



# NOVOS ESTUDOS SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA E DE INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS DE COMPLEXOS DE Ag(I) COM SULFATIAZOL E SULFAMETOXAZOL

**Palavras-Chave:** Complexos metálicos, Prata, Sulfonamidas, Atividade antiproliferativa

**Autores(as):**

**Francisco Mastrobuono Cordeiro de Almeida, IQ-UNICAMP**

**Profa. Dra. Ana Lucia Tasca G. Ruiz, FCF-UNICAMP**

**Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, FCF-UNICAMP**

**Prof. Dr Pedro Paulo Corbi (orientador), IQ-UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

Atualmente, a procura por novos metalofármacos com propriedades biológicas vem se tornando parte fundamental no desenvolvimento de fármacos. Um dos primeiros complexos metálicos descobertos (1844)<sup>[1]</sup> e utilizados foi a cisplatina, cuja atividade antitumoral foi testada nos anos 1970 e liberada para uso clínico pela FDA (departamento de análises de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos) apenas em 1978<sup>[2]</sup>. A partir desta descoberta, muitos outros metais vêm sendo estudados na síntese de complexos bioativos, como por exemplo, a prata cujo complexo de maior destaque é a sulfadiazina de prata sintetizada nos anos 1960<sup>[3]</sup>. Recentemente, algumas propriedades interessantes envolvendo os complexos de prata foram descobertas, como atividades antitumorais<sup>[4]</sup>. Dois desses complexos de prata foram recentemente sintetizados e estudados pelo nosso grupo de pesquisa: prata-sulfatiazol (Ag-SFT) e prata-sulfametoxazol (Ag-SFM)<sup>[5]</sup>. Nos estudos iniciais, os complexos foram caracterizados e avaliados somente quanto as suas atividades antibacterianas. Desta forma, este projeto tem como objetivo a reparação destes dois complexos de prata e a continuidade dos estudos de suas propriedades biológicas, com ênfase na ação dos complexos sobre um painel de células tumorais.

## METODOLOGIA:

### I. Reagentes

Os reagentes sulfatiazol, sulfametoxazol, hidróxido de potássio e nitrato de prata são disponíveis comercialmente e foram adquiridos dos laboratórios Sigma-Aldrich/Merck e Acros Organics.

### II. Síntese dos Complexos

A síntese dos complexos foi realizada segundo descrito na literatura por Nunes et al [5]. Resumidamente, a síntese do complexo Ag-SFT foi efetuada sob agitação em temperatura ambiente, pela reação de uma solução

aquosa contendo sulfatiazol (SFT) e hidróxido de potássio (KOH) com uma solução aquosa de nitrato de prata. A síntese de Ag-SFM, por sua vez, foi feita pela reação da solução aquosa de sulfametoxazol e KOH com solução de nitrato de prata sob agitação constante à temperatura ambiente. Os complexos obtidos foram separados por filtração, secos e encaminhados para caracterização.

### III. Caracterização dos complexos: análises químicas e espectroscópicas

Os complexos foram caracterizados por um conjunto de técnicas analíticas, tais como análise elementar, espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS) e análise térmica.

### IV. Ensaios de atividade antiproliferativa sobre células tumorais

Os ensaios de atividade dos ligantes e complexos foram realizados sobre linhagens celulares de câncer humano: U251 (glioma, CNS), MCF-7 (mama), NCI-ADR/Res (adenocarcinoma ovariano com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos). As linhagens não-tumorais de células imortalizadas HaCat (queratinócito humano) e 3T3 (fibroblastos embrionários murinos) foram utilizadas para avaliação de seletividade. Em resumo, soluções estoque das culturas foram adicionadas em 5,0 mL de meio RPMI-1640 suplementada com 5% de soro fetal bovino (RPMI/FBS 5%). Soluções-estoque dos compostos de interesse foram diluídas em RPMI/FBS 5% e então sucessivamente diluídas em RPMI/FBS 5%, até atingir as concentrações finais de interesse. As células, em microplacas de 96 poços, (100 µL de células por poço) foram expostas a diferentes concentrações de amostras e controles (100 µL por poço). Os ensaios foram feitos em triplicata, por 48 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Antes (placa T0) e depois (placa T1) da adição das amostras, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e submetidas ao ensaio de sulforrodamina B para quantificação da proliferação celular em 540 nm. O valor de GI50 (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi determinado por regressão não-linear, tipo sigmoide, utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Estes estudos foram conduzidos pelo candidato em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os complexos metálicos Ag-SFT e Ag-SFM, preparados segundo procedimento descrito acima, foram caracterizados através de diversas técnicas diferentes. A primeira caracterização realizada foi por espectroscopia no infravermelho. Os espectros com as principais bandas destacadas, são representados nas figuras 1 e 2. Os resultados obtidos estão em concordância com a literatura.

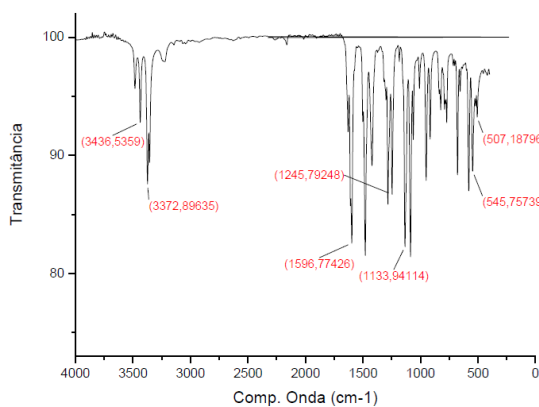


Figura 2: FTIR do complexo Ag-SFM

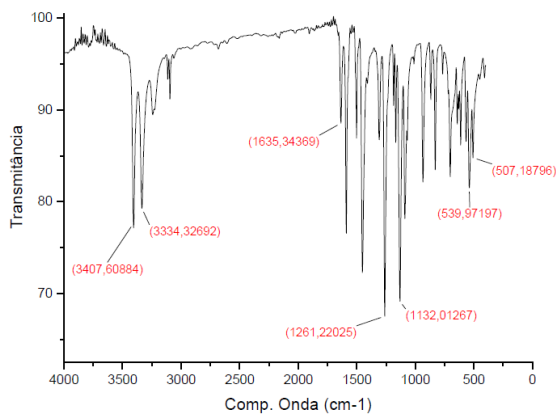


Figura 2: FTIR do complexo Ag-SFT

A próxima técnica que foi utilizada foi a de ressonância magnética nuclear (RMN) para caracterização dos complexos metálicos. As análises por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram realizadas e comparadas com a literatura. Aqui, no entanto, será apresentada apenas a técnica de acoplamento  $\{^{13}\text{C}, ^1\text{H}\}$  a uma ligação para confirmação das atribuições dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos complexos. Como solvente foi utilizado o  $\text{DMSO-D}_6$ , por ser o único que solubiliza os complexos estudados.

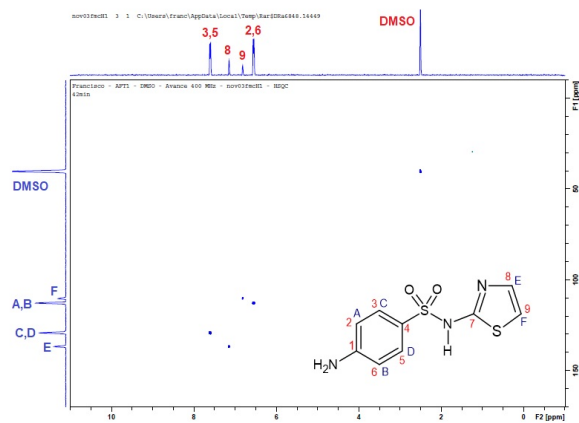


Figura 3: RMN de acoplamento para o complexo Ag-SFT

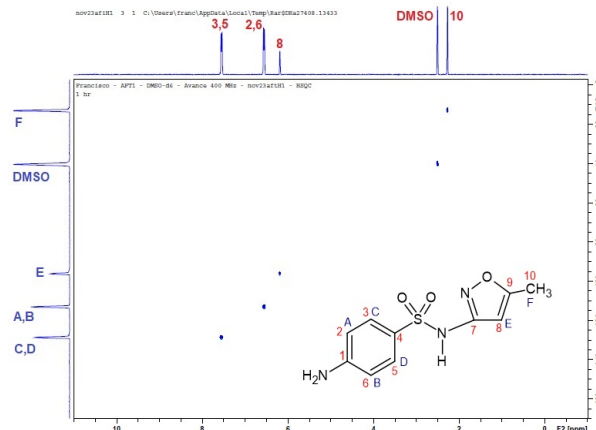


Figura 4: RMN de acoplamento para o complexo Ag-SFM

Nos mapas de correlação acima, os hidrogênios das moléculas foram representados por números (1-10) em vermelho, enquanto os átomos de carbono foram identificados por letras (A-F) em azul. Tal diferenciação foi feita para um melhor entendimento de cada sinal apresentado.

O próximo processo de caracterização que foi realizado foi o da análise térmica, o qual permite determinar a perda de massa dos complexos em função de um aquecimento controlado, ou seja, sua estabilidade térmica. Assim, condições experimentais podem ser adaptadas para não ocorrer a degradação dos complexos.

A partir da análise desses espectros, percebe-se que o complexo Ag-SFM inicia seu processo de perda de massa em temperaturas abaixo do complexo Ag-SFT, ou seja, uma menor estabilidade inicial. Porém, a estabilidade do Ag-SFM é maior quanto a variação da temperatura, pois a perda total do ligante só ocorre em temperaturas acima de  $800^\circ\text{C}$ , ao contrário do que acontece no Ag-SFT, cuja perda total é em cerca de  $650^\circ\text{C}$ .

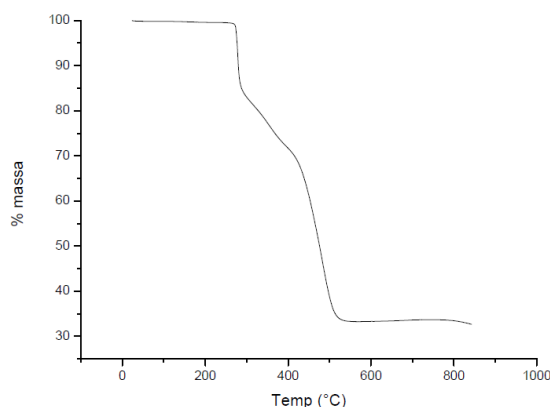


Figura 5: Análise Térmica do complexo Ag-SFT

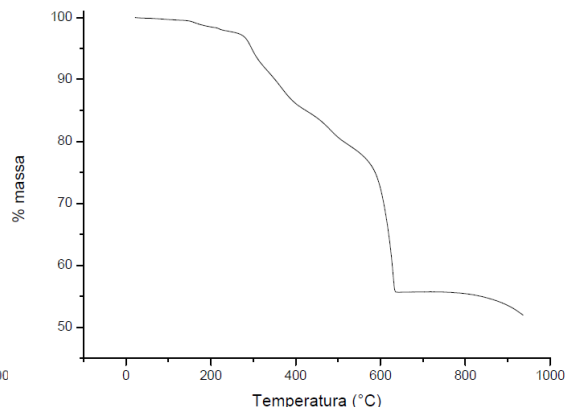


Figura 6: Análise Térmica do complexo Ag-SFM

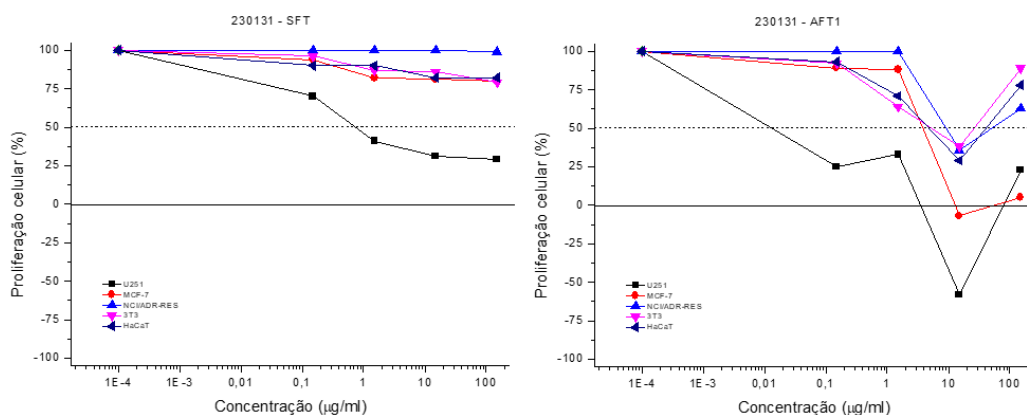


Figura 7: Ensaios biológicos com linhagens celulares para o ligante sulfatiazol (SFT) à esquerda e o complexo à direita (AFT1).

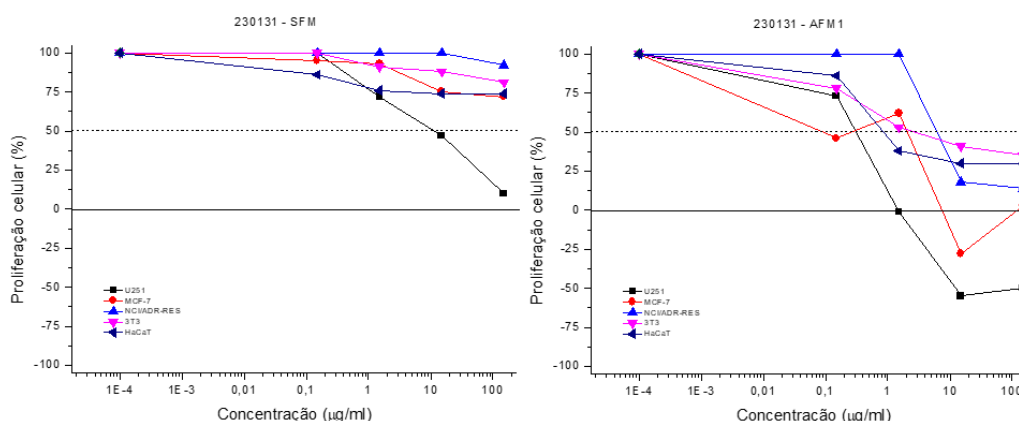


Figura 8: Ensaios biológicos com linhagens celulares para o ligante sulfametoxazol (SFM) à esquerda e o complexo Ag-SFM à direita (AFM1).

Os resultados mais promissores, no entanto, se referem à análise de atividade antiproliferativa dos complexos sobre um painel de células tumorais. Os resultados foram muito interessantes para os complexos metálicos quando comparado à compostos já utilizados na indústria farmacêutica, como por exemplo a cisplatina. As células tumorais que foram utilizadas no experimento estão descritas na aba de Metodologia. O controle positivo utilizado foi a doxorrubicina na concentração de 0,015 a 15 µg/mL, e as concentrações das amostras testadas na faixa de 0,15 a 150 µg/mL. Nas próximas figuras, serão apresentados os gráficos dos resultados das análises celulares, comparando-se os ligantes livres com os complexos metálicos de prata.

Comparando os complexos de prata com seus respectivos ligantes, observa-se que os complexos possuem uma ação muito mais pronunciada que os ligantes em todas as linhagens tumorais. Esta constatação permite inferir que a presença da prata foi responsável pela atividade para todas as linhagens. Em todos os testes, percebe-se que a linhagem de glioma U251 é a mais sensível para a presença destes compostos, seguida da linhagem MCF-7 referente ao adenocarcinoma de mama.

A seguir, na tabela 1, serão apresentados os valores de  $GI_{50}$  (concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular) dos ligantes isolados, dos complexos e de compostos já utilizados na indústria farmacêutica como medicamentos.

	U251	MCF-7	NCI-ADR/Res	3T3	HaCaT
Doxo	<0,015	0,41	1,9	15	0,54
Cis-platina	2,3	0,21	68,4	16,2	11,6
AFT1	<0,15	1,8	14,2	5,5	4,7
AFM1	0,17	0,31	8,7	5,9	2,1
SFT	1,2	>150	>150	>150	>150
SFM	9,5	>150	>150	>150	>150
AgNO <sub>3</sub>	0,59	2,4	3,5	23,1	6,8

*Tabela 1: Valores de GI<sub>50</sub> (µg/ml) de todos os compostos analisados em todas as linhagens celulares (tumorais e não-tumorais)*

Com a análise dos valores de GI<sub>50</sub> apresentados na tabela 1, fica evidente que os complexos Ag-SFT e Ag-SFM sintetizados possuem atividades semelhantes à da cisplatina utilizada na clínica.

O complexo Ag-SFT apresentou um valor de GI<sub>50</sub> menor que 0,15 µg/mL para a linhagem de glioma U251, sendo menor do que aquele encontrado para a cisplatina. Para as linhagens não-tumorais 3T3 e HaCat, os valores foram de 5,5 e 4,7 µg/mL. Estes dados permitem calcular o índice de seletividade do composto frente às células U251. Este índice pode ser obtido dividindo-se o valor de GI<sub>50</sub> encontrado para a célula não tumoral pelo valor de GI<sub>50</sub> encontrado para a célula tumoral (no caso a U251). No caso do complexo Ag-SFT, este valor foi de 37 considerando as células 3T3 e 31 para as células HaCat. Ou seja, o composto é bastante seletivo para as células tumorais U251 quando comparado à linhagens não tumorais. Estes resultados são promissores e novos ensaios devem ser conduzidos para confirmar esta seletividade.

O complexo Ag-SFM, por sua vez, apresentou excelentes resultados em ambas as linhagens tumorais U251 e MCF-7, com valores de GI<sub>50</sub> menores que 0,4 µg/mL e também com bons índices de seletividade.

## CONCLUSÕES:

Ao final do projeto de pesquisa, foi possível completar todos os objetivos estabelecidos, desde a reparação e caracterização dos complexos Ag-SFT e Ag-SFM, até a realização dos ensaios de atividade antiproliferativa sobre células tumorais e não tumorais. Os resultados mais promissores foram resultantes dos ensaios antiproliferativos, os quais indicam uma ótima seletividade e valores de GI<sub>50</sub> dos complexos metálicos para com as linhagens, principalmente a de glioma U251 e mamária MCF-7.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Peyrone, Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür, Ann. Chem. Pharm. 51 (1844) 1–29, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/cber.187701001122>.
- [2] S. Dasari, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, Eur.J.Pharmacol. 740 (2014) 364–378, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [3] Azócar, M.I., Gómez, G., Levín, P., Paez, M., Muñoz, H., Dinamarca, N. Review: Antibacterial behavior of carboxylate silver(I) complexes. Journal of Coordination Chemistry 67, (2014) 3840–3853. doi:10.1080/00958972.2014.974582.
- [4] Liang, X., Luan, S., Yin, Z., He, M., He, C., Yin, L., Zou, Y., Yuan, Z., Li, L., Song, X., Lv, C., Zhang, W. Recent advances in the medical use of silver complex. European Journal of Medicinal Chemistry 157, (2018) 62–80. doi:10.1016/j.ejmech.2018.07.057.
- [5] Bormio Nunes, J.H., De Paiva, R.E.F., Cuin, A., Lustrì, W.R., Corbi, P.P. Silver complexes with sulfathiazole and sulfamethoxazole: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antibacterial assays. Polyhedron 85, (2015) 437–444. doi:10.1016/j.poly.2014.09.010.