Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2015;36(2):285-291
ISSN 1808-4532

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

Litiérri Razia Garzon[1]; Melise Silveira Nunes[1]; Rosiéli Martini[2]; Roberta Filipini Rampelotto[1]; Rosmari Hörner[3]*; Aline Locatelli[4]; Manfredo Hörner[5]

[1,2] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, (RS), Brasil.
[3] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, (RS), Brasil.
[4] Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.
[5] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, (RS), Brasil.

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 à amostra P2, células mononucleares de Leucemia Mielóide 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.

Autor correspondente: Profa. Dra. Rosmari Hörner, Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS).
E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os complexos metálicos compostos por ligantes nitrogenados, em especial os Triazenos (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 contêm 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 consequentemente 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 TZC lhe conferem diferentes atividades: repelente, antifúngica, antibacteriana, herbicida, tricomonicida, 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 em 2013 estão sendo estimados cerca de 1.660.290 novos diagnósticos (INCA, 2011). Além do mais, a sociedade americana de CA projeta que para 2013 possam 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 micro-organismos frente aos antimicrobianos comercialmente existentes (Silva et al., 2011).

Em consequência dos TZCs possuírem comprovada atividade biológica, antitumoral, antimicrobiana e de nuclease química (Hörner et al., 2008; Domingues et al., 2010) quando associados aos metais, como a platina, 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 com resistência múltipla as drogas (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 Triazenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM):

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 SADA¬BS (Sheldrick, G. M.; SADABS, 1996), respectivamente. Conforme dados da Tabela 1.

Estruturas cristalinas dos compostos triazenidos

O complexo C1 cristaliza em um sistema monoclínico no grupo espacial P21/n (n° 14 – *International Tables for Cristallography*) e o complexo C2 no sistema cristalino ortorrômbico no grupo espacial

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

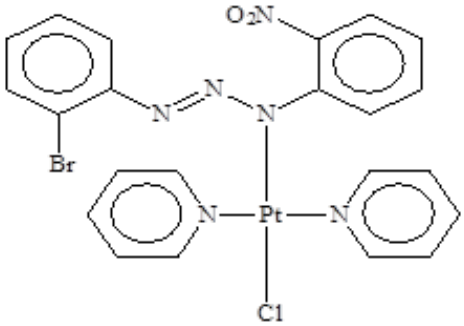

Figura 1 – Estrutura molecular do complexo 1.
Fonte: Tese Aline Locatelli – UFSM 2012.

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

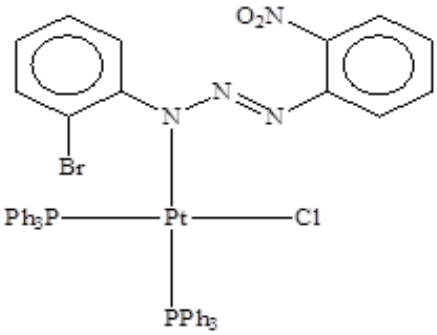

Figura 2 - Estrutura molecular do complexo 2.
Fonte: Tese Aline Locatelli – UFSM 2012.

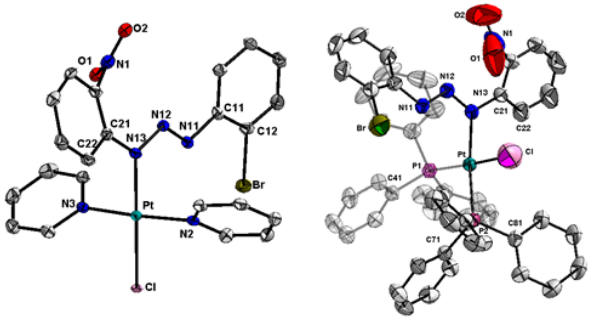

Figura 3 - Projeção estrutural dos complexos C1 e C2. Elipsoides térmicos com nível de probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio omitidos para melhor visualização.

Pbca (n° 61 – *International Tables for crystallography*). A figura 3 $[PtCl(BrC_6H_4NNNC_6H_4NO_2)(C_5H_5N)_2]$ C1 e $\{Pt(BrC_6H_4NNNC_6H_4NO_2)[P(C_6H_5)3]_2Cl\}$ C2 representam as moléculas dos complexos com os átomos representados na forma de elipsoides térmicos com suas respectivas simbologias.

As estruturas cristalinas dos complexos C1 e C2 são constituídas de moléculas mononucleares neutras de platina(II), acêntricas, e os centros metálicos

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	$C_{22}H_{18}N_6O_2ClBrPt$	$C_{48}N_4O_2P_2BrClPt$
Massa molecular (g)	708,87	1075,21
Cor / Forma	Alaranjado / Prisma	Vermelho / Prisma 0,29X 0,21 X 0,20
Dimensões (mm)	0,14 X 0,22 X 0,29	
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Monoclínico
Grupo Espacial	*Pbca* (n°. 61)[a]	P21/n (n°.14)[a]
Parâmetros de Cela Unitária	a = 8,94940(10) Å b = 16,9408(2) Å c = 30,4514(4) Å α = 90° β = 90° γ = 90°	a = 13,8340(9) Å b = 28,3176(18) Å c = 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
F(000)	2704	2120
Comprimento de onda / Radiação	0,71073 Å / Mo-K_α	0,71073 Å / Mo-K_α
Coeficiente de absorção	7,958 mm^{-1}	3,830 mm^{-1}
Região angular de varredura angular ɵ	2,40 a 27,14°	1,44 a 29,66°
Região dos índices	$-10 \leq h \leq 11$ $-21 \leq k \leq 21$ $-39 \leq l \leq 39$	$-18 \leq h \leq 19$ $-39 \leq k \leq 39$ $-19 \leq l \leq 19$
Solução da Estrutura	Métodos Diretos (SIR-2004)	Métodos Diretos (SIR-2004)
Refinamento da Estrutura	SHELXL-97	SHELXL-97
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>2σ(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];

apresentam geometria quadrática distorcida. O complexo C1 é constituído por um íon triazenido assimétrico [$BrC_6H_4NNNC_6H_4(NO_2)$]- [Pt–N13 = 2,070(5) Å], um átomo de cloro [Pt–Cl = 2,238(4) Å] e duas moléculas neutras de trifenilfosfina [Pt–P1 = 2,249(16) e Pt–P2 = 2,270(16) Å] apresentando ângulos próximos a 90° [N13–Pt–Cl = 84,12(18); N13–Pt–P1 = 93,35(16); P2–Pt–Cl = 84,43(10) e P1–Pt–P2 = 98,11(6)]. O composto C2 é constituído por um íon triazenido assimétrico [$BrC_6H_4NNNC_6H_4(NO_2)$]- [Pt–N13 = 2,018(3) Å] um átomo de cloro [Pt–Cl = 2,335(9) Å] e duas moléculas neutras de piridina [Pt–N2 = 2,024(4) e Pt–N3 = 2,011(4) Å], apresentando ângulos [N13–Pt–N3 = 88,91(14); N13–Pt–N2 = 89,25(14); N3–Pt–Cl = 91,66(10) e N2–Pt–Cl = 90,34(10)°].

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 micro-organismos 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 eram 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°± 2°C. A atividade antibacteriana do composto foi realizada utilizando o método convencional da microdiluição em caldo, através da técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), baseado no documento *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os compostos estudados foram diluídos em etanol e água até as concentrações de trabalho desejadas: 128 microgramas por mililitro (µg/mL), 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25µg/mL. O inóculo bacteriano foi preparado utilizando a escala de 0,5 de *McFarland* 1-2 x 108 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) diluída em solução fisiológica, de maneira que em cada poço contivesse 5 x 10^{-5} UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 35°± 2°C e após esse período a CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos micro-organismos 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 mielóide aguda (LMA), que se caracteriza por uma proliferação de células imaturas da linhagem mielóide e outro com leucemia

mielóide 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 (CO_2).

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 24 h a 37°C e 5% CO_2. A cultura controle foi realizada contendo células leucêmicas na ausência dos compostos. Após 20 h, cada poço foi tratado com 10 microlitros (µL) de solução salina 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 absorbâncias a 570 nanômetros (nm) utilizando um leitor de microplacas (Fisher Bio-Tek BT2000). A porcentagem de sobrevivência celular e a concentração que reduz em 50% a viabilidade celular (IC50) foram calculadas para cada composto.

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 as 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)

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)](ditrifenilfosfina)(cloro) platina(II)}. P2: amostra de paciente com LMC.

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

Em relação às cepas ATCC, o composto C1 apresentou atividade para *E. faecalis* 51299 e *S. saprophyticus* 15305 com CIM de 64µg/mL. Já o *E. faecalis* 29212 demonstrou pronunciada atividade com CIM de 16µg/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 64µg/mL para todos esses micro-organismos.

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

Quanto as 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 as 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.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que ambos os complexos triazenídos, C1 e C2, foram ativos frente aos micro-organismos 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 peptideoglicano, 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 triazenídos 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 micro-organismos 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 *mec*A e *ica*D positivo (produtor de biofilme), e possuem sensibilidade somente a vancomicina, clindamicina, tigeciclina e teicoplamina. 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 em nossa 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 fita dupla (Domingues et al., 2010).

Dessa forma, C1 foi o composto com maior atividade, visto que esteve ativo em 4 das 5 bactérias com crescimento inibido, também se destacou na indução da morte celular, tendo resultado superior a 75% na maior concentração testada (100 μM). 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.

ABSTRACT

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

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: Triazenes. Cytotoxicity. Antibacterial Activity. Platinum.

REFERÊNCIAS

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

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 FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. J Inorg Biochem. 2010;104:1214-1223.

HAHN, T. ; *International Tables for crystallography*, Vol. A Space-Group Symetry, 2a Ed. ; The International Unio of Crystallography, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1987.

Hemorio. Protocolos de enfermagem-Administração de quimioterapia antineoplásica no tratamento de hemopatias malignas. 1ª 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, G. M.; SADABS, Program for Empirical Absorption Cor¬rection of Area Detector Data, Universidade de Göttingen, Alemanha, 1996.

Sheldrick, G. M.; SHELXL-97; Program for Crystal Structure Refine¬ment, 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 triphenylphosphanegold(O-alkylthiocarbamates), Ph3PAu[SC(OR)=N(p-tolyl)] (R=Me, Et and iPr). Gold Bull. 2013;46:145-152. DOI:10.1007/s13404-013-0091-z.

Zhou Y, Sun Z, Froelich JM, Hermann T, Wall D. et al. Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors: 3,5-diamino-piperidinyl triazenes. 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 derivates: 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 T C, 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.

Recebido em 19 de dezembro de 2013

Aceito em 14 de abril de 2014