death in the face of patient cells with Chronic Myeloid Leukemia (LMC) of 50.23% 75.59% will. With respect to nuclease activity, in investigated conditions, the compounds were not able to cleave the plasmid DNA. This study reflects the broad antimicrobial and cytotoxic activity of TZCs compounds.

Keywords: Triazene. Antibacterial activity. Cytotoxicity. Nuclease chemistry. Platinum.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 – Estrutura molecular do agente antineoplásico Dacarbazina®.....	18
Figura 2 – Estrutura molecular do agente antineoplásico alquilante Temozolomida®.....	19
Figura 3 – Estrutura molecular do agente antineoplásico Cisplatina®.....	21
Figura 4 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Carboplatina®.....	22
Figura 5 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Oxaliplatina®.....	23
Figura 6 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Nedaplatina®.....	23

Artigo

Figura 1 – Estrutura molecular do complexo 1.....	34
Figura 2 – Estrutura molecular do complexo 2.....	34
Figura 3 – Projeção estrutural dos complexos C1 e C2. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização.....	37

Resultados e Discussão Adicionais

Figura 7 – Representação da clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (FI) nas formas circular (FII) e linear (FIII) via eletroforese em gel de agarose.....	49
Figura 8 – Nuclease química do complexo $\{trans[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]-bis-(piridina)(cloro)platina(II)\}$ (C1) em diferentes condições: pH 6,5 e 8,0; temperatura de 37 e 50°C por 24 h. a) plasmídeo pUC18. b) plasmídeo pBSKII. Em todos: banda 1, somente DNA + tampão; banda 2, DNA + tampão + SE (3,75 mM); banda 3, DNA + tampão + solução 1:2 (1,875 mM); banda 4, DNA + tampão + solução 1:10 (0,375 mM).....	50
Figura 9 – Nuclease química do complexo $\{cis[1-(2-nitrofenil)-3-(2-bromofenil)triazenido][(ditrifetilfosfina)(cloro)platina(II)]\}$ (C2) em diferentes condições: pH 6,5 e 8,0; temperatura de 37 e 50°C por 24h. a) plasmídeo pUC18. b) plasmídeo pBSKII. Em todos: banda 1, somente DNA + tampão; banda 2, DNA + tampão + SE (3,75 mM); banda 3, DNA + tampão + solução 1:2 (1,875 mM); banda 4, DNA + tampão + solução 1:10 (0,375 mM).....	51

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Dados da coleta de intensidade e do refinamento da estrutura cristalina/molecular dos compostos C1 e C2.....	35
Tabela 2 – Porcentagem de atividade dos compostos C1 e C2 frente às cepas ATCC e isolados clínicos RMD	40
Tabela 3 – Percentual de indução de morte celular em razão da concentração dos compostos analisados. C1: {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido] (cloro)(piridil) ₂ Platina(II)}. C2: { <i>cis</i> [1-(2-nitrofenil)-3(2-bromofenil) triazenido] (ditrifetilfosfina)(cloro)platina (II)}. P2: amostra de paciente com LMC.....	41

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Carta de aceite da Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacilo cereus</i>
C1	{ <i>trans</i> [1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido)- <i>bis</i> -(piridina)(cloro)platina(II)}
C2	{ <i>cis</i> [1-(2-nitrofenil)-3-(2bromofenil)triazenido)](ditrifetilfosfina)(cloro) platina(II)}
CA	Câncer
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTIC	Antineoplásico Dacarbaniza
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FI	Forma superenovelada do DNA plasmidial
FII	Forma circular aberta do DNA plasmidial
FIII	Forma linear do DNA plasmidial
GN	Gram negativa
GP	Gram positiva
H	Hidrogênio
H	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiela pneumoniae</i>
LB	Meio Luria Bertani
LLA	Leucemia Linfoide Aguda

LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mL	Mililitros
MRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes à metilicina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Nitrogênio
NITriCo	Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos
nm	Nanômetros
O	Oxigênio
OH	Radical Hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P1	Paciente 1
P2	Paciente 2
pBSKII	Plasmídeo Bluescript SK II
pH	Potencial Hidrogniónico
Pipes	piperazina-N,N-bis(ácido 2-etano sulfônico)
RMD	Resistência Múltipla as Drogas
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. typhimutium</i>	<i>Salmonella typhimutium</i>
SE	Solução estoque
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TMZ	Antineoplásico Temozolomida
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Meio Ágar de soja e Trypticaseína
TZCs	Triazenos
U/mL	Unidades por mililitro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta
V	Volt
VRE	<i>Enterococcus sp.</i> vancomicina resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Compostos triazenos	18
1.2	Complexos de coordenação da platina	20
1.3	Resistência bacteriana	23
1.4	Leucemias	24
1.5	Atividade de nuclease química	26
1.5.1	Clivagem do DNA plasmidial	26
1.6	Justificativa	27
1.7	Objetivos	28
1.7.1	Objetivo geral	28
1.7.2	Objetivos específicos.....	28
2	PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	29
2.1	Artigo – Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola	29
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT	31
	INTRODUÇÃO.....	32
	MATERIAL E MÉTODOS	33
	RESULTADOS	40
	DISCUSSÃO	42
	REFERÊNCIAS	44
3	MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS	48
3.1	Extração do DNA	48
3.2	Screening de clivagem do DNA plasmidial	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS	49
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A busca por novas alternativas para uso terapêutico frente à atividade bacteriana e doenças neoplásicas tem sido o foco de investigações científicas. Os fenômenos de resistência a agentes terapêuticos para o tratamento dessas patologias aliados aos efeitos adversos graves de alguns fármacos, têm limitado o arsenal terapêutico disponível tornando o tratamento escasso ou até mesmo inexistente.

A resistência aos antimicrobianos está aumentando mais rapidamente do que a introdução de novos compostos para a prática clínica (LING et al., 2015). As novas drogas descobertas ou em desenvolvimento tornam-se questão importante, visto que sofrem de problemas com a toxicidade, interações e falhas frente a microrganismos típicos (DOMINGUES et al., 2010; APPELBAUM, 2012; WANG et al., 2014). Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou estudo no qual relata que a resistência aos antimicrobianos é uma ameaça global à saúde pública, pois estamos nos aproximando de uma era pós-antibiótica em que pessoas morrerão de infecções simples (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014).

Outra questão crucial é o câncer (CA), que devido a sua malignidade e mortalidade se mantém sob investigação ao longo dos anos. Tais esforços resultaram em vários alvos descobertos para se conter essa doença, dentre esses o ácido desoxirribonucleico (DNA) passa a ser o mais explorado (ALI; BHATTACHARYA, 2014; FERLEY et al., 2015). Além do mais, outro fenômeno preocupante é a ausência de resposta ao tratamento frente a células neoplásicas (WANG et al., 2015).

Os resultados das pesquisas voltadas para esses tratamentos são satisfatórios, porém insuficientes quando comparados a evolução das doenças em questão. Sabe-se que para a aprovação de uma nova droga é necessário um perfil de segurança nos ensaios clínicos, muitas vezes à custa de centenas de milhões de dólares, envolvendo milhares de pacientes e um período de tempo que não se tem para salvar uma vida. Não surpreendentemente, poucas drogas conseguem emergir como promissor candidato para a quimioterapia do CA (ARROWSMITH, 2011; ZHANG; CHEN, 2012; ALI; BHATTACHARYA, 2014).

No Brasil, as neoplasias apresentam relevância devido ao progressivo número de pacientes que são diariamente diagnosticados e configura-se como um problema de saúde pública. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) foram estimados cerca de 580 mil casos para o ano que passou em nosso país, mantendo-se em 2015. Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de CA e 13,2 milhões de mortes, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, reforçando a magnitude do problema no país (GAMA et al., 2011; ROSAS et al., 2013; BRASIL, 2014).

Apesar da Cisplatina® ser utilizada por décadas como o fármaco antineoplásico mais largamente utilizado dos quimioterápicos, esforços contínuos são voltados para reduzir a toxicidade, melhorar a biodisponibilidade e farmacocinética desfavorável investindo em estruturas análogas (ALI; BHATTACHARYA, 2014). Considerando tais necessidades, diversos estudos nos últimos anos foram focados na busca por novos medicamentos. Usando essa abordagem, vários grupos de pesquisa têm desenhado e sintetizado compostos metálicos e biomoléculas (IQBAL et al., 2013; SANDHU et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Além do mais, nas últimas décadas a qualidade de vida do paciente com neoplasia vem sendo melhorada em decorrência dos avanços tecnológicos e terapêuticos (ROCHA, 2014). Uma alternativa para obtenção de novos metalofármacos capazes de interagir com o DNA genômico e levar à apoptose, são as chamadas "nucleases químicas" que podem clivar o DNA por diversas vias (GAMA et al., 2011).

Em razão disso, os Triazenos (TZCs), livres e seus complexos metálicos, despertaram o interesse por metalofármacos potencialmente ativos e são alvo de muitas pesquisas pela capacidade de aplicações em diversas áreas. Outro fator determinante de sua importância é a diversificada e comprovada atividade biológica, especialmente as atividades antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química (HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al., 2010; ADIBI et al., 2013; BROZOVIC et al., 2014; PARAGINKI et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

Estudos comprovam que compostos dessa natureza são capazes de coordenar-se a vários centros metálicos. Tal capacidade pode se dar através da substituição dos hidrogênios por um íon metálico, exemplo íon Platina (II), conferindo maior estabilidade e potencializando sua atividade (HÖRNER et al., 2008). Dessa

forma, a associação de TZCs com a platina representa uma estratégia na obtenção de compostos com propriedades antibacterianas, antiproliferativas e de nuclease química (JAMIESON; LIPPARD, 1999; MARZANO et al., 2002; PASETTO et al., 2006; ROCHA et al., 2011).

1.1 Compostos triazenos

Os TZCs são compostos orgânicos resultantes do acoplamento de um sal de diazônio com uma amina aromática livre. Pertencentes à família dos sistemas nitrogenados de cadeia aberta, classe de compostos alquilantes, que identificam-se por conterem três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=NN) (BONMASSAR et al., 2013).

O estudo dos TZCs teve seu início em 1859 por Peter Griess que sintetizou o primeiro, o 1,3-*bis*(fenil)-triazeno (MOORE; ROBINSON, 1986). Desde então a pesquisa e a síntese de compostos dessa natureza sofreram uma aceleração sendo estimulados ainda mais após a aprovação para o uso da Dacarbazina® (DTIC) (Figura 1) e Temozolomida® (TMZ) (Figura 2), exemplos de TZCs alquilantes comercialmente disponíveis. São utilizados no tratamento clínico de diferentes tumores, incluindo melanomas, linfomas, sarcomas, tumores cerebrais primários e metastáticos respectivamente (D'INCALCI; SOUTEYRAND, 2001; MARCHESI et al., 2007; CAPORASO et al., 2007).

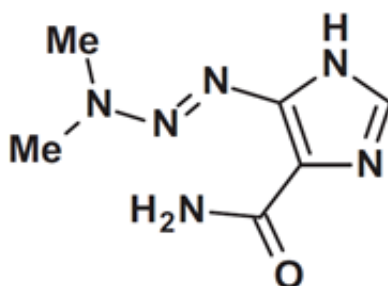


Figura 1 – Estrutura molecular do agente antineoplásico Dacarbazina®

Fonte: Adaptado de Marchesi et al. (2007).

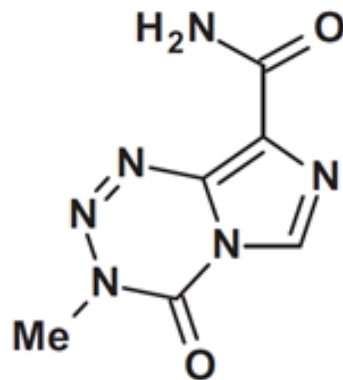


Figura 2 – Estrutura molecular do agente antineoplásico Temozolomida®

Fonte: Adaptado de Marchesi et al. (2007).

Em consequência da ampla versatilidade farmacológica, os TZCs têm sido alvo de várias pesquisas há mais de um século devido a aplicação de complexos metálicos em sistemas biológicos, nas quais se relata a capacidade de clivar o DNA (ZHOU et al., 2006; MARCHESI et al., 2007; HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al., 2010; HAFNER; BRÄSE, 2012).

A citotoxicidade dos TZCs está relacionada com a perda da capacidade da guanina se ligar com a citosina, gerando um par de bases incorreto, pois a guanina metilada liga-se preferencialmente à timina. Pode ocorrer ruptura dos filamentos de DNA e apoptose, capazes de inibir a transcrição e a replicação do DNA, afetando o crescimento do tumor celular. Os TZCs inserem um grupamento metila na posição O⁶ da guanina gerando O⁶-metilguanina, que se não reparada pelas enzimas de reparo do DNA a guanina irá parear com a timina durante a duplicação do DNA, formando O⁶-metilguanina-timina (JAMIESON; LIPPARD, 1999; MARCHESI et al., 2007; HÖRNER et al., 2008).

Os efeitos citotóxicos causados pelos TZCs, em termos quantitativos, têm como local mais comum de alquilação a posição N⁷ na guanina (70% das bases são metiladas) seguida das posições N¹ da adenina (25%), N³ adenina (10%) e em torno de 9% da posição O⁶ da guanina (MARCHESI et al., 2007; BONMASSAR et al., 2013; GOWDA et al., 2014). Em 2011, um estudo abordou compostos complexados com metal e relatou que esses foram capazes de induzir extensa clivagem do DNA plasmidial (GAMA et al., 2011).

Variações na estrutura química desses compostos demonstraram comprovada atividade biológica frente a bactérias (HÖRNER et al., 2008; DOMINGUES et al., 2010; OMBAKA et al., 2012; PARAGINSKI et al., 2014), fungos (OMBAKA et al., 2012) e diferentes linhagens tumorais, incluindo as leucemias (ADIBI et al., 2013; BONMASSAR et al., 2013) e de nuclease química (DOMINGUES, 2010). Assim, complexar ligantes TZCs com íons metálicos é uma estratégia utilizada para melhorar a interação do complexo com o grupamento fosfodiéster do DNA (ABDOU; MOHAMED; FACKLER, 2009).

Estudos avaliaram compostos TZCs, livres ou complexados, e obtiveram atividades biológicas promissoras (ADIBI et al., 2013; BROZOVIC et al., 2014; SANTOS et al., 2014). Hörner e colaboradores relataram a atividade antibacteriana de quinze compostos TZCs, e desses, doze se mostraram eficazes tanto contra bactérias Gram positivas (GP) como para Gram negativas (GN) (HÖRNER et al., 2008). De acordo com estudo recente em que os compostos TZCs analisados foram ativos frente a bactérias GP e GN, incluindo cepas RMD (PARAGINSKI et al., 2014).

Um grupo de pesquisa, em 2010, demonstrou que três compostos TZCs inéditos apresentaram significativa atividade citotóxica, frente às células de medula óssea de pacientes acometidos com leucemia mieloide aguda, os quais também foram aptos a clivar o DNA plasmidial (DOMINGUES et al., 2010).

Em 2013, Bonmassar e colaboradores ratificaram a atividade antileucêmica dos TZCs, além de descrever vários estudos de tratamento da leucemia com esses compostos (BONMASSAR et al., 2013). Uma série de derivados TZCs foram avaliados frente a oito linhagens celulares tumorais. Alguns dos derivados mostraram atividade citotóxica superior a TMZ, medicamento de referência (ABIDI et al., 2013).

1.2 Complexos de coordenação da platina

A cis-diaminodicloroplatina (II), Cisplatina®, foi descoberta por Rosenberg e colaboradores em 1965. Após, em 1970, seus efeitos foram testados e comprovados em sarcomas implantados artificialmente em ratos, seguidos por testes de toxicidade realizados em outros animais (ROCHA et al., 2011). Em 1972 o *National Cancer*

Institute a introduziu em ensaios clínicos, sendo aprovada em 1978 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico como o primeiro complexo metálico utilizado na terapêutica antineoplásica (KAUFFMAN, 2010; GAMA et al., 2011).

A Cisplatina® (Figura 3) é um composto inorgânico, contém um átomo central de platina, potente antineoplásico que desempenha um papel importante no tratamento de diversas neoplasias como testículos, ovários, garganta, bexiga e esôfago (KAUFFMAN, 2010; NEVES; VARGAS, 2011; GOWDA et al., 2014).

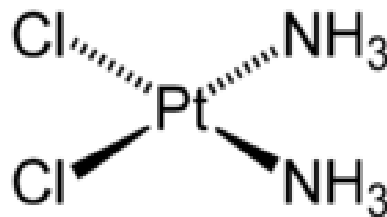


Figura 3 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Cisplatina®

Fonte: Adaptado de Ali; Bhattacharya (2014).

Apesar do sucesso no uso clínico, a Cisplatina® apresenta inconvenientes e sua alta eficácia é limitada por mecanismos de resistência, associados à sua administração, além de uma série de efeitos colaterais que incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e toxicidade gastrointestinal (náuseas e vômitos) motivando a busca por novos complexos derivados de platina (GAMA et al., 2011; GASSER; OTT; METZLER-NOLTE, 2011; NEVES; VARGAS, 2011).

Por muitos anos, estudou-se o seu mecanismo de ação e buscou-se por drogas similares que poderiam ser mais ativas contra variados tipos de CA, com menos efeitos colaterais a fim de evitar a resistência das células cancerosas. Uma maneira encontrada para isso foi variar a estrutura do composto e a posição do íon metálico (GAMA et al., 2011; GASSER; OTT; METZLER-NOLTE, 2011).

Em vista disso, a descoberta de moléculas análogas à Cisplatina® tornou-se tema de diversas pesquisas. Assim, as chamadas drogas de segunda e terceira geração foram sintetizadas e submetidas a testes biológicos e clínicos. Atualmente são empregadas na terapia do CA quatro drogas, pró-fármacos que se tornaram

ativos depois de sofrerem hidrólise (NEVES; VARGAS, 2011; ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Assim, a Carboplatina® (Figura 4) foi o segundo fármaco de platina a receber aprovação pela FDA para uso clínico, a partir de 1985 (NEVES; VARGAS, 2011). É a droga de segunda geração mais utilizada, pois apresenta menor toxicidade gastrointestinal e renal quando comparada a Cisplatina® (PASETTO et al., 2006; NEVES; VARGAS, 2011; GOWDA et al., 2014).

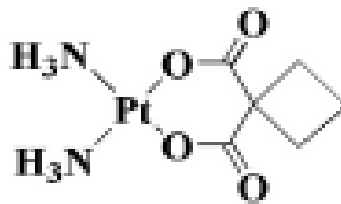


Figura 4 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Carboplatina®

Fonte: Adaptado de Ali; Bhattacharya (2014).

Outros análogos são a Oxaliplatina® (Figura 5) e a Nedaplatina® (Figura 6) que também tem como átomo central a platina e atuam sobre o DNA através da formação de ligações alquil demonstrando eficiente atividade antitumoral (PASETTO et al., 2006). A Oxaliplatina® difere na estrutura, não sendo reconhecida pelo sistema de reparo do DNA, fazendo com que seja ativa em linhagens celulares resistentes à Cisplatina® (NEVES; VARGAS, 2011).

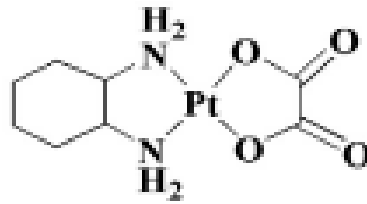


Figura 5 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Oxaliplatina®

Fonte: Adaptado de Ali; Bhattacharya (2014).

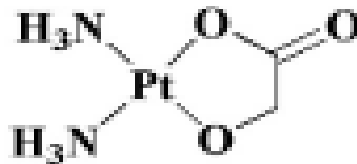


Figura 6 – Representação da estrutura molecular do agente antineoplásico Nedaplatina®

Fonte: Adaptado de Ali; Bhattacharya (2014).

1.3 Resistência bacteriana

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos (GRILLO et al., 2013; WANG et al., 2014).

O surgimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos é implacável sendo um mecanismo natural constituinte de sobrevivência dos organismos (LING et al., 2015). Tal fenômeno é reconhecido como grande desafio nos sistemas de saúde, uma vez que a resistência pode ser adquirida pela genética, por mutações ou por transferência entre bactérias. Essas causas estão ligadas à utilização

indiscriminada, o uso desmedido, irracional, empírico e cotidiano de antimicrobianos no decorrer das últimas décadas e tem contribuído para o aumento do problema (WISE, 2011; APPELBAUM, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

A resistência microbiana refere-se à microrganismos que são capazes de multiplicar-se na presença de antimicrobianos, sendo resistentes a uma ou mais classes de antibióticos. As taxas de resistência variam localmente na dependência do consumo local de antimicrobianos e a consequência dessa aquisição é a falta de opções para utilizar como tratamento. Também sob estas condições, as infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) aumentam o tempo de permanência do paciente no hospital e os custos do tratamento agravando o problema (BRASIL, 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou recentemente um estudo, onde analisou dados de 114 países e relatou que a resistência bacteriana frente aos antibióticos está ocorrendo em todo o mundo, incluindo o Brasil, sendo uma ameaça global à saúde pública, a passos de uma era pós-antibiótico em que pessoas morrem de infecções simples que são curáveis há décadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014).

O controle na utilização de agentes antimicrobianos e a compreensão das semelhanças e diferenças entre estes grupos serão úteis no desenvolvimento de soluções eficazes para melhorar o uso de antibióticos, aliadas a estratégias implementadas pela Comissão de Controle de Infecção hospitalar (CCIH) e apoiadas por todos os profissionais (OLIVEIRA et al., 2013).

1.4 Leucemias

O processo de mudança demográfica, denominado de “envelhecimento” da população, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, colocando as doenças como CA, comum em países onde a expectativa de vida é muito alta, no centro de atenção dos problemas de doença e morte da população (ROSAS et al., 2013; BRASIL, 2014; FERLEY et al., 2015).

Sabe-se que CA é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo,

entre ela as leucemias (BRASIL, 2014). Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências. Alguns fatores de risco estão relacionados com fatores externos (tabaco, microrganismos, produtos químicos e radiação) e outros como fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações decorrentes do metabolismo) (ROSAS et al., 2013; SILVA; MATTOS; TEIXEIRA, 2013; BRASIL, 2014).

As leucemias, constituídas por um conjunto de neoplasias hematológicas, são um tipo de CA, caracterizadas pela proliferação de células hematopoiéticas neoplásicas na medula óssea. São distúrbios malignos clonais caracterizados pela proliferação de blastos anormais e pela produção comprometida de células sanguíneas normais, acometem os leucócitos que são responsáveis por grande parte do sistema imunológico (ZHU; MA; LIU, 2010; ROSAS et al., 2013).

O tratamento é realizado por meio de radioterapia, transplante de medula óssea e principalmente quimioterapia, porém grande parte dos fármacos antineoplásicos, não possui especificidade, causando lesões irreparáveis nas células normais (ZHU; MA; LIU, 2010; BRASIL, 2014).

As leucemias são subdivididas em grupos, onde a primeira divisão está em suas formas aguda e crônica. A doença aguda caracteriza-se por um aumento rápido no número de células imaturas do sangue, o que faz com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis. Já sua forma crônica caracteriza-se pelo aumento excessivo no número de células maduras anormais da série branca do sangue, levando meses ou até anos para progredir (BRASIL, 2014).

Uma classificação geral as divide em: leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC). Dessa maneira, a LMA caracteriza-se por uma proliferação de células imaturas da linhagem mieloide e a LMC ocorre devido a uma alteração genética adquirida que envolve a translocação recíproca entre os braços longo dos cromossomos 9 e 22 (DOMINGUES et al., 2010; BRASIL, 2014).

A pesquisa por novas alternativas para o tratamento de doenças como a leucemia visa a cura e melhora na qualidade de vida dos pacientes, bem como o aumento da sobrevivência. Com isso, também, ocorreram avanços nos tratamentos e no controle dessas enfermidades (ROCHA, 2014).

1.5 Atividade de nuclease química

1.5.1 Clivagem do DNA plasmidial

Moléculas capazes de clivar o DNA possuem um grande valor nos campos da medicina, biologia molecular e engenharia genética pela capacidade de também atuarem como quimioterápicos (GAMA et al., 2011; SILVA et al., 2011; GOWDA et al., 2014). As nucleases, também chamadas fosfodiesterases, são enzimas capazes de clivar, ou cortar, a ligação fosfodiéster das moléculas de ácidos nucleicos (SILVA et al., 2011; JEKIMOVVS et al., 2014).

As nucleases químicas mais eficientes contêm íons de metais de transição em seus sítios ativos. Um exemplo é o fármaco Bleomicina que representa um exemplo clássico de nuclease artificial utilizada como agente antineoplásico. Sua atividade citotóxica resulta de lesão oxidativa da timidilato desoxirribose e outros nucleosídios, ocasionando cisão do DNA (GAMA et al., 2011).

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

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

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

Para a elucidação do mecanismo de clivagem dos compostos TZCs aptos a clivar o DNA, podem ser realizadas reações na presença de sequestradores de radicais livres como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tiouréia. Essas moléculas são capazes de sequestrar radicais hidroxil (OH^{\cdot}) da solução e desse modo, pode-se definir se o mecanismo de clivagem é oxidativo ou hidrolítico. Se a presença desses sequestradores inibir a clivagem, significa que as espécies reativas são essenciais para que a clivagem ocorra, sugerindo que o mecanismo de clivagem envolvido seja oxidativo e depende de radicais livres. Caso essa clivagem não seja inibida, o provável mecanismo é hidrolítico (GAMA et al., 2010; SILVA et al., 2011; GOWDA et al., 2014).

1.6 Justificativa

Em vista do significativo aumento nos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e o surgimento de recidivas aos tratamentos antineoplásicos disponíveis comercialmente, intensificaram-se as pesquisas na busca por substâncias que possuam ação mais eficaz e seletiva gerando o mínimo de efeitos colaterais e refratariedade.

Diante do sucesso do fármaco Cisplatina, o antineoplásico mais largamente utilizado dos quimioterápicos, o íon Platina foi eleito para ser complexado aos compostos TZCs no intuito de superar limitações e desempenhar papel importante favorecendo a atividade biológica.

Assim, a coordenação de íons metálicos aos compostos TZCs, visando a descoberta de terapias inovadoras, constituíram o foco desta pesquisa.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana, citotóxica e de nuclease química de dois complexos triazenos de platina (II) inéditos, sintetizados pelo Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos C1: {*trans*[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]-*bis*-(piridina)(cloro)platina(II)} e C2: *cis*[1-(2-nitrofenil)-3-(2-bromofenil)triazenido]](ditrifetilfosfina)(cloro)platina(II)} frente às cepas bacterianas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC);
- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos C1 e C2 frente a isolados RMD provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos TZCs, C1 e C2, através do ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 – difeniltetrazólio (MTT) frente às células mononucleares de medula óssea, provenientes de pacientes com diagnóstico de leucemia, atendidos no HUSM;
- Determinar *in vitro* a atividade de nuclease química dos compostos TZCs, C1 e C2, frente ao DNA plasmidial (pUC18 e pBSKII) em diferentes:
 - concentrações (3,75; 1,875 e 0,375 mM);
 - pHs (6,5 e 8,0);
 - temperaturas (37° e 50°C).

2 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

2.1 Artigo – Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola.

Triazenidos complexes of platinum (II): *In vitro* evaluation of antibacterial and cytotoxic activity against bacteria and bone marrow cells from leukemic patients in a university hospital.

Litiérri Razia Garzon¹, Melise Silveira Nunes¹, Rosiéli Martini², Roberta Filipini Rampelotto¹, Rosmari Hörner^{3*}, Aline Locatelli⁴, Manfredo Hörner⁵.

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

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

^{3*} Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM, SM, RS, BR.

⁴ Professora Doutora em Química, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo (PF), RS, BR.

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

¹ Artigo aceito para publicação na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada em 14 de abril de 2014.

RESUMO

Atualmente, apesar da ampla gama de substâncias ativas existentes, progressivamente tem se limitado o arsenal terapêutico disponível na prática clínica, isto se deve, especialmente, pelo surgimento da resistência aos agentes terapêuticos utilizados no tratamento de tumores e infecções bacterianas. Em virtude das diversas propriedades farmacológicas demonstradas pelos triazenos (TZCs), avaliaram-se compostos inéditos na busca de novos agentes biologicamente ativos, estes foram denominados C1 e C2. A atividade antibacteriana foi realizada pelo método convencional da microdiluição em caldo, através da técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), frente a cepas bacterianas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência múltipla as drogas (RMD). A citotoxicidade foi analisada através do ensaio colorimétrico baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio frente a células da medula óssea de dois pacientes (P1 e P2) atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria. Os dois compostos testados apresentaram atividade antibacteriana em 26,08% (6/23) das cepas testadas, sendo ativos em 38,46% (5/13) das cepas ATCC e 10% (1/10) dos isolados clínicos RMD, apenas em espécies caracterizadas como Gram positivas. Os resultados foram satisfatórios para ambos os compostos frente a amostra P2, células mononucleares de Leucemia Mieloide Crônica, pois demonstraram indução da morte celular. Pode-se concluir que os resultados obtidos desses compostos demonstraram a existência de atividade antibacteriana, bem como, atividade antileucêmica promissora. Pesquisas complementares relacionadas a esses compostos estão em andamento.

Palavras-chave: Triazeno. Citotoxicidade. Atividade antibacteriana. Platina.

ABSTRACT

Currently, despite the wide range of existing active substances has been progressively limited therapeutic arsenal available in clinical practice, this is, in particular, the emergence of resistance to therapeutic agents used in treating tumors and bacterial infections. Because of the diverse pharmacological properties demonstrated by triazenes (TZCs) - evaluated whether unpublished compounds in the search for new biologically active agents, they were called C1 and C2. The antibacterial activity was performed by the conventional method of broth microdilution, using the technique of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against the bacterial strains reference American Type Culture Collection (ATCC) and clinical isolates with multiple drug resistance (MDR) . Cytotoxicity was analyzed by colorimetric assay based on the reduction of the bromide of 3 - (4,5- dimethylthiazol-2- yl) -2,5- diphenyltetrazolium against bone marrow cells from two patients (P1 and P2) seen at the Hospital university of Santa Maria. The two compounds tested showed antibacterial activity in 26.08% (6/23) of the strains, being active in 38.46% (5/13) of the ATCC strains and 10% (1/10) of clinical isolates MDR only characterized in species such as Gram positive. The results were satisfactory for both the sample compounds front P2, mononuclear cells from chronic myeloid leukemia, as demonstrated induction of cell death. It can be concluded that the results demonstrated the existence of these compounds to antibacterial activity, as well as promising antileukemic activity. Additional research related to these compounds are in progress.

Keywords: Triazene. Cytotoxicity. Antibacterial activity. Platinum.

INTRODUÇÃO

Os complexos metálicos compostos por ligantes nitrogenados, em especial os Trizenos (TZCs), com aplicações em diversas áreas têm despertado o interesse pelos químicos na busca por novos metalofármacos potencialmente ativos. Os TZCs constituem uma classe de compostos orgânicos resultantes do acoplamento de um sal de diazônio com uma amina aromática livre e identificam-se por uma cadeia aberta que contém três átomos de nitrogênio interligados em sequência (N=NN) (Nifontov et al., 1994).

Variações na sua estrutura química demonstraram comprovada atividade biológica frente a bactérias, fungos, protozoários e diferentes linhagens tumorais, incluindo as leucemias. Em consequência da ampla versatilidade farmacológica, os TZCs têm sido alvo de várias pesquisas a mais de um século devido a aplicação de complexos metálicos em sistemas biológicos, nas quais se relata a capacidade de clivar o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), por possuírem atividade antimicrobiana e citotoxicidade (Hörner et al., 2008; Seiter et al., 2009; Domingues et al., 2010; Zovko et al., 2011).

Complexar ligantes TZCs com metais como a platina é uma estratégia utilizada para melhorar a interação do complexo com o grupamento fosfodiéster do DNA e conseqüentemente produzir moléculas mais potentes (Abdou et al., 2009). A atividade dos compostos de platina está relacionada com a interação destes com a molécula de DNA, capazes de inibir a transcrição e a replicação do DNA, afetando assim, o crescimento tumoral (Jamieson & Lippard, 1999). Uma vez que variações estruturais nas moléculas dos compostos TZCs lhe conferem diferentes atividades: repelente, antifúngica, antibacteriana, herbicida, tricomonocida, inseticida, antitumoral, mutagênica, carcinogênica e teratogênica (Nifontov et al., 1994).

O câncer (CA) é uma doença que requer relevância no Brasil devido ao progressivo número de pacientes que são diariamente diagnosticados. Segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2012, 520 mil novos casos de neoplasias foram verificados em brasileiros e para 2013 eram estimados cerca de 1.660.290 novos diagnósticos (INCA, 2011). Além do mais, a sociedade americana de CA projetam que para 2013 poderiam ocorrer aproximadamente 580.350 óbitos devido às neoplasias, cerca de 1.600 pessoas por dia, sendo uma em cada quatro

mortes ocasionada pelo CA, o qual constitui a segunda causa mais comum de óbito nos Estados Unidos da América (EUA) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Além de substâncias com atividade antineoplásica, outro grande desafio é o tratamento anti-infeccioso, pois apesar da ampla gama de substâncias ativas existentes para uso na prática clínica, muitas dessas se mostram ineficazes devido à crescente resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos comercialmente existentes (Silva et al., 2011).

Em consequência dos TZCs possuírem comprovada atividade biológica (Hörner et al., 2008; Domingues et al., 2010) demonstram ser uma estratégia promissora para obtenção de novos compostos antineoplásicos e antibacterianos. Dessa forma, o interesse do nosso estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica *in vitro* de compostos inéditos de TZCs complexados com platina utilizando diferentes cepas bacterianas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), isolados clínicos RMD e frente à células leucêmicas de medula óssea excedentes da rotina laboratorial do setor de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM)-RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Compostos triazenidos

Foram investigados dois complexos de TZCs com platina em estado de oxidação II (Figuras 1 e 2) sintetizados e caracterizados quimicamente, em parceria com o Núcleo de Investigação de Trizenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM):

C1: {*trans*[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]-*bis*-(piridina)(cloro)platina(II)}

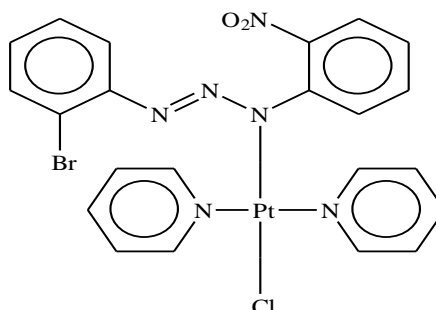


Figura 1 – Estrutura molecular do complexo 1.

Fonte: Tese Aline Locatelli – UFSM 2012.

C2: {*cis*[1-(2-nitrofenil)-3-(2-bromofenil)triazenido]}(ditrifetilfosfina)(cloro)platina(II)}

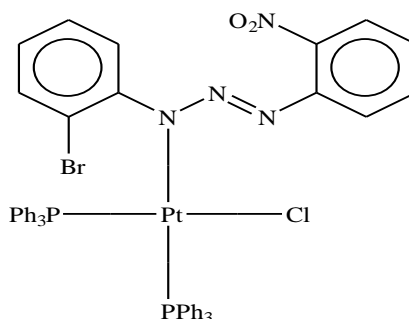


Figura 2 – Estrutura molecular do complexo 2.

Fonte: Tese Aline Locatelli – UFSM 2012.

Caracterização dos compostos triazenidos

Todos os dados de difração de raios-x foram coletados no difratômetro Bruker CCD X8 Kappa Apex II com detector de área, sob temperatura ambiente. Os refinamentos das estruturas foram realizados com o programa SHELXL97

(Sheldrick, G. M.; *SHELXL-97*) e a redução dos dados e correção de absorção envolveram os programas SAINT e SADABS (Sheldrick, G. M.; *SADABS*, 1996), respectivamente. Conforme dados da Tabela 1.

Tabela 1 – Dados da coleta de intensidade e do refinamento da estrutura cristalina/molecular dos compostos (C1) e (C2).

Parâmetros Cristalográficos	(C1)	(C2)
Fórmula Molecular	C ₂₂ H ₁₈ N ₆ O ₂ ClBrPt	C ₄₈ N ₄ O ₂ P ₂ BrClPt
Massa molecular (g)	708,87	1075,21
Cor / Forma	Alaranjado / Prisma	Vermelho / Prisma
Dimensões (mm)	0,14 X 0,22 X 0,29	0,29X 0,21 X 0,20
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>Pbca</i> (n°. 61) ^a	<i>P2₁/n</i> (n°.14) ^a
Parâmetros de Cella Unitária	<i>a</i> = 8,94940(10) Å <i>b</i> = 16,9408(2) Å <i>c</i> = 30,4514(4) Å α = 90° β = 90° γ = 90°	<i>a</i> = 13,8340(9) Å <i>b</i> = 28,3176(18) Å <i>c</i> = 13,8884(9) Å α = 90° β = 115,507(3)° γ = 90°
Volume	4616,74(10) Å ³	4910,4(5) Å ³
Z	8	4
Densidade (calculada)	2,040 mg/m ³	1,454 mg/m ³
<i>F</i> (000)	2704	2120
Comprimento de onda / Radiação	0,71073 Å / Mo-K α	0,71073 Å / Mo-K α
Coefficiente de absorção	7,958 mm ⁻¹	3,830 mm ⁻¹
Região angular de varredura angular e	2,40 a 27,14°	1,44 a 29,66°
Região dos índices	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11 -21 ≤ <i>k</i> ≤ 21 -39 ≤ <i>l</i> ≤ 39	-18 ≤ <i>h</i> ≤ 19 -39 ≤ <i>k</i> ≤ 39 -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19
Solução da Estrutura	Métodos Diretos (<i>SIR</i> -2004)	Métodos Diretos (<i>SIR</i> -2004)
Refinamento da	SHELXL-97	SHELXL-97

Estrutura		
Métodos de Refinamento	Mínimos-quadrados, matriz completa incluindo F^2	Mínimos-quadrados, matriz completa incluindo F^2
Reflexões coletadas	37173	80091
Reflexões independentes	5109 [$R_{(int)} = 0,0416$]	13566 [$R_{(int)} = 0,0493$]
Reflexões observadas	4470	4301
Dados / restrições / Parâmetros	5109 / 0 / 278	13566 / 0 / 532
Goodness-of-fit on F^2	1,245	1,070
Final $R_{índices}$ [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0345$ $wR_2 = 0,0862$	$R_1 = 0,0510$ $wR_2 = 0,1609$
Índices finais de discordância (todas as reflexões)	$R_1 = 0,0429$ $wR_2 = 0,0974$	$R_1 = 0,0869$ $wR_2 = 0,1865$
Densidade eletrônica residual (máx, e min,)	2,118 ^c e -0,974 ^d e.Å ³	2,513 ^a e -1,455 ^b e.Å ³

^a 2.51 (e.Å³) para 0,4872; 0,1997; 0,0751 [2,66 Å do Cl]; ^b -1.45 (e.Å³) para 0,8660; 0,2140; 0,5812 [0,54 Å do Cl];

^c 2.03 (e.Å³) para 0,7197; 0,4240; 0,0737 [0,88 Å da Pt]; ^d -2.08 (e.Å³) para 0,7121; 0,1271; 0,0738 [1,09 Å do H22];

Estruturas cristalinas dos compostos triazenidos

O complexo C1 cristaliza em um sistema monoclinico no grupo espacial $P2_1/n$ (n° 14 – *International Tables for Crystallography*) e o complexo C2 no sistema cristalino ortorrômbico no grupo espacial $Pbca$ (n° 61 – *International Tables for crystallography*). A figura 3 $[\text{PtCl}(\text{BrC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]$ C1 e $\{\text{Pt}(\text{BrC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_2\text{Cl}\}$ C2 representam as moléculas dos complexos com os átomos representados na forma de elipsoides térmicos com suas respectivas simbologias.

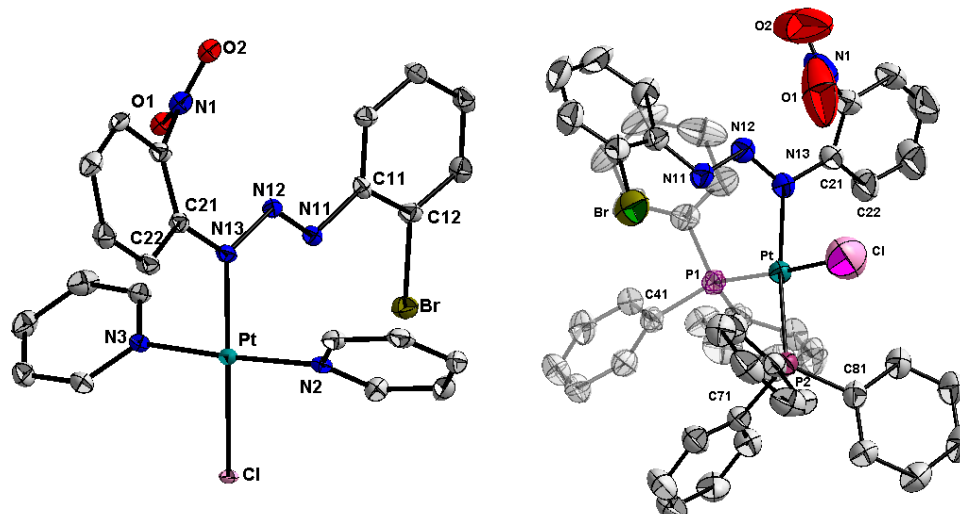


Figura 3 – Projeção estrutural dos complexos C1 e C2. Elipsoides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização.

As estruturas cristalinas dos complexos C1 e C2 são constituídas de moléculas mononucleares neutras de platina(II), acêntricas, e os centros metálicos apresentam geometria quadrática distorcida. O complexo C1 é constituído por um íon triazenido assimétrico $[\text{BrC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)]^-$ [$\text{Pt}-\text{N13} = 2,070(5) \text{ \AA}$], um átomo de cloro [$\text{Pt}-\text{Cl} = 2,238(4) \text{ \AA}$] e duas moléculas neutras de trifenilfosfina [$\text{Pt}-\text{P1} = 2,249(16)$ e $\text{Pt}-\text{P2} = 2,270(16) \text{ \AA}$] apresentando ângulos próximos a 90° [$\text{N13}-\text{Pt}-\text{Cl} = 84,12(18)$; $\text{N13}-\text{Pt}-\text{P1} = 93,35(16)$; $\text{P2}-\text{Pt}-\text{Cl} = 84,43(10)$ e $\text{P1}-\text{Pt}-\text{P2} = 98,11(6)$]. O composto C2 é constituído por um íon triazenido assimétrico $[\text{BrC}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)]^-$ [$\text{Pt}-\text{N13} = 2,018(3) \text{ \AA}$] um átomo de cloro [$\text{Pt}-\text{Cl} = 2,335(9) \text{ \AA}$] e duas moléculas neutras de piridina [$\text{Pt}-\text{N2} = 2,024(4)$ e $\text{Pt}-\text{N3} = 2,011(4) \text{ \AA}$], apresentando ângulos [$\text{N13}-\text{Pt}-\text{N3} = 88,91(14)$; $\text{N13}-\text{Pt}-\text{N2} = 89,25(14)$; $\text{N3}-\text{Pt}-\text{Cl} = 91,66(10)$ e $\text{N2}-\text{Pt}-\text{Cl} = 90,34(10)^\circ$].

Cepas bacterianas

Foram analisadas 23 cepas bacterianas provenientes da Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da UFSM, sendo que 12/23 eram Gram positivas (GP) e

11/23 Gram negativas (GN). Os microrganismos testados constituíram-se de 13 cepas ATCC, sendo elas: 5 GN - *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; e 8 GP - *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.

Foram testadas 10 isolados clínicos RMD obtidos no HUSM, sendo eles: 6 cepas GN: *Acinetobacter baumannii* RMD 34, *A. baumannii* RMD 47, *E.coli* RMD 329, *K. pneumoniae* RMD 806, *K. pneumoniae* RMD 983, *P.aeruginosa* RMD 64; e 4 cepas GP: *S. epidermidis* RMD 27, *S. epidermidis* RMD 102, *S. aureus* RMD 28, *S. aureus* RMD 31.

Atividade antibacteriana

As cepas ATCC e os isolados RMD armazenadas em glicerol 15% em temperatura de -80°C foram ativados previamente utilizando o meio ágar de soja e tripticaseína (TSA), por 24 horas (h) a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A atividade antibacteriana foi realizada utilizando o método convencional da microdiluição em caldo, através da técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), baseado no documento *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os compostos estudados foram diluídos em etanol e água até as concentrações de trabalho desejadas: 128 microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O inóculo bacteriano foi preparado utilizando a escala de 0,5 de *McFarland* $1-2 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) diluída em solução fisiológica, de maneira que em cada poço contivesse 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 h a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e após esse período a CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição, sendo que cada ensaio foi realizado em duplicata.

Células leucêmicas

As células leucêmicas foram obtidas de dois pacientes, um diagnosticado com leucemia mieloide aguda (LMA), que se caracteriza por uma proliferação de células imaturas da linhagem mieloide e outro com leucemia mieloide crônica (LMC), a qual ocorre devido a uma alteração genética adquirida envolvendo a translocação recíproca entre os braços longo dos cromossomos 9 e 22 (Hemorio, 2010; Abrale, 2011). Ambas excedentes da rotina laboratorial do setor de Hematologia-Oncologia do HUSM. A amostra 1 (P1) de paciente com LMA refratária e a amostra 2 (P2) de paciente com LMC que não havia iniciado o tratamento antineoplásico. As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por gradiente de densidade (Ficoll-Paque PLUS – GE Healthcare) e lavadas em meio celular *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI)-1640 (Sigma-Aldrich). Os eritrócitos foram lisados com tampão hemolítico. Em seguida, as células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 20% de soro bovino fetal (Cultilab), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina G (Gibco, Invitrogen), tampão HEPES e bicarbonato de sódio, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Ensaio de citotoxicidade

O efeito citotóxico dos compostos sobre as células da medula óssea foram realizados utilizando o ensaio colorimétrico, baseado na redução do sal diazônico MTT (Mosman, 1983). Os compostos foram dissolvidos em uma mistura de água e etanol em seguida, diluídos nas concentrações de 12,5; 50 e 100 micromolar (µM). A quantidade de células viáveis presentes na suspensão da célula foi estimada por hemocitometria. As células em crescimento exponencial foram expostas às diferentes concentrações dos compostos e incubadas por 24h a 37°C e 5 % CO₂. A cultura controle foi realizada contendo células leucêmicas na ausência dos compostos. Após 20 h, cada poço foi tratado com 10 microlitros (µL) de MTT e as placas foram reincubadas por mais 4 h. Após incubação, os cristais de formazana

foram dissolvidos pela adição de 100 µL de dimetilsulfóxido e a inibição do crescimento celular detectada por meio da medida das absorvâncias a 570 nanômetros (nm) utilizando um leitor de microplacas (Fisher Bio-Tek BT2000). A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada em seguida.

Conceitos éticos

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

RESULTADOS

Os resultados da análise dos compostos foram promissores, evidenciando atividade antibacteriana nos dois compostos testados, C1 e C2. A capacidade de inibição do crescimento foi obtida em 6 das 23 (26,08%) bactérias estudadas. Todas as bactérias que os compostos foram ativos eram GP. Foram em 5 das 13 cepas ATCC, e 1 dos 10 isolados bacterianos RMD testados, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de atividade dos compostos C1 e C2 frente às cepas ATCC e isolados clínicos RMD.

	C1 (%)		C2 (%)		Total (%)
	ATCC	RMD	ATCC	RMD	
Com atividade	21,73 (5/13)	-	-	4,3 (1/10)	26,08 (6/23)
Sem atividade	78,27 (8/13)	-	-	95,7% (9/10)	73,91 (17/23)

Em relação às cepas ATCC, o composto C1 apresentou atividade para *E. faecalis* 51299 e *S. saprophyticus* 15305 com CIM de 64 µg/mL. Já o *E. faecalis* 29212 demonstrou pronunciada atividade com CIM de 16 µg/mL. Ainda, o complexo C1 demonstrou concordância nos resultados sendo ativo em 2 das 4 cepas de *S. aureus* testadas, sendo elas: *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213, apresentando CIM de 64 µg/mL para todos esses microrganismos.

Quanto aos isolados RMD, foi obtido valor de CIM de 64 µg/mL para o composto C2 frente ao *S. epidermidis* 27. Para as demais bactérias analisadas os compostos C1 e C2 obtiveram CIM >128 µg/mL.

Quanto às células leucêmicas, ambos os compostos apresentaram uma baixa atividade citotóxica para amostra celular P1. Esse resultado pode estar relacionado a maior resistência das células devido ao tratamento antineoplásico prévio.

Já os resultados obtidos frente às células mononucleares P2, foram satisfatórios, pois induziram mais de 40% de morte celular nas concentrações testadas, relatando que a atividade foi dose dependente, conforme exposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Percentual de indução de morte celular em razão da concentração dos compostos analisados. C1: {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]}(cloro)(piridil)2Platina(II)}. C2: {cis[1-(2-nitrofenil)-3-(2-bromofenil)triazenido]}(ditrifetilfosfina)(cloro)platina(II)}. P2: amostra de paciente com LMC.

% Morte celular			
Composto	Concentração	Concentração	Concentração
	100 µM	50 µM	12,5 µM
C1	75,59	71,61	50,23
C2	50,99	41,15	40,77

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que ambos os complexos triazenidos, C1 e C2, foram ativos frente aos microrganismos testados. Em relação a Tabela 2, resultados semelhantes foram relatados por Hörner e colaboradores, que realizaram estudo envolvendo TZCs e evidenciaram que 12 dos compostos testados apresentaram atividade antimicrobiana (Hörner et al., 2008).

Os complexos apontaram característica de espectro reduzido, já que foram ativos somente contra bactérias GP. Na clínica, antimicrobianos de pequeno espectro são usados para combater infecções específicas sem agredir a população bacteriana normal protetora do hospedeiro. As bactérias GP possuem parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicano, já as GN possuem parede celular mais delgada e apresentam uma segunda membrana lipídica, explicando a maior resistência aos antibióticos (Yeo et al., 2013).

Em relação a atividade do composto C1 frente às ATCC, dados compatíveis com o nosso estudo foram reportados em uma pesquisa, na qual foram testados compostos triazenidos e obtidos resultados semelhantes para as mesmas bactérias testadas (Hörner et al., 2008). A atividade de C1 para *E. faecalis* 51299, *Enterococcus* Vancomicina Resistente (VRE), de grande importância visto que atualmente são citados como patógenos causadores de infecções hospitalares (Alves et al., 2012).

Considerando os efeitos dos compostos de coordenação testados neste estudo, pode-se sugerir a eficácia de C1 contra infecções ocasionadas por *S. aureus*, uma vez que foi fortemente ativo. Sabe-se que já é de conhecimento científico que a formação de biofilme aumenta a resistência desses microrganismos aos antimicrobianos usuais. Fernandes e colaboradores demonstraram que compostos complexados com metais são valiosos protótipos para o desenvolvimento de novos metalofármacos com atividade antibacteriana frente às cepas de *S. aureus* (Fernandes et al., 2010).

A importância da descoberta de novos agentes biologicamente ativos se deve ao fato de muitas espécies bacterianas, principalmente as hospitalares, que anteriormente eram sensíveis à maioria dos fármacos e hoje possuem elevada resistência e mecanismos de virulência altamente patogênicos.

O composto C2 mostrou-se eficaz para *S. epidermidis* sendo este um isolado clínico hematológico de pacientes internados no HUSM. A análise do seu perfil de sensibilidade caracterizou esse isolado como *S. epidermidis* meticilina resistente (MRSE), gene *mecA* e *icaD* positivo (produtor de biofilme), e possuem sensibilidade somente a vancomicina, clindamicina, tigeciclina e teicoplanina. Uma vez que, bactérias multirresistentes podem possuir sistemas de efluxo contra múltiplas drogas tornando-se resistentes a pelo menos três das classes antimicrobianas: aminoglicosídeos, penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas (Neves et al., 2011).

Conforme resultados expostos na Tabela 2, os compostos não inibiram o crescimento bacteriano em 17/23 das bactérias testadas. Sugere-se que isso se deve as limitações nas concentrações e quantidades adotadas dos compostos para a realização dos nossos testes. Porém, os compostos TCZs possuem comprovada atividade antimicrobiana, relatada desde 1966 contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, entre outras (Shealy et al., 1966). Recentemente, em diversos estudos, uma série de derivados de TZCs foi sintetizada e os resultados apresentaram potencial antimicrobiano (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2007).

Quanto às células leucêmicas, o composto C1 apontou resultados promissores de morte celular, visto que a experiência clínica sobre o uso de compostos TZCs em leucemias é limitada e pouco significativa atualmente; entretanto, alguns estudos demonstraram que tanto a Dacarbazina® como a Temozolomida® e compostos TZCs possuem atividade antineoplásica em pacientes leucêmicos (Seiter et al., 2009). Em seu recente trabalho, Bonmassar e colaboradores ratificaram a atividade antileucêmica dos TZCs, como a relatada nesta pesquisa (Bonmassar et al., 2013).

A introdução de moléculas bioativas nos ligantes dos complexos de platina constitui uma estratégia que permite o direcionamento da droga para as células tumorais. Em outro estudo, avaliaram o potencial anticâncer e a nefrotoxicidade de um complexo de platina (II) inédito e compararam com a cisplatina. Os resultados evidenciaram que o complexo inédito foi menos tóxico para o rim, além de apresentar citotoxicidade superior em relação à cisplatina, quando testado em diferentes linhagens de células tumorais (Marzano et al., 2002).

Em 2010, Domingues e colaboradores realizaram estudos com compostos TZCs inéditos e três destes, assim como em nosso estudo, apresentaram

significativa atividade citotóxica, *in vitro*, contra células de medula óssea de pacientes acometidos de leucemias, além do mais, foram aptos a clivar o DNA plasmidial dupla fita (Domingues et al., 2010).

Dessa forma, C1 foi o composto com maior atividade, visto que esteve ativo em 5 das 6 bactérias com crescimento inibido, também se destacou na indução da morte celular, tendo resultado superior a 75% na maior concentração testada (100 μ M). Porém, cabe salientar que o composto C2 foi efetivo em isolados clínicos multirresistentes. Outro ponto importante a ser exaltado, é a diferença entre as atividades observadas em cada composto do nosso estudo, indicando estar ligada aos grupos integrantes na molécula. Uma vez que, a adição de um precursor dipiridil ao ligante foi capaz de tornar o complexo C1 mais ativo para cepas ATCC que o complexo C2, o qual teve inserido um grupo trifenilfosfina e foi ativo em RMD.

A pesquisa foi realizada para investigar a ação antibacteriana e antileucêmica de complexos triazenidos com platina (II). Com os resultados obtidos foi evidenciado o potencial terapêutico frente às cepas ATCC e isolados RMD, também células de medula óssea. Pode-se inferir que ambos os TZCs são ativos e seletivos, pelo fato de inibirem o crescimento somente de bactérias GP e apontaram elevada atividade citotóxica, através da indução de morte celular, sendo que o C1 teve efeito superior ao C2. Além disso, vale enfatizar que C1 foi capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias ATCC e C2 RMD. Em vista disso, estão sendo realizados estudos adicionais a fim de correlacionar os valores encontrados nesse estudo.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

Abdou HE, Mohamed AA, Fackler Jr, Burini JP, Galassi A, Luzuriaga RL, et al.

Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. *Coord Chem Rev.* 2009;253:1661-1669.

Abrale. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Doenças e Tratamentos. São Paulo (SP); 2011.

Alves MLP, Melo GAN, Yamad SS, Nishiyama. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin. *Acta Sci.* 2012;34(2):199-204. DOI: 10.4025/actascihealthsci.v34i2.10617.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society; 2012.

Bonmassar L, Marchesi F, Pascale E, Franzese O, Margison GP, Bianchi A. et al. Triazene Compounds in the Treatment of acute Myeloid Leukemia : a Short Review and a Rase report. *Curr Med Chem.* 2013;19:2389-2401.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-document M07-A9-2012. Approved Standart – Ninth Edition; 2012.

Domingues VO, Hörner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN. et al. In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(12):2226-2237.

Fernandes C, Horn A, Motta OV, Assis VM, Rocha MR, Mathias LS. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of Fe^{III}, Co^{II}, Cu^{II} and Zn^{II} complexes probed by transmission electron microscopy. *J Inorg Biochem.* 2010;104:1214-1223.

HAHN, T. ; International Tables for Crystallography, Vol. A Space-Group Symetry, 2^a Ed. ; The International Unio of Crystallography. Dordrecht, Holland, 1987.

Hemorio. Protocolos de enfermagem-Administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas. 1^a ed. Rio de Janeiro (RJ); 2010.

Hörner M, Giglio VF, Santos AJRWAS, Westphalen AB, Iglesias BA, Martins PB. et al. Triazeno e atividade antibacteriana. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2008;44(3):441-449.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012, Incidência de Câncer no brasil. *Jornal do Brasil*; 2011.

Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem Rev.*1999;99:2467-2498.

Marzano C, Giuseppina F, Dolores F, Sitran S, Giovagnini L, Baccichetti F. et. al. Synthesis of a new platinum(II) complex: anticancer activity and nephrotoxicity in vitro. *In Vitro Toxicol.* 2002;16:413-419.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*.1983;65:55-63.
- Neves PR, Mamizuka ME, Levy EC, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*. 2013;47(4):409-420.
- Nifontov VI, Berskaya NP, Shtokareva EA. The reactivity and mechanism of action of triazenes. *J Pharm Chem*.1994;28:687-706.
- Seiter K, Katragadda S, Ponce D, Rasul M, Ahmed N. *J Hematol Oncol*. 2009;2: 2-21. DOI: 10.1186/1756-8722-2-21.
- Shealy YF, Krauth CA, Pittillo RF, Hunt DE. A new antifungal and antibacterial agent, methyl 5(or4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4(or 5)-carboxylate. *J PharmSci*. 1966;56(1):147-148. DOI:10.1002/jps.2600560133.
- Sheldrick GM.; SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, Universidade de Göttingen, Alemanha, 1996.
- Sheldrick GM, SHELXL-97; Program for Crystal Structure Refinement, Universidade de Göttingen, Alemanha, 1997.
- Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AM, Bortolotto T, Fischer FL. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem*. 2011;50:6414-6424. DOI: 10.1021/ic101791r.
- Yeo CY, Sim JH, Khoo CH, Goh ZJ, Ang KP, Cheah YK. et al. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane-gold(O-alkylthiocarbamates), Ph₃PAu[SC(OR)=N(p-tolyl)] (R=Me, Et and iPr). *Gold Bull*. 2013;46:145-152. DOI:10.1007/s13404-013-0091-z.
- Zhou Y, Sun Z, Froelich JM, Hermann T, Wall D. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:5451-5456.
- Zhou Y, Vlad EG, Ayida BK, Winters GC, Sun Z, Murphy D. et al. Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:1206-1210.
- Zhou Y, Vlad EG, Sun Z, Ayida BK, Winters GC, Murphy D. et al. Structure-guided discovery of novel aminoglycoside mimetics as antibacterial translation inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):4942-4949. DOI: 10.1128/AAC.
- Zovko TC, Brozovic A, Piantanida I, Fritz G, Virag A, Ali B. et al. Synthesis and

biological evaluation of 4-nitro-substituted 1,3-diaryltriazenes as a novel class of potent antitumor agents. *Eur J Med Chem.* 2011;46:2971-2983.

2 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS

2.1 Extração do DNA

Ensaio de clivagem do DNA plasmidial foram realizados com o intuito de investigar a atividade de nuclease química dos compostos. Para a avaliação do *screening* de clivagem, fez-se necessário realizar a extração dos plasmídeos pUC18 e pBSKII previamente inseridos nas células bacterianas de *E. coli* (cepa DH5 α) através do método de cloreto de cálcio gelado. As bactérias foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) contendo ampicilina (100 μ g/mL). Os plasmídios apresentam resistência a esse antibiótico e somente as bactérias contendo o plasmídio crescem neste meio. O DNA plasmidial (pUC18 e pBSKII) foi extraído de acordo com a técnica de lise alcalina (AUSUBEL et al., 1995; HÖRNER, 2003).

2.2 *Screening* de clivagem do DNA plasmidial

Neste ensaio os reagentes foram adicionados em microtubos, DNA plasmidial e diferentes concentrações finais dos compostos C1 e C2 (3,75; 1,875 e 0,375 mM), usando pH variado (6,5 - tampão Pipes e 8,0 - tampão Tris/HCl) em duas temperaturas (37° e 50°C). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, com aplicação de uma voltagem de 50-70 V por 2–3 h, utilizando tampão de corrida e solução *loading buffer* (tampão de leitura), adicionado a cada microtubo previamente a eletroforese. As bandas de DNA foram visualizadas por adição de brometo de etídio ao gel de agarose, com a ajuda de um transiluminador UV a 312 nm (AUSUBEL et al., 1995; HÖRNER, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

Dentre os vários métodos utilizados para a detecção da clivagem do DNA plasmidial, a eletroforese em gel de agarose consiste em um método simples e altamente eficiente para a separação, identificação e purificação de fragmentos de DNA (AUSUBEL et al., 1995).

Através dessa técnica, a migração das diferentes formas do DNA no gel de agarose pode ser visualizada (Figura 7). Na ocorrência de clivagem é possível verificar a diminuição da banda referente a forma I do DNA (superenovelada ou FI) e aumento da forma II (circular aberta ou FII). Em algumas ocasiões pode-se observar uma clivagem altamente eficiente, com formação da forma III (linear ou FIII). Se uma fita do DNA é clivada, o superenovelamento se desfaz relaxando para a forma circular aberta, de mobilidade eletroforética mais lenta. Se ambas as fitas são clivadas, a forma linear é gerada, e esta, tem migração eletroforética intermediária, ou seja, entre as formas superenovelada e circular aberta (HÖRNER, 2003).



Figura 7 – Representação da clivagem do DNA pela transformação da forma superenovelada (FI) nas formas circular (FII) e linear (FIII) via eletroforese em gel de agarose.

Conforme Figuras 8 e 9, os dados demonstraram que, nas condições pré-determinadas, os complexos C1 e C2 não foram hábeis a clivar o DNA plasmidial.

Cabe ainda, ressaltar que outros estudos comprovam a capacidade de nuclease dos compostos TZCs (HÖRNER, 2003; PARAGINSKI, 2007).

Além disso, um estudo avaliando vários compostos TZCs, quanto a capacidade de clivar DNA plasmidial, sugeriu como provável mecanismo o hidrolítico, sendo semelhante ao promovido por nucleases naturais (DOMINGUES et al., 2010).

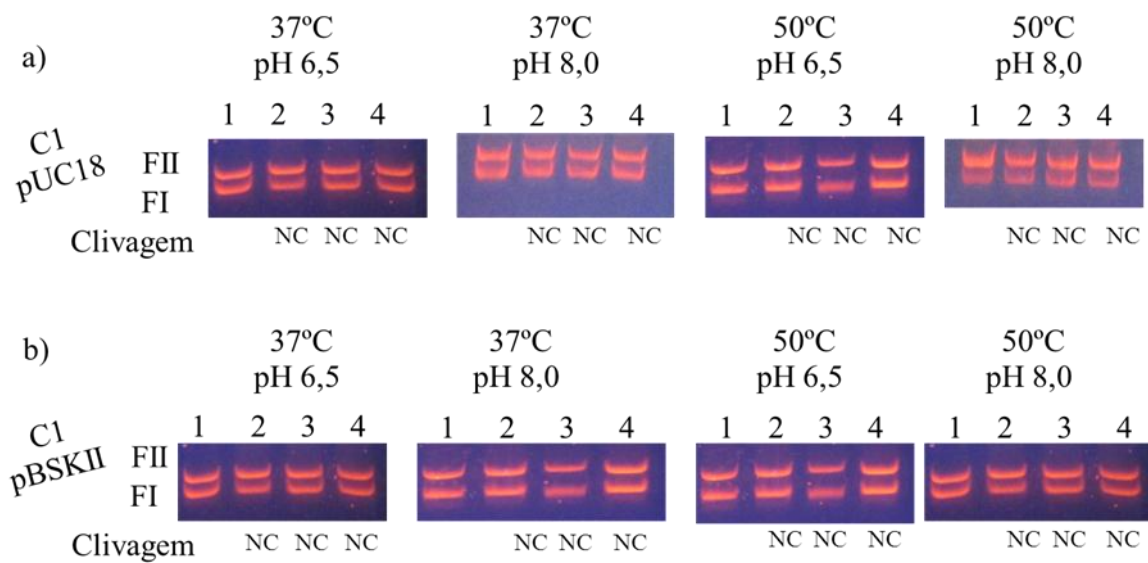


Figura 8 – Nuclease química do complexo $\{trans[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido]-bis-(piridina)(cloro)platina(II)\}$ (C1) em diferentes condições: pH 6,5 e 8,0; temperatura de 37°C e 50°C por 24 h. a) plasmídeo pUC18. b) plasmídeo pBSKII. Em todos: banda 1, somente DNA + tampão; banda 2, DNA + tampão + SE (3,75 mM); banda 3, DNA + tampão + solução 1:2 (1,875 mM); banda 4, DNA + tampão + solução 1:10 (0,375 mM); NC: não clivou.

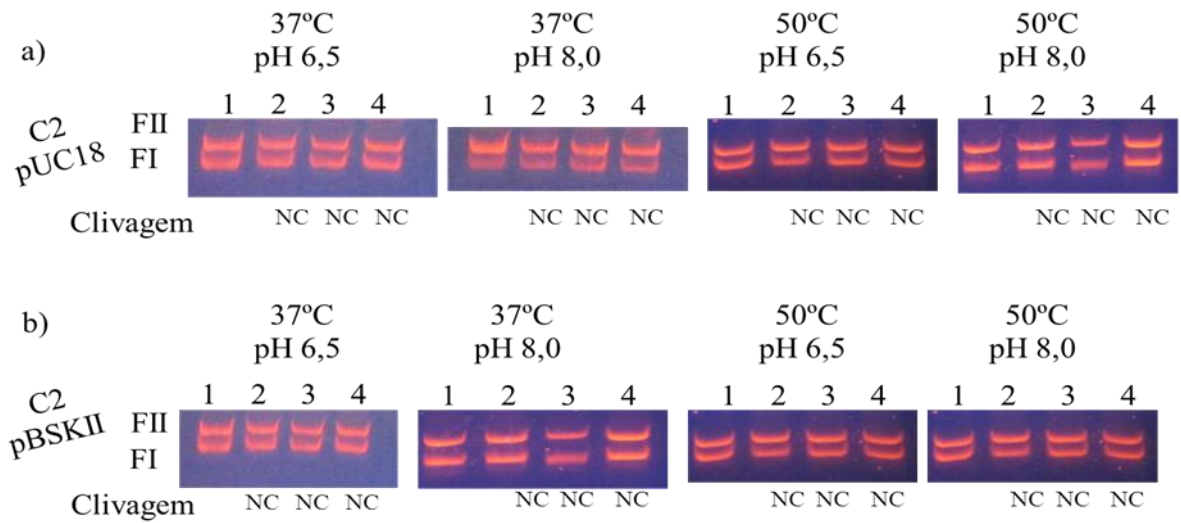


Figura 9 – Nuclease química do complexo $\{cis[1-(2\text{-nitrofenil})-3-(2\text{-bromofenil})\text{triazenido}](\text{ditrifetilfosfina})(\text{cloro})\text{platina(II)}\}$ (C2) em diferentes condições: pH 6,5 e 8,0; temperatura de 37°C e 50°C por 24 h. a) plasmídeo pUC18. b) plasmídeo pBSKII. Em todos: banda 1, somente DNA + tampão; banda 2, DNA + tampão + SE (3,75 mM); banda 3, DNA + tampão + solução 1:2 (1,875 mM); banda 4, DNA + tampão + solução 1:10 (0,375 mM); NC: não clivou.

A habilidade de clivar o DNA constitui um interesse multidisciplinar, especialmente nos campos da medicina e biotecnologia. Assim, estudos futuros poderão contemplar estes resultados para melhor compreensão do comportamento dos complexos TZCs em relação a outras enfermidades. Principalmente no que tange à opção pela realização do rastreamento de mecanismos da nuclease química, bem como a avaliação morfológica com a identificação de apoptose/necrose.

5 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos demonstraram que os compostos TZCs estudados possuem ampla atividade biológica, sendo ativos tanto frente a alguns microrganismos de interesse clínico e células leucêmicas.
- O complexo C1 foi capaz de inibir o crescimento de várias cepas bacterianas GP, *E. faecalis* 51299, *S. saprophyticus* 15305, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213 (CIM= 64 µg/mL), especialmente, *E. faecalis* 29212 (CIM= 16 µg/mL).
- O complexo C2 demonstrou-se ativo frente a uma cepa bacteriana RMD de *S. epidermidis* (CIM= 64 µg/mL).
- Os complexos estudados demonstraram atividade de estreito espectro sendo ativos somente frente a bactérias Gram positivas.
- Ambos os compostos demonstraram atividade antileucêmica *in vitro*, com atividade antiproliferativa dose-dependente.
- Frente às células do paciente com LMA refratária (P1) os percentuais de morte celular foram baixos e, portanto, não foram relatados.
- Já os percentuais de morte celular frente à amostra de medula óssea do paciente portador de LMC (P2) foram satisfatórios para ambos os compostos.
- O composto C1 induziu mais de 50% de morte celular na menor concentração testada (12,5 µM) e aproximadamente 75% na maior concentração testada (100 µM).
- O composto C2 promoveu 40,77% de morte celular na menor concentração testada (12,5 µM), e o percentual de morte celular quando foi expostas a maior concentração (100 µM) do composto foi de 50,99%.
- Em relação à análise da atividade de nuclease, ambos os compostos não foram aptos a clivar o DNA plasmidial nas concentrações e condições adotadas.
- Ressalta-se que C1 possui grupamento dipiridil e C2 um grupamento trifenílfosfina. Acredita-se que a maior atividade de C1 possa estar relacionada ao ligante acima descrito.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. E.; MOHAMED, A. A; FACKLER, J. P. Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1661-1669, 2009.

ABIDI, H. et al. Synthesis, and *In-vitro* Cytotoxicity Studies of a Series of Triazene Derivatives on Human Cancer Cell Lines. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 695-703, 2013.

ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 4506-452, 2014.

APPELBAUM, P. C. 2012 and beyond: potential for the start of a second pre-antibiotic era? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2062-2068, 2012.

ARROWSMITH, J. Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 328, 2011.

AUSUBEL, F. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**, 1. ed. John Wiley & Sons, 1995.

BONMASSAR, L. et al. Triazene Compounds in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia : a Short Review and a Rase report. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2389-2401, 2013.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANISA). **Nota técnica Nº 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes**. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014, incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

BROZOVIC, A. et al. 3-Acetyl-bis(2-chloro-4-nitrophenyl)triazene is a potent antitumor agent that induces oxidative stress and independently activates the stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 3, p. 289-295, 2014.

CAPORASO, P. et al. Novel role of triazenes in haematological malignancies: Pilot study of temozolomide, lomeguatrib and IL-2 in the chemo-immunotherapy of acute leukaemia. **DNA Repair**, v. 6, n. 8, p. 1179-1186, 2007.

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

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

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

GAMA, S. et al. Copper(II) complexes with tridentate pyrazole-based ligands: synthesis, characterization, DNA cleavage activity and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 637-644, 2011.

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

GOWDA, S. K. R. et al. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

GRILLO, V. T. R. S. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista De Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

HAFNER, A.; BRÄSE, S. Ortho-Trifluoromethylation of Functionalized Aromatic Triazenes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, p. 3713-3715, 2012.

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

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

IQBAL, M. A. et al. Short meta-metal separations and *in vitro* anticancer studies of a new dinuclear silver(I)-*N*-heterocyclic carbene complex of *para*-xylyli-linked bis-benzimidazolium salt. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 28, p. 64-69, 2013.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

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

KAUFFMAN, G. B. Discoverer of Cisplatin. **Platinum Metals Review**, v. 54, p. 250-256, 2010.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 14098, 2015.

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

MARZANO, C. et al. Synthesis of a new platinum(II) complex: anticancer activity and nephrotoxicity in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 16, p. 413-419, 2002.

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

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina (II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

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

OMBAKA, A. O. et al. Antibacterial and antifungal activities of novel hydroxytriazenes. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, n. 7, p. 133-136, 2012.

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

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

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.

PASETTO, L. et. al. The development of platinum compounds and their possible combination. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v. 60, n. 1, p. 59-75, 2006.

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

ROCHA, V. Qualidade de Vida de Pacientes Submetidos ao Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas no Período de Hospitalização. 2014. 131f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ROSAS, M. S. L. et al. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243-265, 2013.

SANDHU, S. et al. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3806-3814, 2014.

SANTOS, A. J. R. W. A. et al. Triazene 1-oxide compounds: Synthesis, characterization and evaluation as fluorescence sensor for biological applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, p. 264-271, 2014.

SILVA, D. S.; MATTOS, I. E.; TEIXEIRA, L. R. Tendência de Mortalidade por Leucemias e Linfomas em Menores de 20 anos, Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 165-173, 2013.

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

WANG, W. et al. Divalporex sodium enhances the anti-leukemic effects of imatinib in chronic myeloid leukemia cells partly through SIRT1. **Cancer Lett**, v. 356, p. 791-799, 2015.

WANG, X. D. et al. Novel 3-aryl furan-2(5H)-one-fluoroquinolone hybrid: Design, synthesis and evaluation as antibacterial agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3620-3628, 2014.

WISE, R. The urgent need for new antibacterial agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1939-1940, 2011.

ZHANG, X. et al. The design and discovery of water soluble 4-substituted-2,6-dimethylfuro[2,3-d]pyrimidines as multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors and microtubule targeting antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 3753-3772, 2014.

ZHANG, Y.; CHEN, T. Targeting nanomaterials: Future drugs for cancer chemotherapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5283-5286, 2012.

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

ZHU, X.; MA, Y.; LIU, D. Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 17, p. 17-27, 2010.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aceite da Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 14 de abril de 2014.

RCFBA-3353-287/2013

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação in vitro da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola,

de autoria de Litiérri Razia Garzon, Melise Silveira Nunes, Rosiéli Martini, Roberta Filipini Rampelotto, Rosmari Hörner, Aline Locatelli, Manfredo Hörner, foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe