



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

WILLIAN CHARLES DA SILVA MOURA

**ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL AÇÃO ANTITUMORAL**

CAMPINA GRANDE

2019

Willian Charles da Silva Moura

**ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
ACRIDÍNICOS COM POSSÍVEL AÇÃO ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e
medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de
Moura

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M929e Moura, Willian Charles da Silva.
Estudo *in silico*, síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados acridínicos com possível ação antitumoral [manuscrito] / Willian Charles da Silva Moura. -2019.
145 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura , Departamento de Farmácia - CCBS."
1. Quimioterápicos. 2. Atividade antitumoral. 3. Triazole. 4. Tumores sólidos. 5. Interação DNA-ligante. I. Título
21. ed. CDD 615.58

WILLIAN CHARLES DA SILVA MOURA

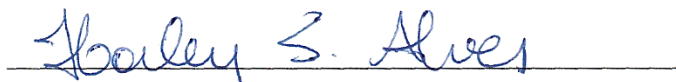
**ESTUDO *IN SILICO*, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL AÇÃO ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovado em: 12 / 02 / 19



Prof^o Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba
Orientador



Prof^o Dr. Harley da Silva Alves
Universidade Estadual da Paraíba
Avaliador



Prof^o Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Avaliador

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor Deus, que me concedeu a dávida
da vida e de concretizar este sonho.

Ao meu Orientador e amigo, Ricardo Olimpio de
Moura, a meus pais Charles e Eurides, meu irmão
Wandson, minha esposa Alda e filho Heitor.

Obrigado pelo apoio, carinho e compreensão.

Essa vitória não é só minha, é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a meu grandioso Deus que iluminou meu caminho durante toda esta longa caminhada;

À minha mãe Eurides Moura, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, me encorajando, lutando e vencendo todas as barreiras que surgiam durante a minha vida acadêmica.

Ao meu pai Charles Moura e a minha mãe, Eurides Moura, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceram e que para mim, foi essencial seu apoio e sua perseverança.

Obrigado meu irmão Wandson Charles, que por muitos anos conviveu comigo longe de nossos pais e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

A minha esposa, companheira e amante, Alda Moura, a qual me levantou todas as vezes em que estive ao chão, que me fez sorrir todas as vezes em que estava aos prantos e que sempre esteve ao meu lado apoiando e me erguendo diante das dificuldades.

Ao meu filho, Heitor Moura, que sempre está me fazendo rir quando mais estou triste, me ensinando o que é ser “Pai” e que amor de filho não há igual. Certamente o seu nascimento é, e sempre será, a maior de todas as vitórias que tive nessa vida, pois hoje eu tenho uma família completa e esse sentimento é o combustível para que eu possa dar sequência, com maior convicção, na minha vida acadêmica e profissional.

Meus agradecimentos aos amigos e amigas do “LDSF”, em especial ao grande amigo Gleyton Leonel, companheiro de muitos trabalhos e irmão na amizade fazendo parte da minha formação e que irá continuar presente em minha vida com toda certeza.

Ao orientador, professor e, principalmente, amigo Ricardo Olimpio de Moura pela orientação, apoio e confiança, assim como pela dedicação e ensinamentos que adquiri nos últimos anos através de sua pessoa, me conduzindo pelos caminhos das incertezas e descobertas que um pesquisador enfrenta diariamente, pois um homem que sabe o que quer já percorreu um longo caminho para alcançá-lo.

Por fim, agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto, que se dedicaram a mim não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais, sem nominar, terão os meus eternos agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Na busca de novas quimioterápicos, a síntese de compostos contendo grupos aromáticos e regiões planares, como derivados de acridina, é uma alternativa simples e econômica e por isto, essas moléculas estão sendo amplamente estudadas como possíveis quimioterápicos. O objetivo deste trabalho foi sintetizar novos derivados acridínicos, elucidar suas estruturas e avaliar o potencial antitumoral *in silico* e *in vitro*. A síntese dos compostos ocorreu de forma linear sendo sintetizado inicialmente os intermediários carbotoiâmídicos, seguidos de uma reação de acoplamento com a 9-cloroacridina para obtenção dos compostos finais. As estruturas moleculares foram submetidas a técnicas de minimização molecular (MM2) e analisadas por *docking* molecular para verificar, inicialmente, a interação com a TopoII α /DNA (5GWK) e B-DNA (1BNA), sendo posteriormente realizado o ancoramento com mais duas enzimas, Bcl-2 (4AQ3) e BSA (4OR0). Foram realizados testes *in vitro* para avaliar a interação com ctDNA e BSA, e atividade antiproliferativa frente as linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HCT 116 (câncer de cólon). Também foram feitos estudos de predição de alvos e estudos farmacocinéticos através do servidor SwissADME. Foram realizadas sínteses com variação das condições reacionais para verificação da obtenção de produto diferente do obtido e para otimização da rota sintética, sendo adotado um planejamento fatorial 2³ com repetição no melhor resultado obtendo 09 experimentos, o qual se conseguiu melhor rendimento através do experimento com solvente Propanol, com temperatura de 0 °C e ausência de catalisador. Os estudos de ADME demonstraram que o ACW-01B apresentou alta absorção gastrointestinal. Em relação ao *docking* molecular o composto ACW-02B foi o que apresentou melhor interação para as enzimas testadas, exceto para a Bcl-2, enzima presente no câncer de mama, a qual o ACW-01B foi o que apresentou maior interação (-7,27 kcal mol⁻¹). Nos estudos *in silico* de interação com DNA o ACW-02B apresentou melhor resultado de interação (1,17 x 10⁶), contudo o mesmo composto apresentou hipercromicidade indicando que a interação não ocorre por intercalação. Já nos testes *in silico* de interação com a BSA, o ACW-01B foi o composto que apresentou melhores resultados com K_{sv} de 8,4 x 10⁴, além de apresentar 61% de efeito hipocrômico. Nos testes de atividade antiproliferativa o ACW-01B foi o composto mais ativo, exceto para a linhagem MCF-7 a qual não foi possível realizar a leitura devido a coloração avermelhada intensa do composto citado, e desta forma, foram obtidos 2 derivados triazolidínicos acridínicos os quais foram submetidos ao *docking* molecular onde os compostos apresentaram interações consideráveis com destaque para o ACW-01B frente a enzima Bcl-2, o qual se destacou em relação ao ACW-02B, corroborando com os testes *in vitro* com linhagens para tumor sólido como o observado no teste com HCT 116 (câncer de cólon).

Palavras-chave: Triazole. Interação DNA-ligante. Interação BSA-complexo. Tumores sólidos.

ABSTRACT

In the search for new chemotherapeutics, the synthesis of compounds containing aromatic groups and planar regions, such as acridine derivatives, is a simple and economical alternative and therefore, these molecules are being widely studied as possible chemotherapeutics. The objective of this work was to synthesize new acridine derivatives, to elucidate their structures and to evaluate the antitumor potential *in silico* and *in vitro*. The synthesis of the compounds occurred linearly and the carbothioamide intermediates were synthesized initially, followed by a coupling reaction with 9-chloroacridine to obtain the final compounds. Molecular structures were submitted to molecular minimization techniques (MM2) and analyzed by molecular docking to initially verify the interaction with TopoII α /DNA (5GWK) and B-DNA (1BNA), after which the anchoring with two more enzymes, Bcl-2 (4AQ3) and BSA (4OR0). *In vitro* tests were performed to evaluate the interaction with ctDNA and BSA, and antiproliferative activity against MCF-7 (breast cancer), HL-60 (acute promyelocytic leukemia) and HCT 116 (colon cancer) cell lines. Target prediction studies and pharmacokinetic studies were also conducted through the SwissADME server. Synthesis was carried out with variation of the reaction conditions to verify the obtaining of product different from the one obtained and to optimize the synthetic route, being adopted a factorial design 2³ with repetition in the best result obtaining 09 experiments, which was obtained better through the experiment with solvent Propanol, with a temperature of 0 °C and absence of catalyst. ADME studies demonstrated that ACW-01B showed high gastrointestinal absorption. In relation to molecular docking, ACW-02B was the one that presented the best interaction for the enzymes tested, except for Bcl-2, an enzyme present in breast cancer, which ACW-01B showed the highest interaction (-7.27 kcal mol⁻¹). In *in silico* DNA interaction studies ACW-02B presented better interaction result (1.17 x 10⁶), however the same compound showed hyperchromicity indicating that the interaction does not occur by intercalation. In the *in silico* tests of interaction with the BSA, the ACW-01B was the compound that presented the best results with K_{sv} of 8.4 x 10⁴, besides presenting 61% hypochromic effect. In the antiproliferative activity tests ACW-01B was the most active compound, except for the MCF-7 strain which could not be read due to the intense reddish coloration of the compound mentioned, and in this way 2 acridine triazolidinic derivatives were obtained which were submitted to molecular docking where the compounds presented considerable interactions with emphasis on ACW-01B against Bcl-2 enzyme, which stood out in relation to ACW-02B, corroborating with *in vitro* tests with solid tumor cell lines such as observed in the HCT 116 (colon cancer) test.

Keywords: Triazole. Drug-DNA binding. BSA-complex binding. Solid tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caminho percorrido do agente cancerígeno até atingir os órgãos	19
Figura 2 - Gêneses de novos fármacos	22
Figura 3 - Porcentagens de nitração da acridina.....	24
Figura 4 - Estruturas químicas dos compostos 3a e 3f sintetizados por Almeida et al.	24
Figura 5 - Derivados acridínicos sintetizados.....	25
Figura 6 - Derivado 9-aminoacridínico	26
Figura 7 - Estrutura molecular dos derivados 9-acridinil-tiosemicarbazidas	27
Figura 8 - Estrutura da quinacrina e pironaridina.....	28
Figura 9 - Estrutura molecular 9-(6-amônioetilamino)-6-cloro-2-metoxi-acridina-dicloride ..	29
Figura 10 - Estrutura molecular do composto 3e	29
Figura 11 - Estrutura molecular do derivado acridínico 7n.....	30
Figura 12 - Estrutura molecular base dos compostos acridínicos conjugados 4a-e	31
Figura 13 - Estrutura molecular das séries 2a-e e 3a-e.....	32
Figura 14 - Estruturas dos derivados imidazólicos de acridina examinados quanto ao efeito na agregação anti-TDP-43	33
Figura 15 – Fármacos derivados do núcleo triazól.....	34
Figura 16 - Estrutura cristalográfica da Topo II α	36
Figura 17 - Inibidores de Topo II α : Etoposídeo (1), Amsacrina (2) e Doxorubicina (3).....	37
Figura 18 - Estrutura cristalográfica da BCL-2 complexada com o inibidor fenilacilsulfonamida.	38
Figura 19 - Estrutura cristalográfica da Albumina de Soro Bovino (BSA).....	40
Figura 20 - Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA	41
Figura 21 - Estruturas dos ligantes intercaladores clássicos.....	42
Figura 22 - Estrutura do núcleo principal dos derivados de acridina-tiosemicarbazidas e seus substituintes (R).	42
Figura 23 - Ilustração esquemática do docking molecular de um ligante com um alvo de proteína produzindo um complexo estável.	43
Figura 24 - Energias que influenciam na conformação das moléculas.	46
Figura 25 - Estrutura molecular da Amsacrina.....	50
Figura 26 - Derivados carbotiamídicos acridínicos idealizados	50
Figura 27 - Redocking do Etoposídeo.	61
Figura 28 - Docking do ACW-06A (A) e Amsacrina (B) com o complexo TopoII/DNA.....	64

Figura 29 - Interação dos compostos ACW-04 (A) e ACW-06 (B) com o B-DNA	65
Figura 30 - Interação entre o ACW-02A e o B-DNA.....	65
Figura 31 - Estrutura molecular do ACW-01B	66
Figura 32 - Infravermelho (IV) do ACW-01B.	67
Figura 33 - Espectro de massas ampliado do ACW-01B por MALD-TOF	68
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹ H do ACW-01B (300 MHz, DMSO-d ₆).....	69
Figura 35 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula de acridona	70
Figura 36 - Espectro de RMN de ¹³ C do ACW-01B (75 MHz, DMSO-d ₆)	71
Figura 37 - RMN de ¹³ C, técnica APT, da acridona.....	72
Figura 38 - Estrutura molecular do ACW-02B	72
Figura 39 - Infravermelho do ACW-02B	73
Figura 40 - Espectro de Massas por MALDI-TOF do ACW-02B	74
Figura 41 - Espectro de massas por ESI do ACW-02B.....	75
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹ H do ACW-02.....	76
Figura 43 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do ACW-02B (500 MHz)	77
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT Q) do ACW-02B (125 MHz, DMSO-d ₆)	78
Figura 45 - Ampliação RMN de ¹³ C (DEPT Q) do ACW-02B (125 MHz, DMSO-d ₆).....	78
Figura 46 - Conformação ativa do ACW-01A (amarelo, A) interagindo com a Topo II α (5GWK) e conformação de menor energia (B) fora da enzima.....	88
Figura 47 - Ilustração 2D das interações entre os ligantes e a Topo II α , tendo como ligantes o ACW-01A (A) e o Etoposídeo (B).	89
Figura 48 - Ilustração 2D das interações entre os ligantes e a Topo II α , tendo como ligantes o ACW-01B (A) e o ACW-01A (B).	89
Figura 49 - Amsacrina e suas interações com a Topo II α e o DNA.....	90
Figura 50 - ACW-01A ilustrando suas interações com o B-DNA (1BNA)	91
Figura 51 -Amsacrina ilustrando suas interações com o B-DNA (1BNA)	91
Figura 52 - Interações entre os ligantes e a enzima Bcl-2 (4AQ3), tendo como ligantes o ACW-01A (A) e a fenilacilsulfonamida (B).	92
Figura 53 - Interação do ACW-01B (A) e ACW-01A (B) com a enzima Bcl-2.....	93
Figura 54 - Interação do ACW-01B (A) e ACW-02B (B) com a enzima BSA	94
Figura 55 - Docking molecular entre o composto ACW-02B e o 1BNA com interação entre as bases nitrogenadas do DNA.....	96
Figura 56 - Interação entre o composto ACW-01B (A) e ACW-02B (B) com o DNA	97
Figura 57 - Modelo Boiled-Egg dos compostos sintetizados.....	102

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Mecanismo de Substituição nucleofílica aromática em acridinas na posição 9	23
Esquema 2 - Síntese do derivado triazolidínico-2,5-diona com maior rendimento.....	35
Esquema 3 - Equação de Westheimer.....	48
Esquema 4 - Rota sintética dos derivados triazolidínicos acridínicos substituídos e isotiossemicarbazídicos acridínicos.....	54
Esquema 5 – Mecanismo reacional para obtenção dos compostos ciclizados.....	79
Esquema 6 – Rota sintética dos derivados triazolidínicos acridínicos substituídos a partir da ciclização dos intermediários <i>N</i> -fenilidrazina-carbotioamida acridínicos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes condições reacionais para melhoramento da rota sintética com a finalidade de obter melhores rendimentos	56
Tabela 2 - Variáveis independentes no planejamento experimental 2 ³	57
Tabela 3 - Valores do redocking das enzimas Topoisomerase II α (5GWK) e da Bcl-2 (4AQ3)	60
Tabela 4 - Docking molecular entre as estruturas propostas, a Amsacrina (m-MSA) e a TopoII α /DNA (5GWK) e B-DNA (1BNA)	62
Tabela 5 - Valores de infravermelho do ACW-01B	67
Tabela 6 - Valores de massa calculada e obtido do ACW-01B	68
Tabela 7 – Dados de RMN de ¹ H do ACW-01B (300 MHz, DMSO-d ₆), δ (ppm), J (Hz)	69
Tabela 8 - Dados de RMN de ¹³ C do ACW-01B (75 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm), J (Hz)	71
Tabela 9 - Valores de infravermelho do ACW-02B	73
Tabela 10 - Valores de massa calculada e obtido do ACW-02B	73
Tabela 11 – Dados de RMN de ¹ H do ACW-01B (300 MHz, DMSO-d ₆), δ (ppm), J (Hz) ...	75
Tabela 12 - Dados de RMN de ¹³ C DEPT Q do ACW-02B (125 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm), J (Hz)	77
Tabela 13 - Teste de solubilidade do derivado carbotioamídico (RFT01) e 9-cloroacridina (9-Cl-acridina)	82
Tabela 14 - Reação na obtenção dos compostos referentes a série ACW-A em diferentes condições reacionais	82
Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para o modelo sugerido	83
Tabela 16 - Matriz mostrando os fatores e seus níveis nos experimentos tendo o rendimento como resposta	84
Tabela 17 - Docking molecular dos compostos com a Topo II α (PDB ID: 5GWK), BCL-2 (PDB ID: 4AQ3), DNA (PDB ID: 1BNA) e BSA (PDB ID: 4OR0)	86
Tabela 18 - Dados de absorção UV-vis dos derivados triazolidínicos acridínicos na ausência e presença de ctDNA	95
Tabela 19 - Dados de fluorescência dos derivados triazolidínicos acridínicos com BSA	99
Tabela 20 - Efeito das amostras na viabilidade das células MCF-7, HL-60 e HCT após 72 h de tratamento.	100

Tabela 21 - Dados farmacocinéticos, gerados pelo Swiss ADME, dos compostos sintetizados	103
Tabela 22 - Log P dos derivados triazolidínicos acridínicos obtidos no SwissADME.....	104
Tabela 23 - Solubilidade dos derivados triazolidínicos acridínicos através do Log S	105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de casos novos de câncer em homens no Brasil em 2018.....	20
Gráfico 2 – Número de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2018.....	20
Gráfico 3 - Energia mínima local e global obtidas, respectivamente, pelo processo de minimização e dinâmica molecular.....	47
Gráfico 4 – Efeitos padronizados de acordo com o Gráfico de Pareto.....	84
Gráfico 5 – Espectros de absorção dos derivados triazolidinicos acridínicos analisados na ausência e presença de ctDNA na concentração de 10 μM	98
Gráfico 6 - Espectros de fluorescência comparando a extinção da fluorescência de BSA na concentração de 20 μM , na presença dos derivados triazolidinicos acridínicos....	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
ADT	AutoDockTools
ANN	<i>Artificial Neural Network</i>
Bcl-2	B-cell CLL/linfoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CADD	<i>Computer-Assisted Drug Design</i>
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i>
DEPT Q	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with tention of Quaternaries</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F.F.	Faixa de Fusão
HM	Hibridação Molecular
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Log P	Coeficiente de Partição
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Rend.	Rendimento
R _f	Fator de Retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Topo II α	Topoisomerase II humana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	<i>O Câncer</i>	19
2.2	<i>A importância do planejamento no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais</i>	22
2.2.1	Derivados acridínicos	23
2.2.2.1	Atividade antitumoral	24
2.2.2.2	Atividade antibacteriana	26
2.2.2.3	Atividade antileishmania	27
2.2.2.4	Atividade antimalária.....	28
2.2.3	Derivados triazolidínicos	33
2.3	<i>Enzimas que atuam no processo de crescimento tumoral</i>.....	35
2.3.1	Topoisomerase II α	35
2.3.2	Enzima B-cell CLL/linfoma 2 (BCL-2)	38
2.3.3	Albumina de Soro Bovino (BSA).....	39
2.3.4	DNA.....	41
2.4	<i>Modelagem molecular</i>	43
2.4.1	Docking Molecular	43
2.4.2	Mecânica Molecular	45
2.4.3	Dinâmica Molecular	46
2.5	<i>Estudos farmacocinéticos in silico</i>	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	49
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	49
4	DELINEAMENTO DA PESQUISA	50
5	METODOLOGIA.....	51
5.1	<i>Docking Molecular</i>	51
5.1.1	Docking molecular de interação com Topo II α complexada com o DNA, DNA isolado Bcl-2 e BSA.....	51
5.1.2	Preparação da Enzima.....	52
5.1.3	Preparação dos Ligantes	52

5.1.4	Estudos de ancoramento molecular para validação (redocking)	53
5.2	<i>Estudos de ADME</i>	53
5.2.1	BOILLED-EGG para predição de absorção gastrointestinal e penetração da barreira hemato-encefálica	53
5.3	<i>Síntese, caracterização e comprovação estrutural dos novos compostos</i>	54
5.3.1	Procedimento geral para a síntese dos compostos referente a série ACW	55
5.3.1.2	Obtenção dos derivados acridínicos	55
5.4	<i>Diferentes procedimentos para melhoramento do rendimento dos derivados obtidos</i>	56
5.5	<i>Planejamento experimental</i>	56
5.6	<i>Estudos da interação ao DNA</i>	57
5.6.1	Espectroscopia Eletrônica de Absorção de UV/v	57
5.7	<i>Interação com BSA</i>	58
5.7.1	Espectroscopia Eletrônica de fluorescência.....	58
5.8	<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1	<i>Docking molecular</i>	60
6.1.1	Redocking	60
6.1.2	Docking moléculas das estruturas propostas	61
6.2	<i>Caracterização físico-química e elucidação estrutural dos derivados acridínicos</i>	66
6.2.1	Caracterização e comprovação estrutural do derivado 4-(acridin-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-01B)	66
6.2.2	Caracterização e comprovação estrutural do derivado 4-(6-cloro-2-metoxiacridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-02B)	72
6.3	<i>Possível mecanismo de reação para os compostos 4-(acridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-01B) e 4-(6-cloro-2-metoxiacridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-02B)</i>	79
6.4	<i>Diferentes metodologias para melhoramento da rota sintética e obtenção da estrutura proposta</i>	81
6.5	<i>Docking molecular dos derivados triazolidínicos acridínicos</i>	85
6.6	<i>Interação com DNA por propriedades absorptivas</i>	95
6.7	<i>Interação com BSA por fluorescência</i>	98
6.8	<i>Atividade antiproliferativa</i>	100
6.9	<i>Estudos de ADME</i>	101

7	CONCLUSÃO.....	106
8	PESPECTIVAS.....	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
	ANEXOS.....	119

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte que acomete a humanidade, sendo considerada uma doença genômica que surge como consequência de alterações cumulativas no DNA de células normais, que sofrem transformações se tornando malignas. A quimioterapia ainda é um dos maiores arsenais para o tratamento da doença, entretanto a alta toxicidade de muitos quimioterápicos associados a resistência de alguns tipos de câncer, tem incentivado a busca por novos *scaffolds*, dentre eles os derivados acridínicos já respaldados na literatura (KUMAR et al, 2013).

Devido a essa resistência, há uma busca por novas moléculas, dentre elas se destacam as aromáticas heterocíclicas que possuam afinidade com o DNA e suas enzimas reguladoras, constituindo um novo arsenal no combate ao câncer (LANG et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016).

Segundo o trabalho de Dobbelstein e Moll (2014), o desenvolvimento de fármacos anticâncer pode ser dividido dentro de três “épocas” ou “ondas” que emergiram sequencialmente. Primeiro, foram desenvolvidos fármacos que bloqueavam principalmente a replicação do DNA e a divisão celular. Depois, fármacos direcionados contra intermediários de vias de sinalização que contribuem para o crescimento do câncer, como por exemplo, receptores e quinases. Por último, estão sendo desenvolvidos fármacos direcionados contra a maquinaria celular que é essencial para o crescimento e sobrevivência tumoral. Esses últimos já estão disponíveis no mercado, como o inibidor de proteassoma bortezomibe (®Velcade; Millennium Pharmaceuticals) utilizado contra o mieloma múltiplo.

O núcleo acridínico vem sendo utilizado desde a Primeira Guerra Mundial, onde foram avaliadas suas atividades biológicas em infecções provocadas por bactérias, protozoários e também em modelos experimentais de câncer, o que atraiu as atenções de diversas áreas da medicina, sendo amplamente estudadas e verificadas as atividades farmacológicas que esse núcleo apresenta (BELMONT et al., 2007).

Estes derivados acridínicos apresentam uma estrutura planar como núcleo principal da molécula, caracterizados pela presença de três anéis e um ou dois grupos substituintes que são flexíveis (SÁNCHEZ, et al., 2006). A atividade biológica destes compostos também está atribuída à planaridade de suas estruturas aromáticas, o qual pode intercalar na cadeia dupla de DNA interferindo nas funções celulares (GAO, C. et al., 2010; LIU et al., 2010; JANOVEC et al., 2011).

Nota-se, portanto que os derivados acridínicos podem apresentar diversas atividades biológicas como anticâncer (ALMEIDA, et al., 2016; JANOCKOVÁ et al., 2015; KAVA; MURRAY, 2016; LI et al., 2014; MACHADO, 2016; SINGH et al., 2015; SONDHI et al., 2010; ZHANG et al., 2016), antibacteriana (MITRA et al., 2014; PALANIJARA et al., 2017; MACHADO, 2016; SILVA et al., 2014; SHAIKH et al., 2010) e ação antiparasitária (CHTITA et al., 2016; VALDÉS et al., 2011), o que torna esses núcleos e fragmentos em moléculas privilegiadas.

O DNA é o alvo farmacológico de vários fármacos usados atualmente em terapias medicinais ou em fase de investigação clínica avançada, uma vez que regula as funções celulares, a partir da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação, e sua inibição acarreta na seção do crescimento celular, fator este que é imprescindível no tratamento antitumoral.

Nota-se então que os estudos de interação de novas moléculas com o DNA são importantes para uma possível elucidação do mecanismo de ação uma vez que a interação desses compostos com a dupla fita de DNA pode interromper o processo de crescimento celular (BARRA; NETO, 2015). O mesmo ocorre com os estudos de interação com o BSA (Albumina de Soro Bovino), importante enzima de transporte muito utilizada em estudos biomiméticos, devido à sua estabilidade, disponibilidade, baixo custo e semelhança estrutural com a albumina humana (HSA) (MOREIRA, et al., 2014). Nesse contexto, esse trabalho propôs o desenvolvimento de novos derivados acridínicos acoplados a carbotiamida, com o intuito de avaliar o seu potencial antitumoral *in silico* e *in vitro*.

Uma metodologia bastante utilizada como *screening in silico* no planejamento de novos fármacos bioativos é o *Docking* molecular, o qual consegue prever as possíveis orientações entre um ligante e uma enzima ou proteína cristalográfica, bem como as possíveis interações envolvidas para simular um complexo estável. Orientação favorecida possivelmente utilizada para prever a força de conexão ou afinidade de ligação entre o ligante e a proteína, utilizando funções de pontuação (CHAUDHARY; MISHRA, 2016).

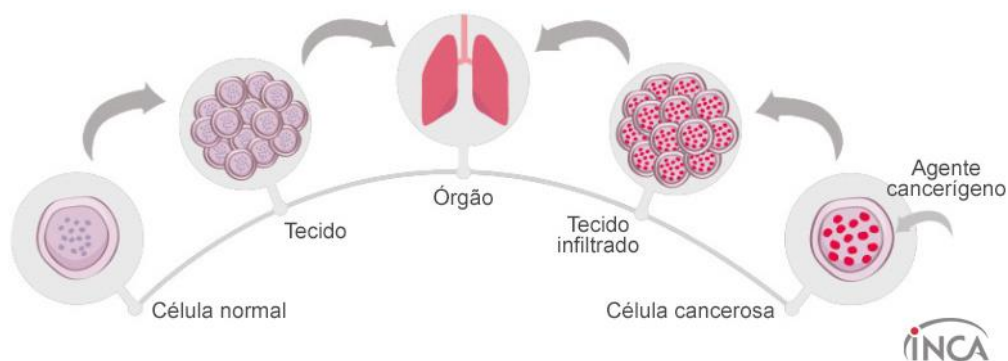
Contudo, o *docking* molecular não tem condições de prever a farmacocinética do ligante e por isso se faz necessário a utilização de ferramentas que auxiliem nesses estudos, e neste contexto, a calculadora SwissADME, ferramenta utilizada via web, é implementada como metodologia *in silico* para estudar a eficácia destes compostos no decorrer da síntese envolvendo a estimativa de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas.

Figura 1 - Caminho percorrido do agente cancerígeno até atingir os órgãos



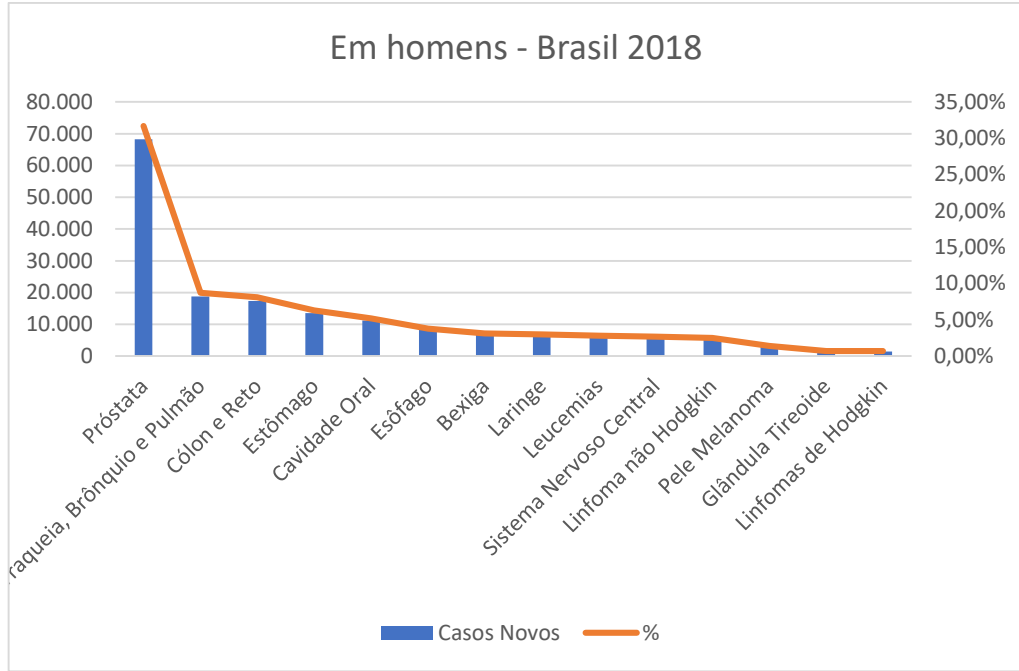
Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019

O câncer é um complexo problema de saúde pública nacional e mundial, dada sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Há uma tendência epidemiológica de aumento da mortalidade das doenças crônico degenerativas em relação a outras causas (como doenças infectocontagiosas, causas externas, etc.), destacando-se as doenças cardiovasculares em primeiro lugar, seguidas de perto pelas doenças oncológicas (YOSHINARI, et al., 2017).

A incidência, a morbidade hospitalar e a mortalidade são medidas de controle para a vigilância epidemiológica que permitem analisar a ocorrência, a distribuição e a evolução das doenças. Conhecer informações sobre o perfil dos diferentes tipos de câncer e caracterizar possíveis mudanças de cenário ao longo do tempo são elementos norteadores para ações de Vigilância do Câncer - componente estratégico para o planejamento eficiente e efetivo dos programas de prevenção e controle de câncer no Brasil. A base para a construção desses

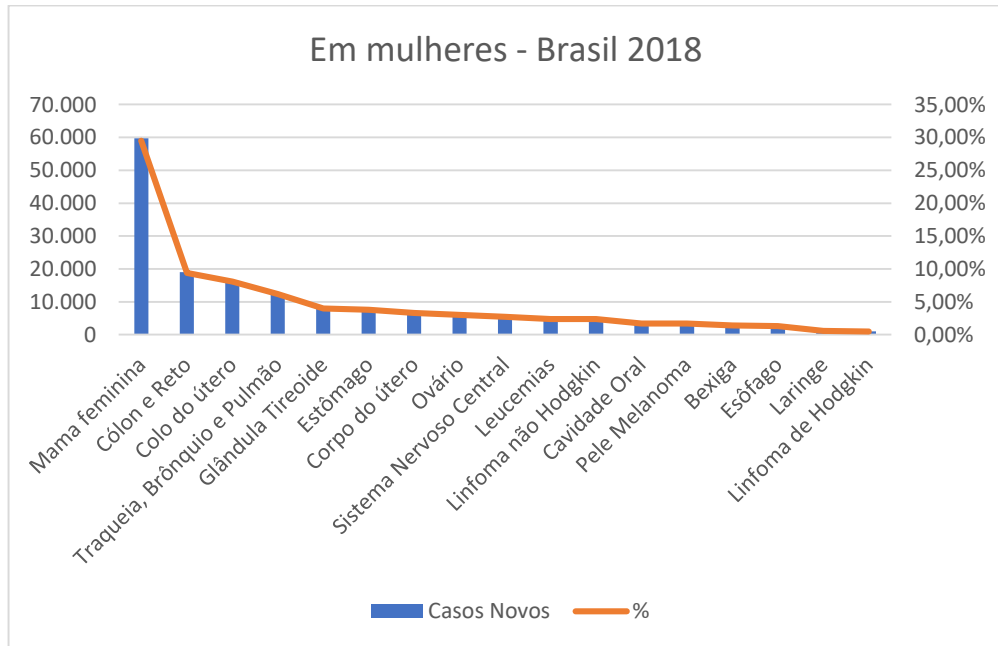
indicadores são os números provenientes, principalmente, dos Registros de Câncer e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/MS) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Gráfico 1 – Número de casos novos de câncer em homens no Brasil em 2018



Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019

Gráfico 2 – Número de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2018



Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019

A estimativa mundial mostra que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático (incluindo a China). As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo a Índia). Enquanto, nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimentos, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). Além disso, apesar da baixa incidência, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (FERLAY et al., 2013).

Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. O cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo MATHERS et al., aponta a ocorrência de 640 mil casos novos. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019)

A distribuição da incidência por região geográfica mostra que as Regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de casos novos; sendo que, na Região Sudeste, encontra-se quase a metade dessa incidência. Existe, entretanto, grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil. Nas Regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra que predominam os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de pulmão e de intestino. A Região Centro-Oeste, apesar de semelhante, incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas Regiões Norte e Nordeste, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem impacto importante nessa população. A Região Norte é a única do país onde as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero se equivalem entre as mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

2.2 A importância do planejamento no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais

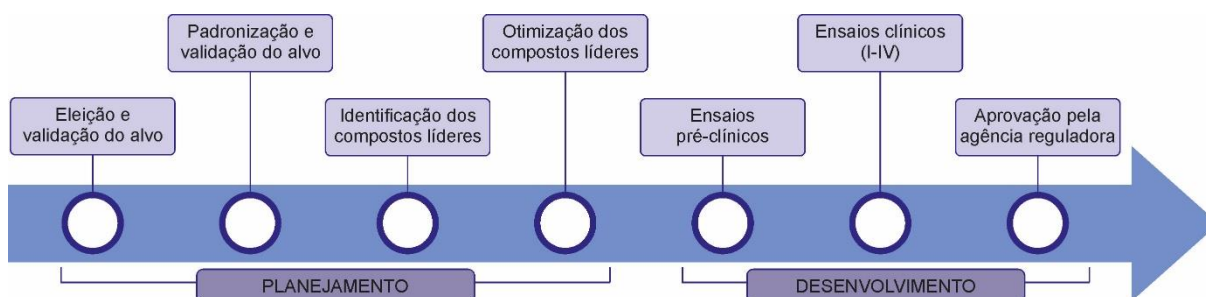
Na pesquisa para a identificação de um novo composto protótipo ou uma nova entidade química que possa se tornar um promissor candidato a fármaco, se faz necessário a aplicação e o desenvolvimento racional de técnicas de planejamento de fármacos, elegendo o melhor alvo farmacológico para a aplicação terapêutica desejada com a finalidade de se obter um ligante com potencial ação farmacológica e baixa toxicidade (GOUVEIA, 2018).

O emprego dessas técnicas está sendo bastantes utilizadas, principalmente, na obtenção de novos fármacos para doenças e situações clínicas em que os fármacos comercializados apresentam baixa ou nenhuma ação farmacológica, com destaque para o câncer, a qual adquiriu resistências a grande maioria dos fármacos utilizados nos processos quimioterápicos (BARROS, et al., 2012).

Nesse contexto, ao longo de décadas, vem sendo desenvolvido pesquisas na procura de novos princípios biologicamente ativos, e tem-se observado que abordagens ao nível molecular enriquecem e direcionam os estudos. A partir desses raciocínios, desde o século XIX, o desafio de relacionar características de íons, átomos e moléculas e suas respostas biológicas, originaram os estudos entre a estrutura química e atividade biológica (MONTANARI, 2011).

Desta forma, pode-se definir a gênese planejada de novos fármacos a qual está estruturada em duas etapas: (I) Planejamento, o qual compreende a identificação, validação de alvos, identificação e otimização de compostos protótipos; (II) Desenvolvimento, etapa em que se realizam os ensaios pré-clínicos e clínicos (Figura 2) (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012; XIANG et al., 2012).

Figura 2 - Gênese de novos fármacos



Fonte: (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012)

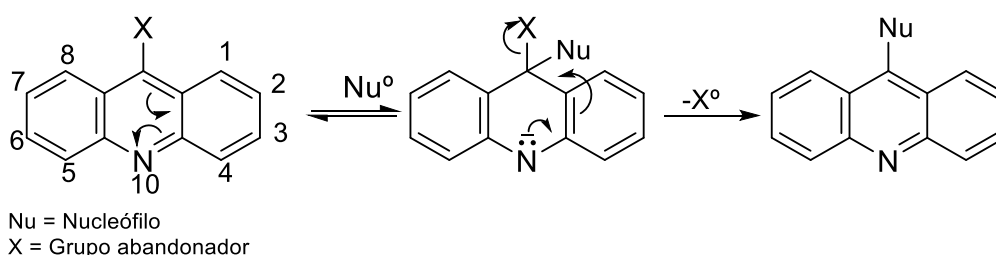
2.2.1 Derivados acridínicos

Os primeiros derivados de acridina eram utilizados como corante, nesse caso, o laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina) é um dos mais utilizados pois apresenta uma forte seletividade para o ácido nucleico e proteínas, sendo útil para a determinação do ciclo celular (MITRA et al., 2014).

Quimicamente, a acridina é um alcaloide de antraceno, conhecido por denominações diversas como: dibenzopiridina; 10-azaantraceno; 2,3,4,6- dibenzopiridina; 2,3-dibenzoquinolina, entre outros (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; SCHMIDT e LIU, 2015).

A acridina é um heterocíclico deficiente em elétrons π e por isso reage fortemente com nucleófilos, sendo a posição 9 do núcleo acridínico o mais susceptível ao ataque nucleofílico, e quando essa posição é substituída por grupos abandonadores a reação é ainda mais favorecida (Esquema 1) (KATRITZKY et al., 2010).

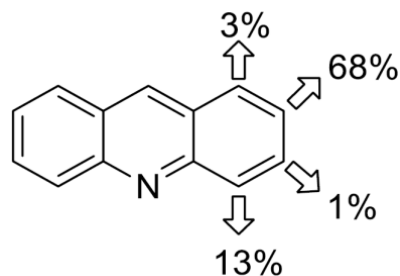
Esquema 1 – Mecanismo de Substituição nucleofílica aromática em acridinas na posição 9.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em contrapartida, as substituições eletrofílicas ocorrem no anel benzênico, preferencialmente ao anel heterocíclico, como é possível observar na figura 3 (pág. 24) que mostra as porcentagens de nitração em cada uma das posições do anel benzênico da acridina.

Figura 3 - Porcentagens de nitração da acridina.



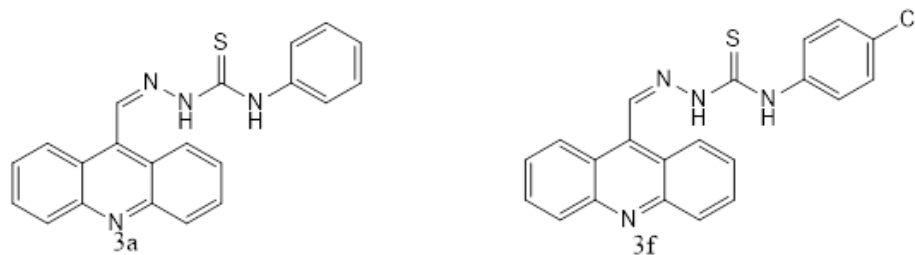
Fonte: Adaptado de Katritzky et al. (2010).

2.2.2.1 Atividade antitumoral

Vários estudos foram realizados com derivados de acridina para avaliação antitumoral o qual se observou uma grande atividade de ligação com o DNA, atuando como intercaladores, devido sua estrutura planar e os efeitos eletrônicos provenientes dos anéis aromáticos fundidos (ALMEIDA et al., 2016; KAVA; MURRAY, 2016; ZHANG et al., 2016).

Nos estudos de Almeida et al. (2016) se utilizou o núcleo de acridina como um composto principal e ocorreram modificações estruturais pela adição de diferentes porções de tiossemicarbazidas substituídas. Foram sintetizados oito novos compostos e foram avaliadas as propriedades de ligação de DNA e atividades antiproliferativas. O composto mais eficaz na ligação a ctDNA *in vitro* ($K_b = 1,0 \times 10^6$) foi o (Z) -2- (acridin-9-il-metileno) -N- (4-clorofenil) hidrazinecarbothioamida (3f, Figura 4), enquanto que o composto mais ativo no ensaio de atividade antiproliferativa (GI_{50} menor do que 10 μ M para todas as linhas de células de tumor) foi o (Z) - 2- (acridin-9-il-metileno) -N-fenil-hidrazina-carbotioamida (3a, Figura 4).

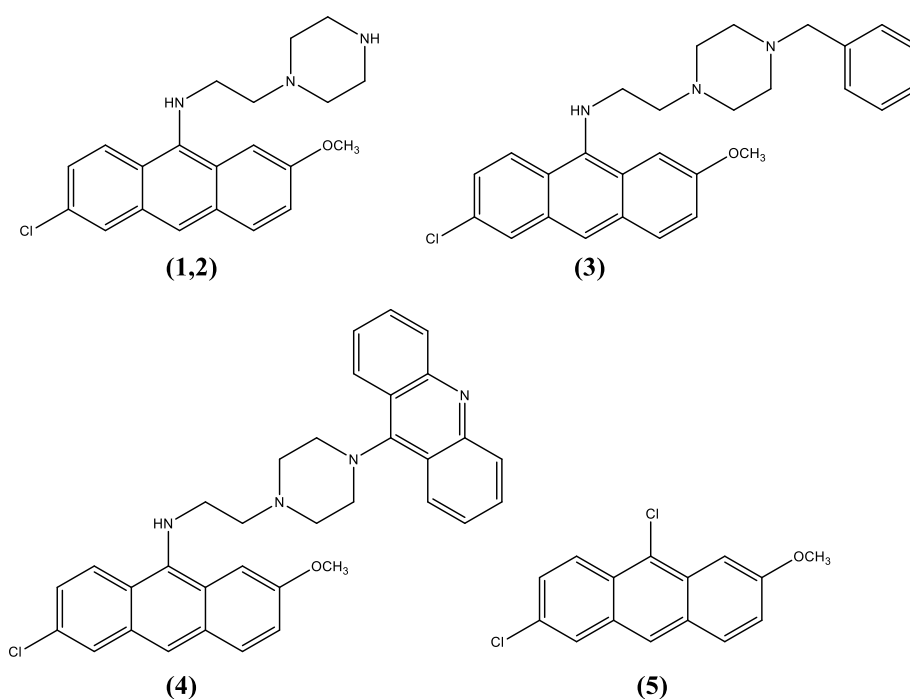
Figura 4 - Estruturas químicas dos compostos 3a e 3f sintetizados por Almeida e colaboradores.



Fonte: Almeida et al. (2016)

Janocková et al. (2015) realizaram estudos de atividade antitumoral dos seus derivados através da interação com DNA e inibição de topoisomerase tipo I e tipo II, os quais constataram que os compostos 1, 2 e 4 (figura 5), apresentaram forte inibição da topoisomerase I na concentração de 5 μM . Já para o teste de inibição da topoisomerase II, observou-se que os compostos 1, 3 e 4 (figura 5) indicaram atividade inibitória na concentração de 10 μM , enquanto o composto 2 mostrou evidencia de inibição em 2,5 μM . Os resultados também mostraram que os derivados de acridina testados interagem com o DNA através da intercalação com o mesmo, os quais apresentaram uma constante variando de $K = 3.1 \times 10^4 - 2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

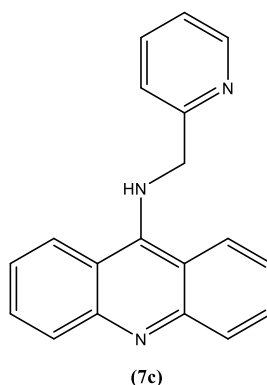
Figura 5 - Derivados acridínicos sintetizados



Fonte: Adaptado de Janocková et al. (2015)

Seguindo nesse contexto de estruturas que possuam atividade inibitória contra as topoisomerasas, Li et al. (2014) realizaram testes com novos derivados 9-aminoacridínicos e, dentre os compostos sintetizados, observaram que o derivado 7c (figura 6, pág. 26) foi o mais promissor apresentando atividade inibitória para topoisomerase I, sendo considerado, pelos autores, um excelente resultado pois o mesmo inibiu a enzima em uma concentração de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 6 - Derivado 9-aminoacridínico



Fonte: Adaptado de Li et al. (2014)

2.2.2.2 Atividade antibacteriana

Com o aumento extensivo da resistência bacteriana sobre as penicilinas, surgiu a necessidade de busca por novos compostos com capacidade de superar os mecanismos de resistência aos anéis β -lactâmicos, dentre as alternativas existentes, vem ressurgindo a procura por protótipos que já apresentaram atividade antibacteriana e dentre eles se destaca os derivados acridínicos. Baseado na estrutura da acriflavina, o foco dos pesquisadores foi atraído para a acridina, devido a capacidade de ionização catiônica, níveis elevados de ionização em pH neutro e por ser uma molécula com geometria espacial planar, tornando-a um excelente candidato para um agente antibacteriano (SHAIKH et al., 2010).

Shaikh et al. (2010) sintetizaram derivados tetrahydroacridinas substituídas, onde, através da metodologia de disco difusão, determinaram as atividades antibacterianas dos seus compostos os quais concluíram que a maioria dos derivados apresentaram interessante atividade frente as cepas testadas. Ainda segundo o mesmo estudo, todos os compostos apresentaram boa atividade frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (*E. aureus*) e *Escheria coli* (*E. coli*), quando comparados com a tetraciclina, droga padrão utilizada no presente trabalho.

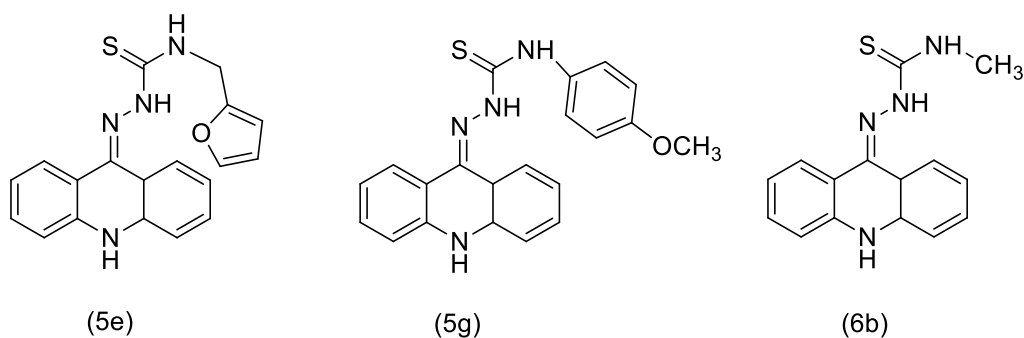
Outro estudo com resultados relevantes utilizando derivados de acridina frente à atividade antibacteriana foi descrito por Mitra et al. (2014), os quais testaram os seus compostos conjugados com nanopartículas de ouro. Ainda de acordo com o mesmo estudo, observou-se que o cloridrato de 9-aminoacridina, conjugado com nanopartícula de ouro, e o laranja de acridina apresentaram uma excelente atividade frente as cepas de *Bacillus subtilis* e *E. coli*, onde se pôde visualizar, através de micrografias de transmissão eletrônica, uma destruição da parede bacteriana seguido do extravasamento do conteúdo intracelular. Os mesmos também

observaram uma maior atividade antibacteriana com o aumento da concentração do ouro nas nanopartículas.

Silva et al. (2014) testaram um derivado bromo-acridínico substituído frente as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, através da Concentração inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), onde os resultados mostraram que o composto testado apresentou excelente CIM (4,41 µg/mL para *E. coli* e 7,48 µg/mL para *S. aureus*) para ambas as cepas, quando comparadas com a gentamicina o qual foi utilizado como controle positivo.

De acordo com os estudos de Machado (2016), observou-se uma boa atividade antibacteriana para os derivados de acridina hibridizados com tiosemicarbazidas e semicarbazidas (Figura 7) frente à cepa de *Salmonella entérica serovar typhimurium* (*S. typhimurium*) ATCC 13311. Os mesmos foram comparados com eritromicina como controle positivo obtendo valores de CIM próximos aos obtidos pelo composto padrão. Também foi sugerido que o comportamento pela atividade antibacteriana é possivelmente influenciado pelo átomo de enxofre, uma vez que interfere diretamente na lipofilicidade dos compostos testados.

Figura 7 - Estrutura molecular dos derivados 9-acridinil-tiosemicarbazidas



Fonte: Machado (2016)

2.2.2.3 Atividade antileishmania

Muitas experiências foram realizadas com compostos que possuem estruturas com anel heterocíclico para explorar sua eficácia contra *Leishmania*. Esses estudos sugeriram sua característica farmacofórica similar de um *scaffold* heterocíclico como alvo potencial para a descoberta de medicamentos antileishmania (PATHAK et al., 2011).

Nesse contexto, Chtita et al. (2016) dois métodos de modelagem diferentes, *Multiple Linear Regression* (MLR) e *Artificial Neural Network* (ANN), foram utilizados na construção de modelos QSAR para atividades antileishmanial contra duas formas de parasitas (promastigotas e amastigotas) de derivados de acridinas.

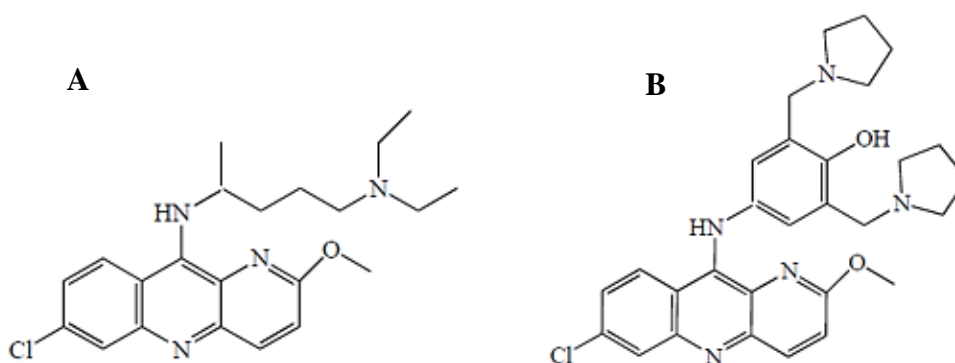
Segundo o mesmo estudo, os resultados obtidos mostram que, para aumentar a atividade antileishmaniana contra parasitas promastigotas, foi necessário aumentar a eletrofilicidade e diminuir a ramificação, a polaridade e o número de átomos de hidrogênio associados ao heteroátomo dos derivados de acridina.

2.2.2.4 Atividade antimalária

Vários derivados de acridina e acridinona com atividade antimalárica foram sintetizados inspirados nas estruturas de quinacrina (Figura 8a) e pironaridina (Figura 8b) (VALDÉS, 2011).

A quinacrina foi o primeiro antimalárico conhecido testado clinicamente. Embora não esteja atualmente em uso para essa respectiva atividade, essa droga terminou inspirando muitos cientistas a projetar, sintetizar e avaliar muitos derivados baseados na sua estrutura. Já a pironaridina é utilizada atualmente como combinação de dose fixa com artesunato para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* sem complicações.

Figura 8 - Estrutura da quinacrina (A) e pironaridina (B)



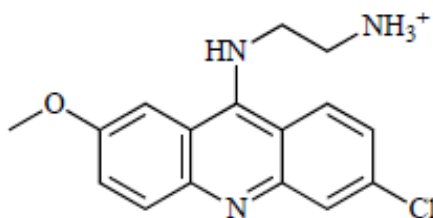
Fonte: Valdés (2011)

Baseado nessas informações Valdés (2011) fez um levantamento em seu estudo sobre derivados de acridina que apresentavam atividade antimalárica satisfatória o qual observou que

os substituintes 6-cloro e 2-metoxi no anel de acridina, eram requisitos para que o núcleo exerça uma ótima atividade antimalárica.

Dois compostos apresentaram atividades significativas com valores de $IC_{50} \leq 0,07 \mu\text{m}$, no qual, o composto 9-(6-amônioetilamino)-6-cloro-2-metoxi-acridina dicloride (figura 9) foi o que obteve a melhor atividade frente as cepas resistentes quando comparado com o controle, apresentando também baixa toxicidade contra a linha de células KB. O mesmo composto foi moderadamente seletivo com índices que variaram de 7 para cepas resistentes, a 50 para cepas suscetíveis.

Figura 9 - Estrutura molecular do 9-(6-amônioetilamino)-6-cloro-2-metoxi-acridina dicloride

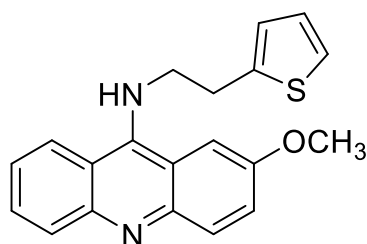


Fonte: Valdés (2011)

2.2.2.5 Atividade anti-inflamatória

Seguindo o modelo de edema de pata com ratos albinos, Sondhi et al. (2010) testarem diferentes derivados de acridina substituídos e chegaram a conclusão de o composto 3e (figura 10) apresentou melhor resultado com 41,17% de atividade anti-inflamatória na dose de 50 mg/Kg, sendo superior a atividade do ibuprofeno que apresentou 39% de atividade na mesma dose do composto 3e.

Figura 10 - Estrutura molecular do composto 3e

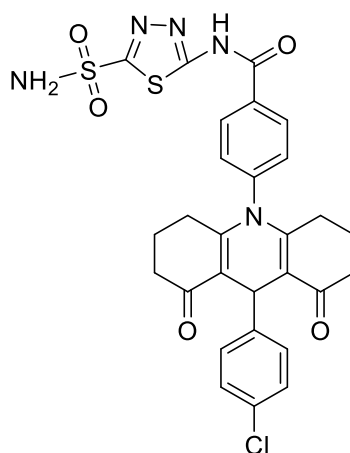


Fonte: Adaptado de Sondhi et al. (2010)

2.2.2.6 Inibidor de Anidrase Carbônica Humana (hCA)

Ulus et al. (2016), através do método de Khalafah, testaram a atividade inibitória de anidrase carbônica de derivados de acridina conjugados com benzeno-sulfonamida os quais conseguiram melhorar a inibição e a seletividade da base de acridina de alguns compostos para a anidrase carbônica. Os resultados mostram que a obtenção de uma nova série desses derivados se conseguiu diminuir as constantes de inibição (K_i) para valores nanomolar mais baixos, como por exemplo o composto 7n (figura 11) o qual apresentou K_i de 0,5 nM.

Figura 11 - Estrutura molecular do derivado acridínico 7n



Fonte: Adaptado de Ulus et al. (2016)

Ainda segundo o mesmo estudo, esta série de compostos apresentaram bastantes seletivos para as isoformas hCAII (que é o principal alvo para o tratamento do glaucoma) e hCAIV.

Uma vez que a inibição de hCA II e hCA IV poderia estar envolvida nos efeitos diuréticos das sulfonamidas e a inibição de CA I pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de retinopatia diabética proliferativa e o edema macular diabético, o qual esta nova série de compostos à base de acridina pode ser interessante para aplicações farmacêuticas (ULUS; ADAY, et al., 2016).

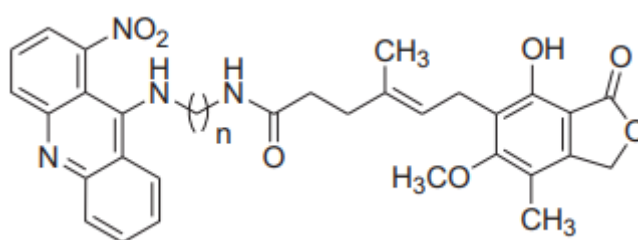
Contudo, Esirden et al. (2015) testaram bi-sulfonamidas de acridina, através da avaliação *in vitro*, contra as isoformas de hCA I, II, IX e XII, porém não foram bastante ativos pois apresentaram baixa inibição micromolar.

2.2.2.7 Agente Imunossupressor

Recentemente, vários tipos de compostos foram considerados como potentes inibidores da enzima Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMDPH) (CHOLEWIŃSKI et al., 2015). Além disso, a atividade de compostos acridínicos pode ser melhorada pela formação de conjugados (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOLODZIEJCZYK, 2011).

Nos últimos 10 anos alguns estudos importantes sobre compostos acridínicos, frente a atividade inibitória de IMPDH, foram descritos por vários pesquisadores como por exemplo os trabalhos descritos por Malachowska-Ugarte et al. (2012) os quais relataram potentes inibidores de IMPDH portadores de ácido micofenólico (MPA) ligados covalentemente a derivados de nitroacridina / nitroacridona via formação de ligação de amida (compostos 4a-e, figura 12).

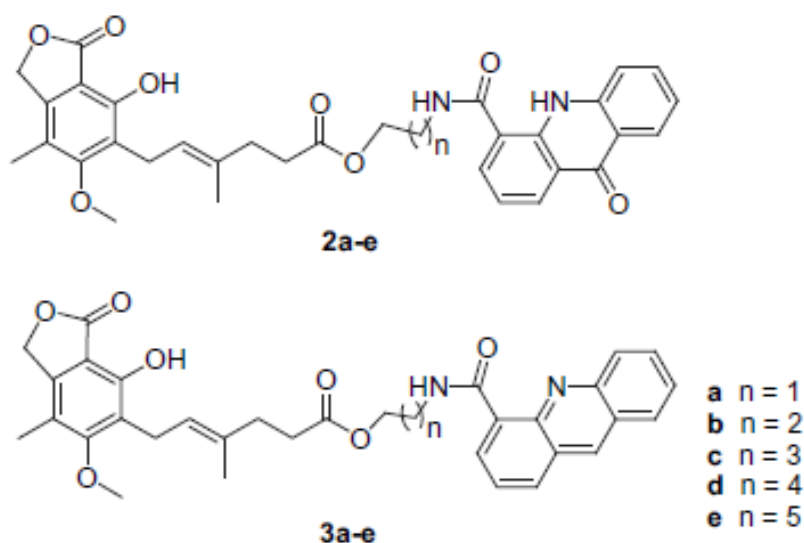
Figura 12 - Estrutura molecular base dos compostos acridínicos conjugados 4a-e



Fonte: Malachowska-Ugarte et al. (2012)

Seguindo uma linha de pesquisa similar, Cholewiński et al. (2016) sintetizaram e verificaram a atividade de derivados éster do MPA e acridinas/acridonas, conjugados via esterificação de Yamaguchi, como potentes agentes imunossupressores. Os conjugados obtidos 2a-e e 3a-e (figura 13, pág. 32) são apresentados-se como inibidores de IMPDH e indicaram atividade antiproliferativa interessante *in vitro* em comparação com o parente MPA 1. Na maioria dos casos, os derivados de acridina 3a-e eram mais ativos do que os análogos de acridona 2a-e.

Figura 13 - Estrutura molecular das séries 2a-e e 3a-e



Fonte: Cholewiński et al. (2016)

Ainda no mesmo estudo, observou-se que os compostos 2b, 2d, 3a e 3b foram considerados os mais promissores como inibidores de IMPDH, e por esse motivo, essas moléculas serão submetidas a exames mais aprofundados para esta mesma atividade biológica a fim de potencializar o efeito farmacológico desejado.

2.2.2.8 Inibidor de Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS)

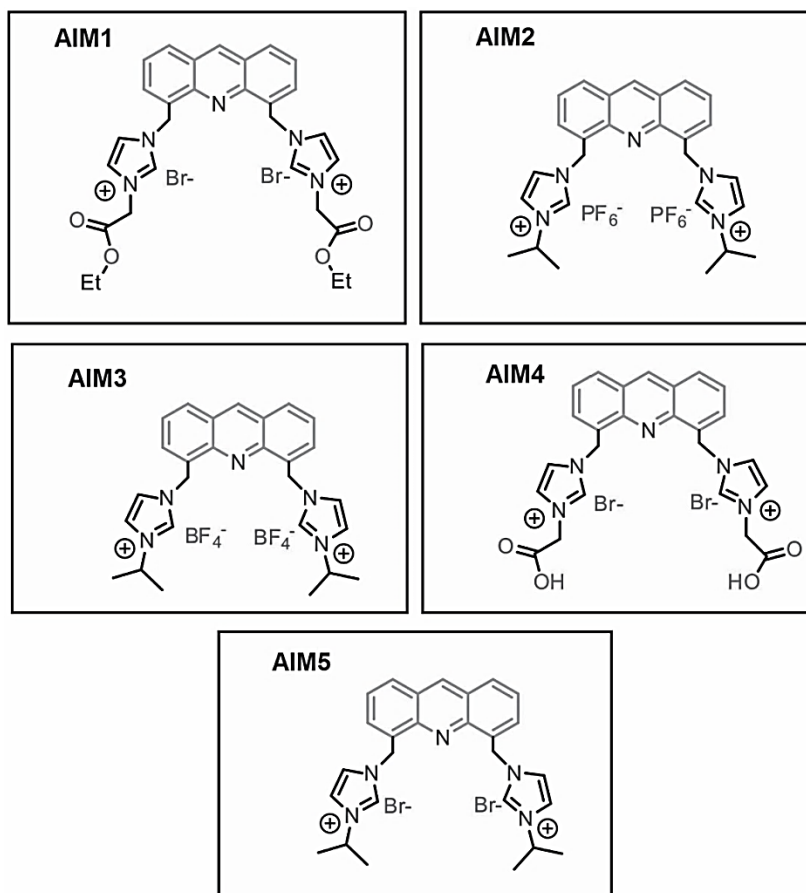
A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença fatal associada à degeneração do neurônio motor e até agora, não há cura ou tratamento efetivo para ALS (ROSSI; COZZOLINO; CARRÌ, 2016). Assim, o TDP-43 é uma proteína importante em patologia da ALS e um importante alvo para o rastreamento de medicamentos para propriedades anti-ALS. O TDP-43 é uma proteína versátil de ligação ao RNA/DNA envolvida no processo celular, como RNA-Metabolismo (transcrição, tradução, processamento de miRNA, transporte de mRNA através do núcleo) (LAGIER-TOURENNE; POLYMENIDOU; CLEVELAND, 2010).

Derivados imidazólicos de acridina foram testados por Prasad et al. (2016) os quais avaliaram a influência eletrônica de grupos substituídos nas extremidades de suas estruturas frente a inibição da agregação anti-TDP-43.

De acordo com o mesmo estudo, observou-se que as moléculas que apresentavam grupos isopropílicos não-polares nas extremidades (AIM2, AIM3 e AIM5) foram ineficazes como inibidores de agregação anti-TDP-43. Contudo, a presença de grupos éster nas

extremidades (AIM1) apresentarem leve efeito inibitório na agregação de TDP-43, enquanto a presença de grupos carboxílicos (AIM4) se apresentou como um forte inibidor, o qual pode ser explicado pelo forte efeito cosmotrópico inerente ao aumento da estrutura protéica. A figura 14 ilustra as estruturas moleculares dos AIMs.

Figura 14 - Estruturas dos derivados imidazólicos de acridina examinados quanto ao efeito na agregação anti-TDP-43



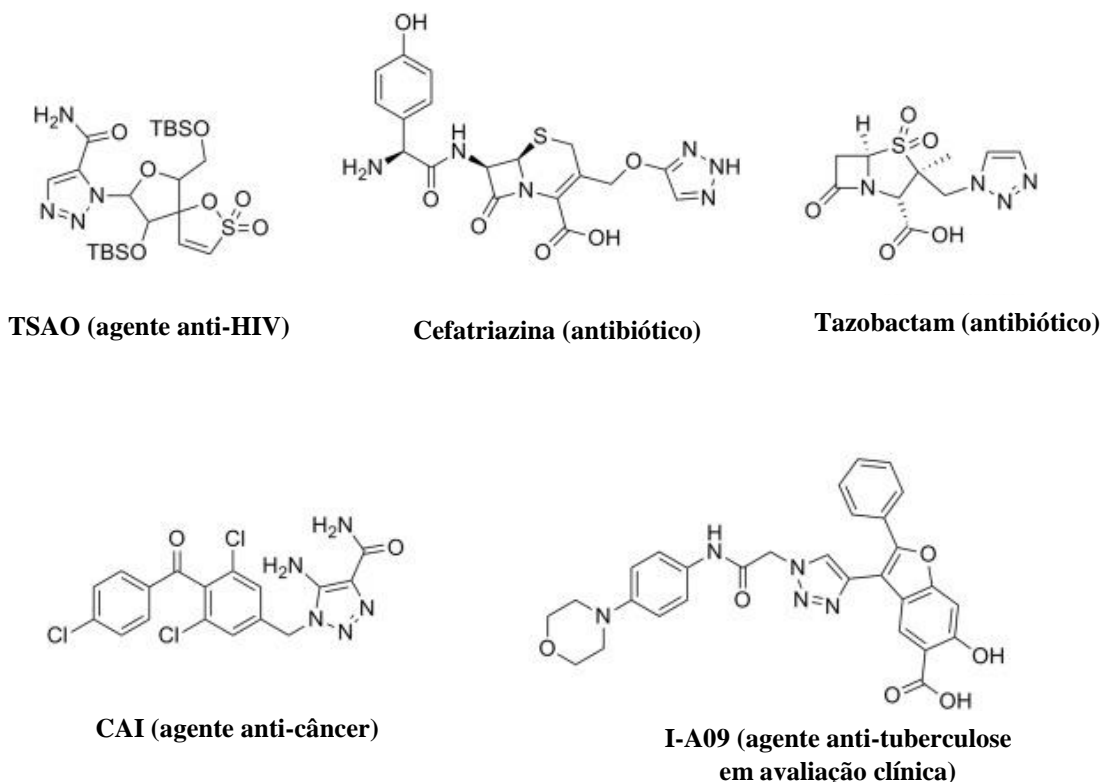
Fonte: Adaptado de Prasad et al. (2016)

2.2.3 Derivados triazolidínicos

Os azóis são uma das classes mais importantes de heterocíclicos contendo nitrogênio que exibem várias atividades biológicas tais como propriedades antibacterianas, antimaláricas, antifúngicas, anti-HIV, anti-inflamatórias e anti-tuberculose. Em particular, os triazóis, incluindo 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, benzotriazol, triazolopirimidina, bem como os seus derivados, têm atraído interesse contínuo na química medicinal, e alguns fármacos atualmente em uso são baseados em triazóis, especialmente 1,2,3-triazole, como por exemplo o agente anti-

HIV TSAO, o antibiótico Ceftriaxina, o agente anti-bacteriano Tazobactam, bem como o agente anticancerígeno CAI (Figura 15) (NAGESH, et al., 2013).

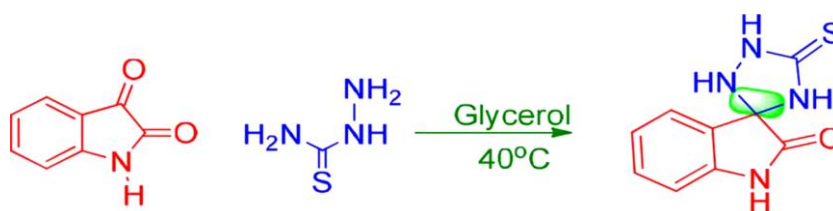
Figura 15 – Fármacos derivados do núcleo triazol



Fonte: NAGESH, et al., 2013

Tiwaria e colaboradores (2017), demonstraram em seu estudo a síntese de um composto com núcleo triazolidínico apresentando duas tiocarbonilas (C=S) em sua estrutura, a partir dos reagentes isatina e tiossemicarbazida em meio etanólico sem a presença de catalisador, ocasionando na ciclização espontânea formando o composto final 5'-tioxiaespiro [indolina-3,3' - [1,2,4] triazolidin] -2-onas / espiro [indolina-3,3' - [1,2,4] triazolidina] -2,5- diona, com rendimento de 62% à temperatura ambiente, e de 81% com aquecimento sob refluxo. Porém ao utilizar glicerol como solvente foi observado a formação do produto final com rendimento de 96% à temperatura de 46 °C (Esquema 2, pág. 35)

Esquema 2 – Síntese do derivado triazolidínico-2,5-diona com maior rendimento



Fonte: Adaptado de Tiwaria e colaboradores (2017)

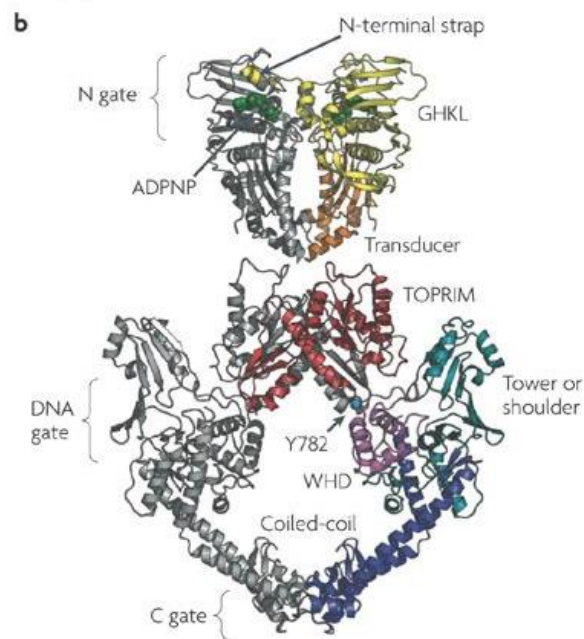
2.3 Enzimas que atuam no processo de crescimento tumoral

2.3.1 Topoisomerase II α

As topoisomerasas são as enzimas que gerenciam os estados topológicos do DNA durante a replicação, transcrição, recombinação e remodelamento da cromatina através de uma quebra transitória da fita dupla do DNA. A abundância de antibióticos naturais e drogas antitumorais que têm como alvo as topoisomerasas do DNA atestam sua importância (EHMANN e LAHIRI, 2014).

Existem duas isoformas de topoisomerase de mamíferos do tipo II: Topoisomerase II α (Topo II α) que são expressas preferencialmente em células em proliferação e são essenciais para a conclusão da mitose (Figura 16, pág. 36); e topoisomerase II β (Topo II β) que é expressa em todas as células, sendo necessária para o desenvolvimento normal, mas não é essencial para a proliferação celular (NITTIS, 2009).

As topoisomerasas do tipo II α consistem em vários motivos-chave: um domínio N-terminal da ATPase GHKL (para girase, Hsp, quinase e MutL), um domínio Toprim (às vezes chamado de dobra de Rossmann), que existe em ambas as topoisomerasas tipo II, topoisomerasas do tipo IA e primase bacteriana (DnaG), um núcleo central de ligação ao DNA (que estruturalmente forma uma estrutura em forma de coração), e um domínio C-terminal variável (Figura 16, pág. 36). As estruturas do domínio N-terminal ATPase da girase e topoisomerase II foram dissolvidas em complexo com AMPPNP (um análogo de ATP), mostrando que dois domínios de ATPase dimerizam para formar uma conformação fechada. Para a girase, a estrutura tem um buraco substancial no meio, que se presume acomodar o segmento T (CLASSEN; OLLAND; BERGER, 2003).

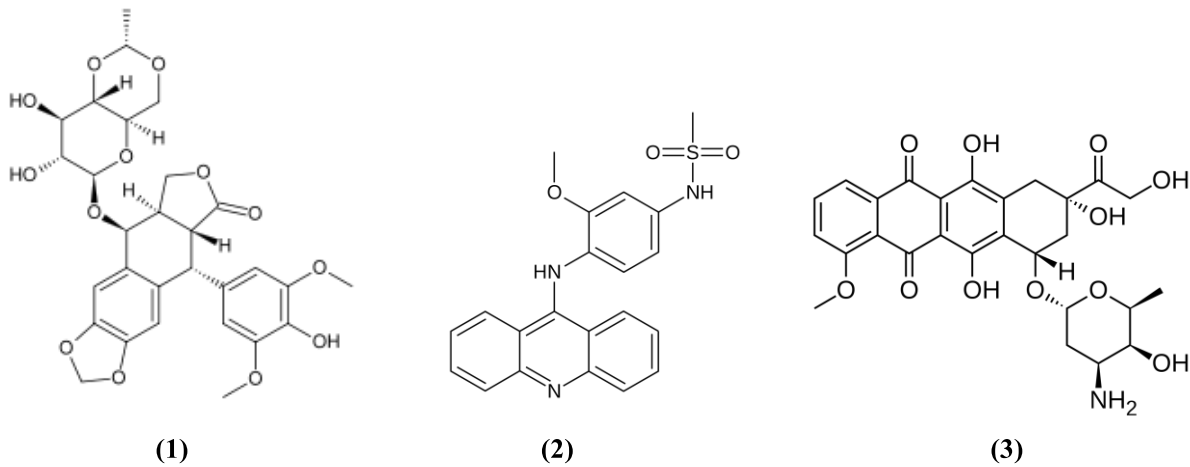
Figura 16 - Estrutura cristalográfica da Topo II α 

Fonte: Nittis, 2009

As topoisomerases do tipo II α têm a capacidade especial de relaxar o DNA para um estado abaixo do equilíbrio termodinâmico, uma característica diferente das topoisomerases tipo I α , I β e II β . Essa capacidade, conhecida como simplificação de topologia, foi identificada pela primeira vez por Rybenkov et al (2006). A Bioquímica, microscopia eletrônica e estruturas recentes da topoisomerase II ligadas ao DNA revelam que as topoisomerases do tipo II α se ligam nos ápices do DNA, suportando este modelo (RYBENKOV, et al., 2006)

Agentes que foram encontrados para inibir a atividade de Topo II são divididos em dois distintos grupos: inibidores catalíticos e venenos. Inibidores catalíticos podem interferir com cada etapa do ciclo catalítico da topoisomerase, incluindo ligação ao DNA, ligação ou hidrólise do ATP, ligação com o magnésio e ligações não covalentes entre enzimas e DNA. De fato, o único passo do processo que não é inibido por Inibidores catalíticos Topo II é a estabilização de ligações covalentes entre enzimas e o DNA duplex. Além disso, venenos Topo II podem ser classificados em ainda mais subcategorias: compostos não intercalantes, como o etoposídeo, e intercaladores como a amsacrina e a doxorubicina (figura 17, pág. 37) (JANOČKOVÁ, et al., 2015).

Figura 17 - Inibidores de Topo II α : Etoposídeo (1), Amsacrina (2) e Doxorubicina (3)



Fonte: Elaborado pelo autor

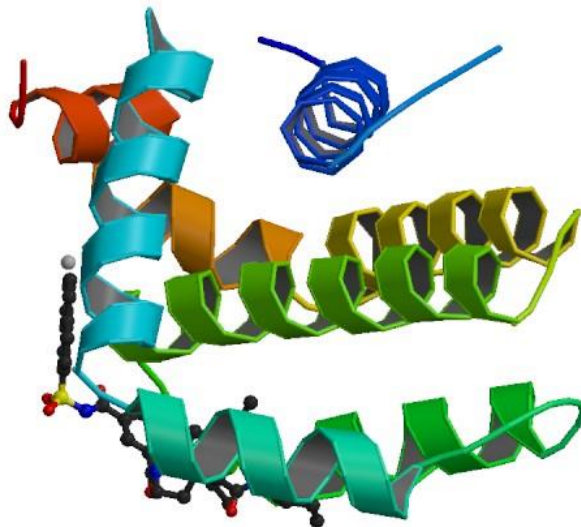
A isoforma alfa parece ser o alvo do etoposídeo. A enzima beta não muda significativamente durante o ciclo e poderia potencialmente ser um alvo em cânceres de crescimento lento. Duas ligações de cisão são formadas por cada quebra da dupla fita do DNA mediada por topoisomerase II. Os resultados dos estudos de clivagem do DNA e dos ensaios de ligação indicam um modelo de dois locais para a ação do etoposídeo contra a topoisomerase II alfa humana. Este modelo sugere que as interações medicamentosas em ambas as ligações de fibra são necessárias para aumentar as quebras da dupla fita de DNA mediadas por enzimas (BROMBERG; BURGIN; OSHEROFF, 2003).

A topoisomerase II α opera através de um mecanismo de "duas portas" no qual uma cadeia de DNA, chamada de gate, ou segmento G, é ligada por uma porta central de ligação ao DNA (DNA-gate). Uma segunda cadeia de DNA, chamada de transporte, ou segmento T, é capturada pela dimerização do domínio ATPase N-terminal (a porta-ATPase) quando duas moléculas de ATP se ligam. A hidrólise do ATP e a liberação de um fosfato inorgânico leva à clivagem do segmento G, pois as tirosinas catalíticas formam uma ligação fosfotirosina covalente com a extremidade 5' do DNA. Isso cria uma saliência de quatro bases e uma quebra de fita dupla no segmento G. Como a porta de ligação do DNA se separa, o segmento T é transferido através do segmento G. O segmento G é vedado, levando a porta do terminal C (ou porta C) a abrir, permitindo a liberação do segmento T. A liberação do produto ADP leva a uma reinicialização do sistema e permite que um segundo segmento T seja capturado (CLASSEN; OLLAND; BERGER, 2003).

2.3.2 Enzima B-cell CLL/linfoma 2 (BCL-2)

Interações proteína-proteína (PPI) desempenham um papel importante nas vias de sinalização que regulam os processos biológicos na célula (DONG et al., 2014). Um dos processos biológicos que são rigorosamente regulados é a apoptose e um grande número de proteínas, algumas conhecidas e algumas ainda desconhecidas, estão envolvidas nessa via de sinalização. A proteína Bcl-2 (células B-2 de linfoma) é a mais estudada das proteínas envolvidas na regulação da apoptose e é por essa razão que a proteína Bcl-2 também nomeia a família de proteínas a que pertence. Vários estudos mostraram que a superexpressão de Bcl-2 leva ao câncer e numerosos inibidores de Bcl-2 foram desenvolvidos com atividade antitumoral (KANG & REYNOLDS, 2009).

Figura 18 - Estrutura cristalográfica da BCL-2 complexada com o inibidor fenilacilsulfonamida.



Fonte: *Protein Data Bank* (PDB ID: 4AQ3)

A superexpressão de Bcl-2 é comum em vários cânceres humanos, incluindo linfoma de próstata, pulmão, gástrico, renal, epitelial, não-Hodgkin, câncer de leucemia aguda e crônica com resistência quimioterápica (KIRKIN, et al., 2004). Embora o número de membros proteicos das 3 famílias de Bcl-2 implique que a regularização da apoptose seja um processo complexo e rigoroso, a sobre-expressão da família Bcl-2 provavelmente promove a inibição de

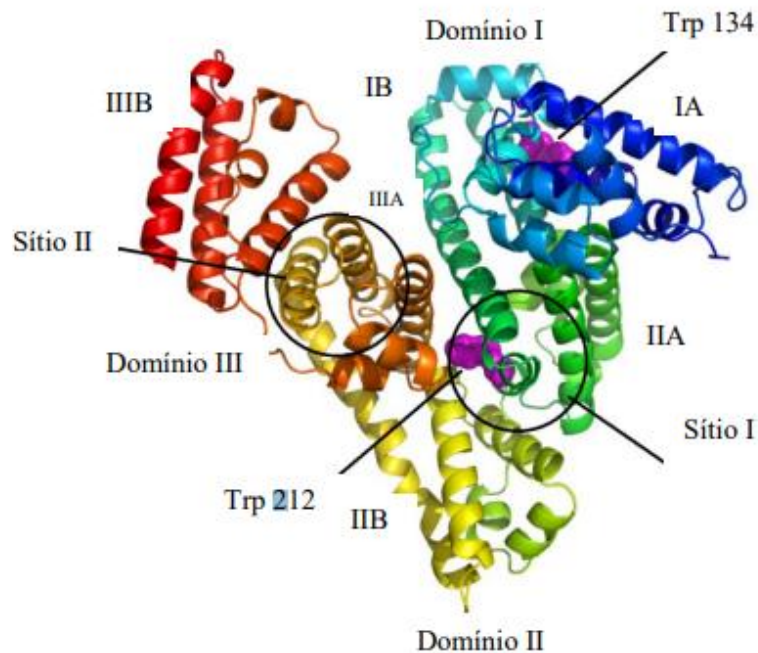
proteínas pro-apoptóticas, interrompendo assim a apoptose em células tumorais. A superexpressão da proteína Bcl-2 é, portanto, um freio para o que seria um processo saudável de apoptose tumoral. A inibição do PPI entre proteínas Bcl-2 e pro-apoptóticas é, portanto, um passo importante que leva à apoptose de células tumorais. Ao inibir Bcl-2, as proteínas efetoras pró-apoptóticas livres promoverão a permeabilização da Membrana Exterior Mitocondrial e consequente apoptose tumoral (KANG & REYNOLDS, 2009). Portanto, a descoberta do composto com a capacidade de inibir o Bcl-2 é um tópico de pesquisa em andamento.

2.3.3 *Albumina de Soro Bovino (BSA)*

A albumina sérica bovina (BSA), a proteína mais abundante no plasma bovino, é um reagente comumente utilizado no estudo biológico, que tem alta homologia com as albuminas séricas humanas. As albuminas séricas desempenham papéis importantes em muitas funções fisiológicas e servem como transportadores no transporte e distribuição de substâncias endógenas e exógenas (KRATZ, 2008).

A BSA é uma proteína não glicosilada e globular composta por 583 aminoácidos. São constituídos 19 de três domínios homólogos (I, II, III), que são separados em nove laços (L1-L9) por 17 pontes de dissulfeto. As alças em cada domínio são projetadas de uma sequência de 21 loops grandes-pequenos-grandes formando um trio. Cada domínio, por sua vez, é o resultante de dois 22 subdomínios. A BSA tem dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212 (figura 19, pág, 42), que estão embutidos no subdomínio IB e no subdomínio IIA, respectivamente (CHATURVEDI, et al., 2015).

Figura 19 - Estrutura cristalográfica da Albumina de Soro Bovino (BSA)



Fonte: CHATURVEDI, et al., 2015

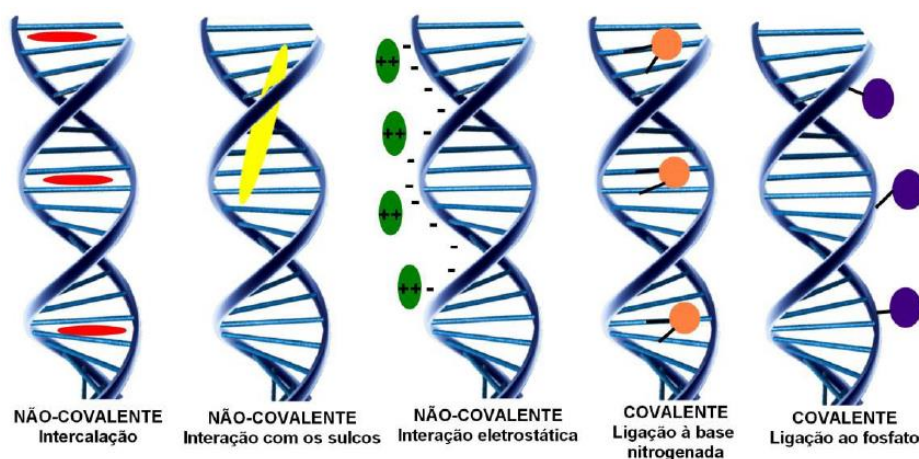
Muitos compostos químicos são sempre combinados com albuminas séricas antes de chegar aos destinos-alvo. A ligação destes compostos às albuminas séricas altera não apenas a eficácia das substâncias e sua conformação, mas também a atividade das albuminas séricas. Experiências de interação substância-proteína têm grande significado em ganhar características de ligação fundamental do complexo (SHU, et al., 2015). A utilização da BSA nos estudos de interação está relacionada ao fato da mesma apresentar uma semelhança de 76% na sequência de aminoácidos com a albumina de soro humano (HSA), sendo a BSA empregada como modelo para estudos de interação com novos compostos sintetizados (MAJOREKA, et al., 2012).

Outra característica importante é o acúmulo de albumina em tumores sólidos devido a problemas nos capilares combinado com um sistema linfático ausente ou deficiente. Assim, tem-se utilizado o BSA, como veículo para fármacos, em células de tumores sólidos, resultando em uma maior eficácia de tratamento e diminuição de efeitos secundários (KRATZ, 2008; SINGLA, et al., 2016; GOUVEIA, et al., 2018).

2.3.4 DNA

O DNA é um dos principais alvos biológicos para os novos agentes quimioterápicos os quais, por meio de interações com essa estrutura, podem interromper o ciclo celular da célula cancerígena induzindo a apoptose (LANG, et al., 2013; ZHAO, et al., 2013). Estas interações se caracterizam por uma forte afinidade entre as bases nitrogenadas do DNA e os núcleos aromáticos destes compostos, ligando-se de forma não-covalente através de três tipos: interações eletrostáticas, interações com os sulcos e interação por elétrons π , sendo esta última característica de intercalação como ilustrado na Figura 20 (BARRA; NETTO, 2015).

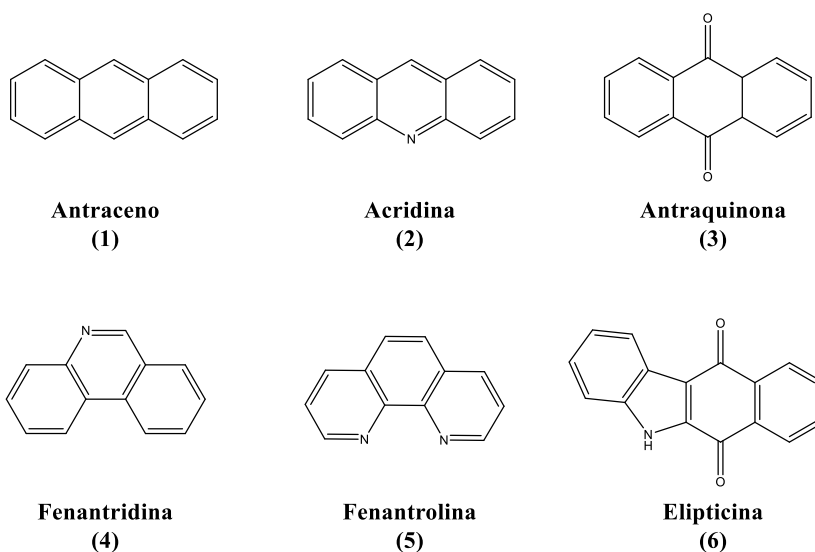
Figura 20 - Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA



Fonte: BARRA; NETTO, 2015

Em termos específicos, a intercalação é a inserção de uma molécula aromática entre os pares de bases consecutivos do DNA. As ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento π entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do agente intercalador contribuem para a estabilização do complexo intercalador-DNA. Apesar de haver uma imensa variedade de ligantes com possibilidade de intercalação, em geral, todos eles possuem estruturas químicas baseadas em seis principais famílias de intercaladores: antracenos (1), acridinas (2), antraquinonas (3), fenantridinas (4), fenantrolinas (5) e elipticinas (6) (Figura 16) (BARRA; NETTO, 2015).

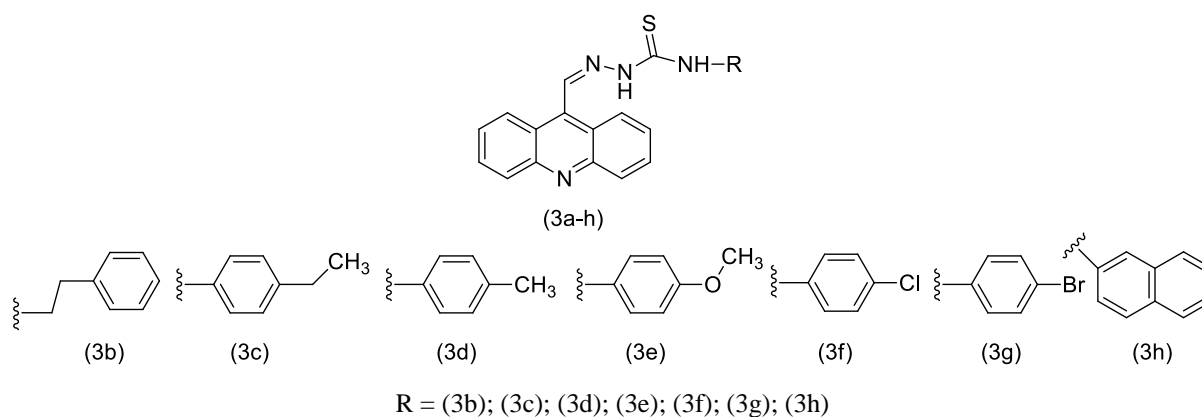
Figura 21 - Estruturas dos ligantes intercaladores clássicos



Fonte: BARRA; NETTO, 2015

Muitos estudos têm sido realizados por pesquisadores a fim de verificar a interação dos compostos sintetizados com o DNA. Nesse contexto Almeida et al. (2016) observaram que os derivados de acridina-tiossemicarbazidas, apresentavam uma possível ação farmacológica na atividade antitumoral através da ligação e intercalação do DNA. Segundo o referente estudo, oito novos derivados (figura 22) apresentaram constante de ligação com o marcador *Circulating Tumor DNA* (ctDNA) na faixa de $1,74 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e constante de extinção variando de $-0,2 \times 10^4$ para $2,18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, indicando alta afinidade com os pares de bases do ctDNA.

Figura 22 - Estrutura do núcleo principal dos derivados de acridina-tiossemicarbazidas e seus substituintes (R).



Fonte: Almeida et al. (2016).

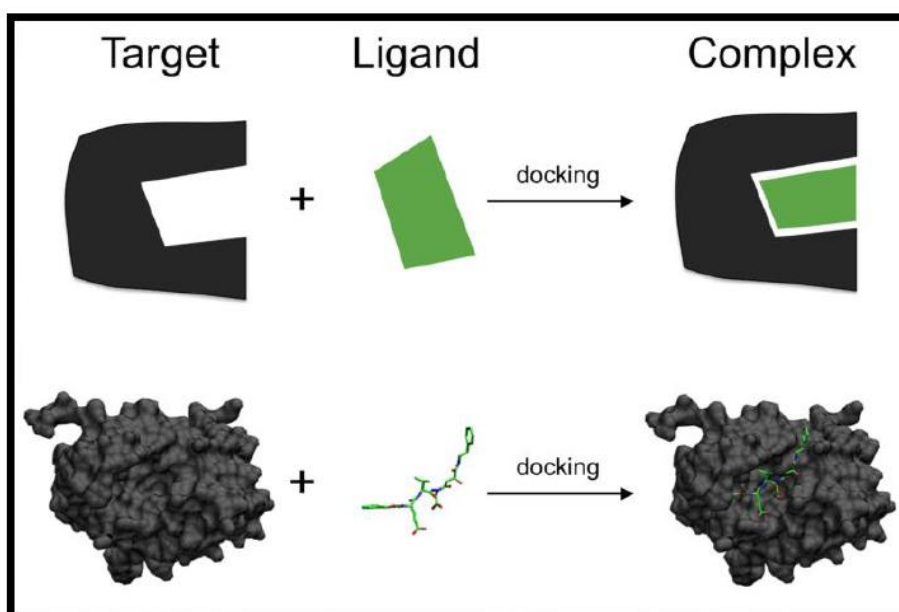
2.4 Modelagem molecular

2.4.1 Docking Molecular

Um dos principais objetivos dos estudos na área de planejamento *in silico* de fármacos é prever a intensidade e a especificidade com que pequenas e médias moléculas, normalmente denominadas de ligantes (drogas ou fármacos, em potencial) se liguem ao sítio ativo de um receptor biológico, tipicamente uma bio-macromolécula (alvo farmacológico), modificando assim o seu ciclo bioquímico/farmacológico, através de modulação da sua resposta biológica (FERREIRA, 2013).

A ferramenta de ancoragem ou *docking* molecular é um estudo de extrema importância na biologia molecular estrutural para o design de drogas assistidas por computador. A estratégia utilizada prevê as características da interação entre moléculas com atividade biológica (denominada ligante – pequenas moléculas orgânicas) e seus alvos macromoleculares (denominados receptores, em especial as proteínas, carboidratos, lipídios e os ácidos nucleicos) específicos de um organismo, quando a estrutura de ambos (ligante e receptor) já forem conhecidas experimentalmente (Figura 23) (TAVARES, 2017).

Figura 23 - Ilustração esquemática do *docking* molecular de um ligante com um alvo de proteína produzindo um complexo estável.



Fonte: Adaptado de Tavares, 2017

Pode falar-se em dois tipos de técnicas de *docking* automatizado: métodos de correspondência e métodos de simulação de *docking*. Os métodos de correspondência dizem respeito à criação de um modelo do local ativo (local de ligação), que incluem geralmente ligações de hidrogénio e locais estéricamente acessíveis, e posteriormente tentam fazer a ligação de um dado inibidor de forma rígida por correspondência geométrica entre ligante e local de ligação. Por outro lado, nos métodos de simulação de *docking* é feita de forma mais detalhada, isto é, o ligante fora da proteína e, de forma aleatória, começa a explorar translações, orientações e conformações até encontrar o local de ligação ideal. Apesar de este detalhe implicar em uma maior demora do processo, permite uma maior flexibilidade ao ligante para ser modelado e permite também a utilização de mecânicas moleculares mais detalhadas para o cálculo da energia do ligante no contexto do potencial local ativo (MORRIS et al., 2009).

O AutoDock é uma ferramenta capaz de prever de forma precisa e rápida, conformações preferenciais e energias de ligação não covalente de macromoléculas ou, como é mais frequente, de ligação de moléculas de pequena dimensão (ligante) com os respetivos receptores macromoleculares. O principal método utilizado para a pesquisa conformacional é o algoritmo genético lamarquiano (Lamarckian Genetic Algorithm – LGA), que tal como os demais algoritmos genéticos, usa como base linguagem da genética natural e evolução biológica, neste caso alusivo à teoria de Lamarck. Geralmente, um procedimento no AutoDock envolve no mínimo cinquenta operações do LGA com 25 milhões de avaliações em cada uma delas (MORRIS et al., 2009; TROTT; OLSON, 2010).

O sistema HPC, *high-performance computing*, é capaz de realizar, em cada unidade de processamento (CPU), entre 500 a 1000 cálculos de *docking* molecular por dia. Seu funcionamento pode ser descrito em três etapas, sendo elas:

- *Pré-docking*: Nesta etapa, ocorre a conversão das moléculas selecionadas, do formato PDB (ou MOL2), para o formato PDBQT, o qual é o formato padrão para a execução do cálculo de *docking* molecular através do AutoDock. Após esta conversão de arquivos, as moléculas são divididas em N subgrupos, sendo N o número de processadores disponíveis no *cluster* e cada subgrupo tendo aproximadamente o mesmo número de moléculas.
- *Docking* molecular em paralelo: Antes do procedimento de *docking* molecular, é efetuado, para cada receptor, o cálculo dos mapas da grade de energia (utilizando o programa AutoGrid, explicado na seção do 2.1.1.1 AutoDock) de cada tipo de átomo presente nos ligantes que irão interagir com o receptor em

questão. Após estes cálculos, é efetuado o *docking* molecular e os resultados, baseados nas energias de interação calculadas, são comparados entre os resultados dos outros processadores, para assim, ser possível determinar os melhores resultados globais.

- Pós-*docking*: Os melhores resultados coletados na etapa anterior são comprimidos e gravados em um diretório do sistema, com os resultados finais (TANCHUK, et al., 2015).

2.4.2 Mecânica Molecular

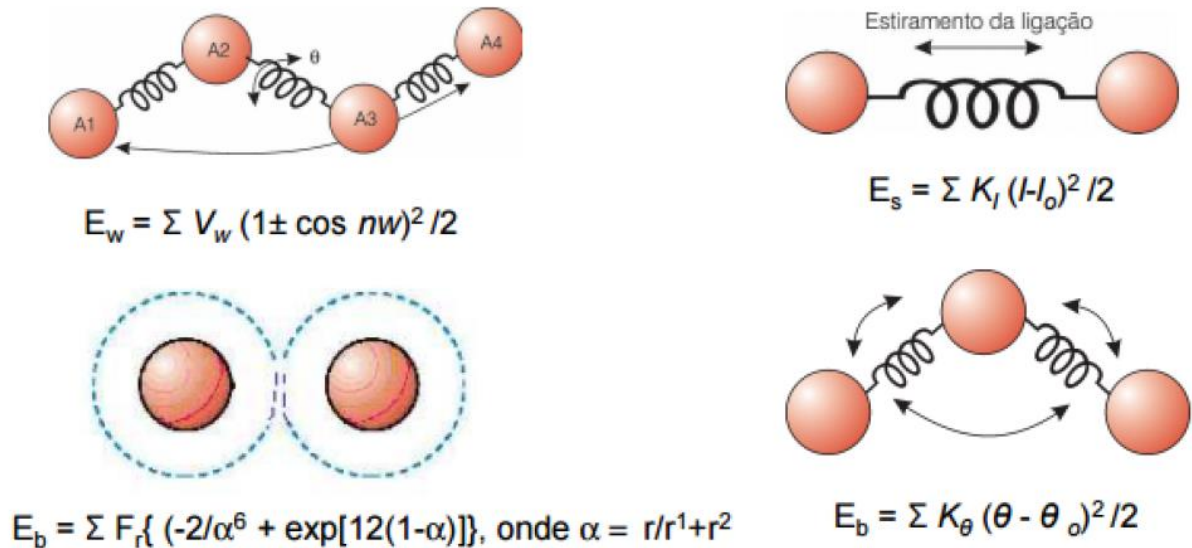
A energia é calculada por comparação entre ângulos e distâncias de ligação entre átomos que compõem a molécula, com valores tabelados, pelo emprego da técnica MM2. As equações obtidas por mecânica molecular consideram apenas o núcleo dos átomos e não incluem os elétrons nos cálculos. O programa determina as interações moleculares resultantes do estiramento das ligações, deformação angular, torsional e espacial e calcula a energia da molécula de partida de forma comparativa, com relação ao padrão metano (1 KJ mol^{-1}). O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os correspondentes cálculos de energia. O programa reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é prever a energia associada com determinada conformação de uma molécula (AMRITA, 2013).

Para esse estudo alguns parâmetros são calculados através da Equação de Westheimer (Esquema 3, pág. 46), o qual avalia as propriedades específicas da molécula, tais como: Energia de estiramento (ou compressão) (E_s), Energia de deformação angular (E_b), Energia de torção em torno de ligações (E_w) e Energia de interação não-ligante (E_{nb}), como descrito na Figura 24 (pág. 46) (OLIVEIRA, 2010).

Esquema 3 - Equação de Westhemeier

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_s + \mathbf{E}_b + \mathbf{E}_w + \mathbf{E}_{nb}$$

Figura 24 - Energias que influenciam na conformação das moléculas.



Energia de estiramento (ou compressão) (E_s), Energia de deformação angular (E_b), Energia de torção em torno de ligações (E_w) e Energia de interação não-ligante (E_{nb})

Fonte: (OLIVEIRA, 2010)

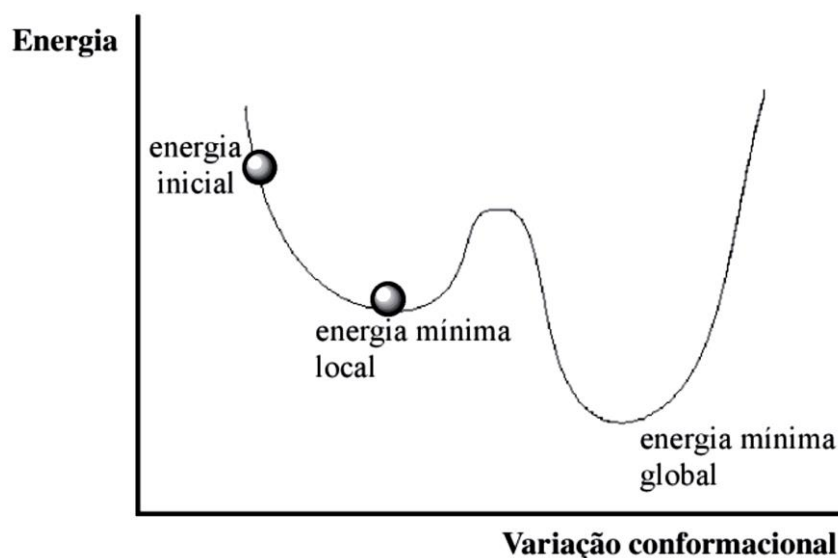
2.4.3 Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) são uma das técnicas computacionais mais versáteis e mais aplicadas nos estudos com macromoléculas biológicas. Atualmente, após enormes avanços tecnológicos, é possível realizar simulações de DM muito mais complexas (ALONSO et al., 2006).

Os processos de minimização de energia discutidos anteriormente fornecem uma conformação 3D estável, que não representa, necessariamente, a estrutura mais estável de determinada molécula. Na minimização, os cálculos de energia estérica são interrompidos quando a molécula atinge a primeira conformação estável e levam a uma estrutura semelhante à original, com energia mínima local. Nesta fase, a minimização não é continuada porque variações na estrutura resultam em mudanças pequenas de energia. O Gráfico 3 (pág. 45) mostra

que esta conformação “estável” pode estar separada de outra, ainda mais estável, por uma barreira de energia, que o programa de minimização é incapaz de sobrepujar. Neste caso, para identificar a conformação mais estável, com uma energia mínima global, é necessário gerar várias conformações de uma molécula e comparar os valores de energias obtidos a cada modificação (AMRITA, 2013).

Gráfico 3 - Energia mínima local e global obtidas, respectivamente, pelo processo de minimização e dinâmica molecular



Fonte: CARVALHO, 2003 (modelagem molecular)

2.5 Estudos farmacocinéticos *in silico*

A maioria das ferramentas ADME disponíveis exclusivamente *in silico* se concentram em uma propriedade ou modelo específico onde os pacotes ADME generalistas são softwares comerciais. Desta forma, sentiu-se a necessidade de reunir os métodos computacionais mais relevantes para fornecer uma avaliação global do perfil farmacocinético de pequenas moléculas. Os métodos foram selecionados para robustez, velocidade, mas também é importante para facilitar a interpretação para permitir a tradução eficiente para a química medicinal através do *design* molecular. Alguns deles foram adaptados com algoritmos de código aberto para garantir a liberdade de operar para a comunidade científica global. Quando aplicável, várias previsões do mesmo parâmetro são fornecidas para permitir uma visualização consensual de uma determinada propriedade (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Uma alternativa para avaliação dos estudos de ADME é através da ferramenta web SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) a qual destina-se à submissão fácil de usar e à facilidade na análise dos resultados, principalmente para não-especialistas em CADD. (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

O SwissADME apresenta características importantes na geração de resultados *in silico* para verificação das características farmacocinéticas de estruturas moleculares através de pontos importantes como: diferentes métodos de entrada, computação para múltiplas moléculas e a possibilidade de exibir, salvar e compartilhar resultados por molécula individual ou através de gráficos globais intuitivos e interativos. Finalmente, o SwissADME é integrado ao espaço de trabalho do SwissDrugDesign. A interoperabilidade de um clique dá acesso a várias ferramentas através do *Computer-Assisted Drug Design* (CADD), desenvolvidas pelo *Molecular Modeling Group* do SIB Instituto Suíço de Bioinformática, por exemplo, triagem virtual baseada em ligantes (SwissSimilarity (ZOETE, et al., 2016)), predição *biotarget* (SwissTargetPrediction (GFELLER, et al., 2014)), *molecular docking* (SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011)), predição de moléculas com grupos funcionais diferentes mas com mesma atividade através do *bioisosteric design* (SwissBioisostere (WIRTH, et al., 2013)), ou mecânica molecular (SwissParam (ZOETE, et al., 2011)).

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Desenvolver derivados acridínicos inéditos por meio da síntese e avaliação do potencial antitumoral *in silico* e *in vitro*.

3.2 *Objetivos Específicos*

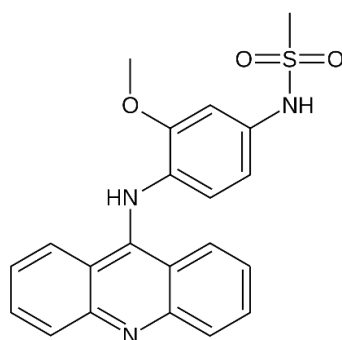
O presente estudo pretendeu atender os seguintes objetivos específicos:

- b) sintetizar e determinar as características físico-químicas de novos derivados acridínicos obtidos;
- c) caracterizar as estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e carbono (RMN de ^{13}C), infravermelho, espectrometria de massas;
- d) realizar estudos *in vitro* para observar a possível interação entre os derivados e os compostos orgânicos DNA (B-DNA) e BSA, e atividade citotóxica através das linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HCT116 (câncer de cólon).
- d) realizar estudos *in silico* através do *docking* molecular, e estudos farmacocinéticos por meio da plataforma online SwissADME como direcionamento para possíveis mecanismos de ação entre os compostos sintetizados e o complexo DNA-Topoisomerase II humana, da interação com DNA (B-DNA), BSA e Bcl-2.

4 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo apresentou como proposta de pesquisa através dos estudos *in silico* utilizando a ferramenta de *docking* molecular, com planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD), e o desenho dos fármacos foram tomados como partida um fragmento privilegiado (núcleo de acridina) como base para a criação de novos derivados a partir da amsacrina (Figura 25), caracterizando uma segunda estratégia de planejamento baseada em fragmento privilegiado de droga já descoberta (FBDD).

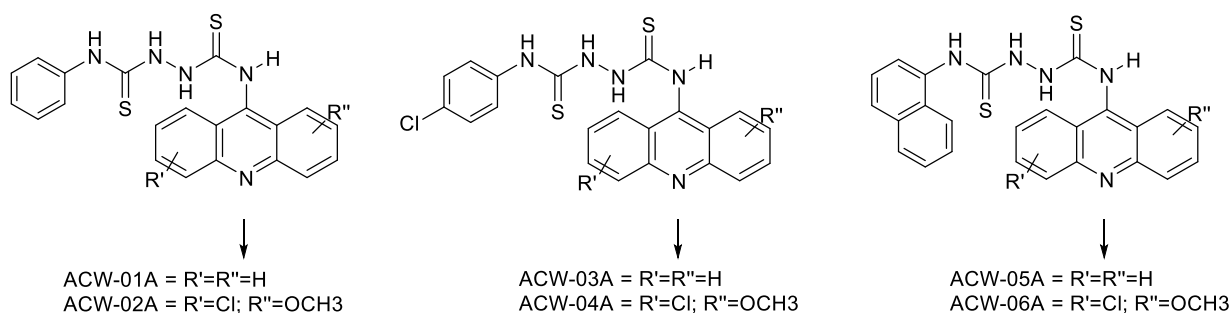
Figura 25 - Estrutura molecular da Amsacrina



Fonte: Elaborado pelo autor

Para isso, foram idealizados os compostos ilustrados na Figura 26, os quais foram submetidos posteriormente aos estudos de *docking* molecular em macromoléculas importantes como o DNA e o complexo DNA-Topo II α , uma vez que essas proteínas são os principais alvos de interação dos fármacos utilizados como protótipos para o desenvolvimento dos derivados carbotioamídicos acridínicos.

Figura 26 - Derivados carbotioamídicos acridínicos idealizados



Fonte: Elaborado pelo autor

5 METODOLOGIA

5.1 *Docking Molecular*

5.1.1 *Docking molecular de interação com Topo II α complexada com o DNA, DNA isolado Bcl-2 e BSA.*

A estrutura cristalográfica da Topoisomerase II α complexada com o inibidor Etoposídeo, o B-DNA, BSA e a enzima Bcl-2 co-cristalizada foram obtidos do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB ID: 5GWK, 1BNA, 4OR0 e 4AQ3, respectivamente). O *docking* molecular dos compostos, em seus respectivos sítios ativos, foi realizado utilizando o programa AutoDockTools (ADT) 1.5.6 (JADHAV, A. K.; KARUPPAYIL, S. M., 2017).

Para identificação do sítio ativo e realização dos cálculos do *docking*, foram gerados os mapas de energia eletrostática, afinidade atômica específica e desolvatação, representando as energias de interação entre os vários tipos de átomos do inibidor e os átomos de resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima, usando o programa Autogrid 4.2 através do ADT, com centro do grid em 23,766; -38.695 e -60.34 Å, dimensões de 60 x 60 x 60 Å nos eixos X, Y e Z e espaçamento de 0,375 Å, para o *docking* com a topo II α (5GWK).

Para o *docking* molecular com o DNA (1BNA) foi definido o centro do grid em 14,780; 20,976; 8,807 Å, dimensões de 96 x 96 x 126 Å nos eixos X, Y e Z e espaçamento de 0,375 Å. Já os estudos de interação dos compostos com a enzima BCL-2 (4AQ3), o centro do grid foi definido em -20,839; 7,21; -9,584 Å, dimensões de 60 x 60 x 60 Å nos eixos X, Y e Z e espaçamento de 0,375 Å. Por fim, o ancoramento molecular com o BSA (4OR0) foi definido o centro do grid em -0,061; 22,621; 109,051 Å, dimensões de 60 x 60 x 60 Å nos eixos X, Y e Z e espaçamento de 0,375 Å.

Em seguida foram gerados os cálculos de interação utilizando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS, et al., 2009) para busca global e local nas simulações de *docking*, através do Autodock 4.2 do ADT, gerando escore baseado na Energia Livre de Ligação (ΔG), e também simulando uma Constante de Inibição Estimada (Ki).

Os resultados do *docking* foram analisados através do programa Discovery Studio 2017 R2 Client, o qual pode-se identificar as regiões que ocorreram as interações, os tipos de interação, energia e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima envolvidos nessas interações (SINGH, A.; JANA, N. K., 2017).

Em geral, a confiabilidade dos resultados de *docking* depende da similaridade entre o modo de ligação experimental e a solução de menor energia. Um valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*, ou seja, Desvio Quadrático Médio das Distâncias) $\leq 2,0 \text{ \AA}$ é amplamente aceito como a distinção entre o sucesso e o fracasso em reproduzir um modo de ligação conhecido (YUSUF et al., 2008). Neste trabalho, foi aceito como metodologia validada, todo resultado que apresentou valor de RMSD $\leq 2,0 \text{ \AA}$.

5.1.2 Preparação da Enzima

O ligante Etoposídeo (EVP), para o *docking* com a Topo II α complexada com o DNA (PDB 5GWK), o fenilacilsulfonamida, ligante co-cristalizado com a enzima Bcl-2, as moléculas de solvente e os cofatores foram removidos através do PyMol. Para o estudo de *docking* com o DNA isolado foi utilizado um dodecâmero B-DNA (PDB 1BNA) (SINHA et al., 2015) de sequência d(CGCGAATTCGCG)₂ (sem lacuna) a qual foram removidas as moléculas de água através do PyMol. Assim como o DNA, a enzima Bcl-2 (PDB ID: 4OR0) também foi tratada com o PyMol para remoção de solventes e co-fatores. Usando o ADT, átomos de hidrogênio polares foram adicionados geometricamente à estrutura do receptor proteico e os átomos de hidrogênio não-polares foram mesclados com os respectivos átomos de carbono, e cargas atômicas parciais foram adicionadas utilizando o método de Gasteiger Marsili (GASTEIGER E MARSILI, 1980; MORRIS et al., 2009).

5.1.3 Preparação dos Ligantes

Os ligantes tiveram suas estruturas desenhadas no ChemDraw Professional 15.1 e, em seguida, foram submetidos no programa Chem3D 15.1 a análise conformacional através do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2) para se obter a conformação com menor energia. Por fim as estruturas foram salvas no formato MOL2.

As estruturas dos ligantes tiveram a adição dos hidrogênios polares no PyMol. Em seguida, as estruturas foram carregadas no ADT e aplicadas a função de ligante as quais o ADT

atribuiu automaticamente a mesclagem dos hidrogênios não-polares e adição das cargas atômicas parciais pelo método de Gasteiger (KUMAR, A; BORA, U., 2014).

5.1.4 *Estudos de ancoramento molecular para validação (redocking)*

Visto que a estrutura cristalográfica da topoisomerase II α (PDB ID: 5GWK) está co-cristalizada com a molécula do etoposídeo, e a estrutura do Bcl-2 (PDB ID: 4AQ3) está co-cristalizada com a fenilacilsulfonamida, foi realizada a redocagem como método de validação. Este método consiste em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão aos estudos de ancoramento molecular e observar se as interações com os resíduos de aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante são preservados, ou seja, que o RMSD (*root-mean-square deviation*) entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico*.

5.2 *Estudos de ADME*

Os compostos sintetizados foram submetidos a estudos farmacocinéticos e de predição de possíveis alvos biológicos a partir dos dados obtidos, através do programa online SWISS ADME (SWISS ADME, 2017), o qual faz uma correlação da estrutura em estudo com outros milhares de estruturas disponíveis em seu banco de dados gerando variados dados físico-químicos e farmacocinéticos.

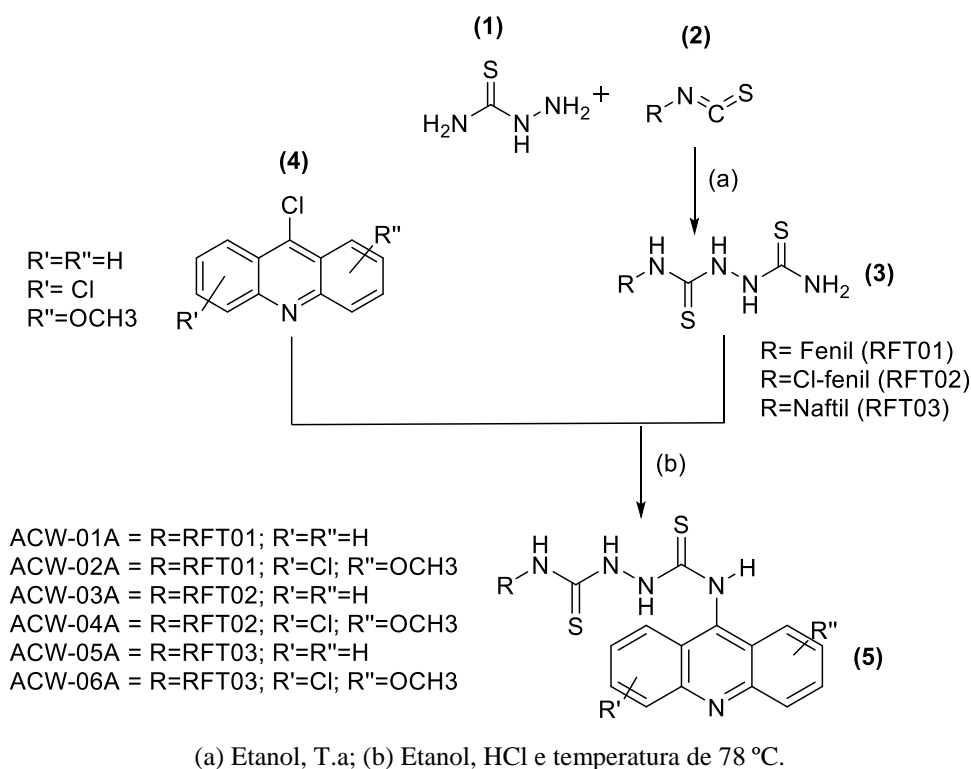
5.2.1 *BOILED-EGG para predição de absorção gastrointestinal e penetração da barreira hemato-encefálica*

Com a finalidade de prever a permeação da barreira hemato-encefálica e a absorção gastrointestinal de pequenas moléculas o método de permeação *Brain Or IntestinaL EstimateD* (BOILED-Egg) é proposto como um modelo preditivo acurado que funciona através do cálculo da lipofilicidade e polaridade de pequenas moléculas. O BOILED-Egg pode ser aplicado em uma variedade de configurações, desde a filtragem de bibliotecas químicas nas etapas iniciais da descoberta de drogas, até a avaliação de candidatos a medicamentos para o desenvolvimento (DAIANA, A.; ZOETE, V. et al., 2016).

5.3 Síntese, caracterização e comprovação estrutural dos novos compostos

A obtenção dos intermediários carbotoioamídicos (3) aconteceu através de uma reação de adição nucleofílica entre a tiossemicarbazina (2) e isotiocianato (1), em etanol a 50 °C, formando a *N*-fenilidrazina-carbotoioamida (3). Em seguida, a 9-cloroacridina (4) (Sigma Aldrich) não-substituída ou a 6,9-di-cloro-2-metoxi acridina, foram acopladas aos intermediários *N*-fenilidrazina-carbotoioamida por meio de uma reação de substituição nucleofílica no aromático a 78 °C em meio etanólico e ácido, de acordo com o Esquema 4.

Esquema 4 – Rota sintética dos derivados *N*-fenilidrazina-carbotoioamida acridínicos (5).



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Depois de sintetizados, os derivados foram purificados por diferentes métodos de purificação, a depender do composto, incluindo: recristalização usando co-solventes, e técnicas cromatográficas de coluna.

Em seguida todos os compostos tiveram suas características físico-químicas determinadas, que se fazem saber: aparência, solubilidade, cálculo do fator de retenção (R_f), faixa de fusão e rendimento. E por último, tiveram suas estruturas comprovadas através de diversos métodos físico-químicos, incluindo: Espectrometria de Massas (EM – Espectômetro

Eletrospray Shimadzu LC/MS-IT-TOF em modo positivo), espectroscopia de infravermelho (IV – FTIR, IRPrestige-21, da Shimadzu®, com dados tratados no programa Origin 8.0), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H – Bruker Avance, 500 e 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C - Bruker Avance, 125 MHz (DEPT Q) e 75 MHz), sendo o tratamento dos espectros de RMN realizados no programa MestReNova 11.0.3.

5.3.1 Procedimento geral para a síntese dos compostos referente a série ACW

5.3.1.1 Obtenção dos intermediários carbotioamídicos

Em um balão de 125 mL de fundo redondo, foram adicionados 0,2000 g (0,0022 mol) de tiossemicarbazida e 1 eq. Molar de isotiocianato (Fenil, Cl-fenil e Naftil), em 10 mL de etanol, colocados sob agitação e refluxo à temperatura de 50 °C por aproximadamente 1 hora. A reação foi acompanhando por CCDA. Após a finalização da reação, foi inserido etanol gelado pois a precipitação ocorreu em meio reacional após o resfriamento da solução, sendo filtrado em seguida e lavado com etanol gelado. Os produtos obtidos foram deixados em uma capela de exaustão por alguns dias para secagem total dos mesmos.

5.3.1.2 Obtenção dos derivados acridínicos

Em um balão de 125 mL de fundo redondo, foram adicionados 0,2000 g (0,0009359 mol) do núcleo acridínico substituído ou não (Sigma Aldrich), 0,2118 g do intermediário *N*-fenilidrazina-carbotioamida (RFT01 ou RFT02 ou RFT03), em equivalência molar de 1:1, e 2 gotas de HCl como catalizador da reação, em 8 mL de etanol, colocados sob agitação e refluxo à temperatura de 78 °C por aproximadamente 1 hora. A reação foi acompanhando por CCDA. Após a finalização da reação, foi inserido no balão água destilada gelada o que favoreceu a formação do precipitado, sendo que o mesmo foi filtrado em seguida, e lavado diversas vezes com água destilada.

Os produtos obtidos foram deixados em uma capela de exaustão por alguns dias para secagem total dos mesmos. Os compostos secos foram submetidos a análise de pureza através de CCDA o qual se observou a presença de acridona, e por este motivo, o precipitado foi recristalizado em etanol com aquecimento, onde após alguns minutos, a solução foi novamente

filtrada, sendo desprezado os cristais filtrados e, após resfriamento da solução, ocorreu a precipitação do produto final contendo apenas resquícios de acridona.

5.4 *Diferentes procedimentos para melhoramento do rendimento dos derivados obtidos*

A princípio, foram tomados como reagentes de partida o intermediário *N*-fenilhidrazina-1,2-bis(carbotioamida) (RFT01) e a 9-cloroacridina, sendo submetidos ao teste de solubilidade aparente em T.A. e aquecimento até o ponto de ebulição de cada solvente, sendo escolhido para o teste os solventes metanol, propanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfoxido, acetato de etila e água.

Em seguida, foram escolhidos os dois melhores solventes (etanol e propanol), onde foram realizadas algumas reações variando o solvente, ausência ou presença de catalizador e temperatura (variando entre 0 °C e 98 °C), tendo como reagentes o intermediário RFT01 (0,04 g de RFT01 (0,00017 mol)) e a 9-cloroacridina (1 eq. molar) (Tabela 1).

Tabela 1 - Diferentes condições reacionais para melhoramento da rota sintética com a finalidade de obter melhores rendimentos

REAÇÃO	SOLVENTE	TEMPERATURA	CATALISADOR
A	ETANOL	78°C	HCl
B		0°C	AUSENTE
C		78°C	AUSENTE
D		0°C	HCL
E	PROPANOL	98°C	HCl
F		0°C	AUSENTE
G		98°C	AUSENTE
H		0°C	HCL

Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 *Planejamento experimental*

A influência das condições reacionais (fatores) no rendimento, foi verificada através de um planejamento fatorial constituído de 08 experimentos com uma repetição no melhor resultado. A escolha dos fatores e dos níveis foi baseada em estudos preliminares, sendo considerado para este sistema, a influência de três variáveis de controle: solvente (SOLV), temperatura (TEMP) e catalisador (CAT), em uma variável resposta específica do processo (Rendimento). Os seguintes níveis foram adotados: solvente propanol (-1) e etanol (+1), Temperatura 0 °C (-1) e 78 °C (+1) e catalisador presente (-1) e ausente (+1).

A matriz do experimento é mostrada na Tabela 2, com os valores reais e características empregadas nas sínteses. Os resultados foram analisados através da técnica da Análise de Variância (ANOVA) empregando o programa Statistica10.

Tabela 2 - Variáveis independentes no planejamento experimental 2³

Variáveis	Níveis	
	Baixo (-1)	Alto (+1)
Solvente	Propanol	Etanol
Temperatura	0 °C	78 °C
Catalisador (HCl) (mL)	0,1	0

Fonte: Elaborado pelo autor

5.6 Estudos da interação ao DNA

5.6.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção de UV/v

Foram preparadas soluções dos compostos ACW com concentração de 1 mM. A partir desta, foram preparadas soluções diluídas com concentrações de 10, 25, 50 e 100 µM em tampão Tris-HCl (0,001 M e pH 7.6) e analisados em aparelho espectrofotômetro Ultrospec 3000 PRO por varredura de 200-900 nm, usando cubeta de quartzo com 1 cm caminho óptico, à 20° C (GAO et al., 2010). As interações com DNA dos compostos produzidos foram avaliadas por meio de modificações nos espectros de absorção dos compostos na presença de concentrações crescentes de DNA de timo bovino (ctDNA - Sigma) de acordo com a metodologia com a fórmula: $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/Kb(\epsilon_b - \epsilon_f)$ (MCGHEE; VON HIPPEL, 1974). A titulação com espectroscopia é um método eficaz para examinar os modos de ligação de complexos com DNA, pois as mudanças observadas na formação de espectros podem dar evidência do modo de interação que ocorreu (SALEM, et al., 2016).

5.7 *Interação com BSA*

5.7.1 *Espectroscopia Eletrônica de fluorescência*

Foi utilizado solvente DMSO na preparação das soluções mãe e tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) na análise das interações com BSA (Albumina de Soro Bovino). A BSA foi obtida da Sigma Aldrich e o aparelho empregado na análise de obtenção dos espectros de Ultravioleta-visível (UV-vis) foi o Espectrofotômetro de UV-vis Ultrapasse 3000 PRO e espectrofluorímetro.

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução mãe) e as soluções de trabalho foram preparadas por diluição em tampão Tris-HCl nas seguintes concentrações: 2, 4, 6, 8 e 10 μ M (para análise da absorção) e 2, 4, 6, 8, 10 e 20 μ M (para análise da fluorescência). A concentração de BSA foi fixada em 10 μ M. Os estudos de absorção foram feitos por meio de varredura de 200-900 nm e de fluorescência por meio da excitação em 285 nm.

Alterações no espectro de fluorescência da BSA na presença de quantidades crescentes dos compostos podem fornecer informações relativas ao modo de interação. O sistema foi agitado e incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos e as medições foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento do percurso de 1cm. O espectro de absorção UV-vis da BSA, na presença e na ausência dos derivados triazolidínicos acridínicos, mostrou absorção na região entre 250 e 400 nm.

Os espectros de emissão foram registrados na região de 310-400 nm usando um comprimento de onda de excitação de 285 nm, com bandas de excitação e de emissão de 2,5 nm e 2,5 nm, e sensibilidade alta. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

5.8 *Avaliação da citotoxicidade*

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (câncer de mama), HL60 (leucemia promielocítica aguda) e HCT 116 (câncer de cólon), mantidas em meio de cultura RPMI-1640. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL. Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 20 mM das amostras, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foram produzidas soluções de trabalho na concentração de 50 μ M, diluídas em meio RPMI-1640, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação a placa foi centrifugada (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 μ L do sobrenadante, sendo adicionado 10 μ L de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). A placa foi incubada por 3 h em estufa de 5% de CO₂, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi adicionado 100 μ L de SDS (10% HCL 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. A placa foi coberta com um papel alumínio e deixada overnight em um agitador. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

O experimento foi realizado em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Docking molecular

6.1.1 Redocking

Inicialmente, foram realizados os estudos de *redocking* entre o ligante e a enzima co-cristalizada, sendo o Etoposídeo o ligante co-cristalizado com a Topoisomerase II α . No B-DNA que não apresenta ligante complexado a sua estrutura, não foi necessário a realização do *redocking*.

A seguir, está disposto na Tabela 11 o resultado de *redocking* da Topoisomerase II α complexada com o DNA (PDB ID: 5GWK, onde constam os valores de Energia Livre de Ligação (kcal.mol⁻¹), a constante de afinidade (K_i) (nM) e o valor de RMSD (Desvio médio quadrático do ligante antes e depois do ancoramento) da entropia do grupamento (*clustering*).

Tabela 3 - Valores do *redocking* das enzimas Topoisomerase II α (5GWK) e da Bcl-2 (4AQ3)

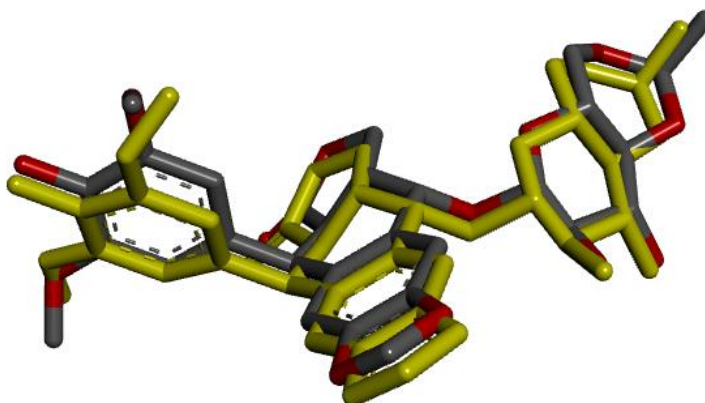
Enzima	Energia Livre de Ligação (Kcal mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (k _i)(nM)	RMSD (<i>clustering</i>) (Å)
5GWK	Etoposídeo		
	-12,19	1,15	0,18

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com a Tabela 4, o *redocking* do Etoposídeo com sua respectiva enzima apresentou forte interação, uma vez que quanto menor a energia livre de ligação maior será a afinidade do ligante com a enzima, nesse caso, o ligante apresenta forte atividade inibitória. Outra informação que corrobora com o resultado obtido é a previsão da constante de afinidade K_i com valores extremamente baixos. Por fim, a validação da metodologia se dá pelos valores de RMSD (*clustering*), o qual, como descrito na metodologia, deve apresentar valores < 2,0 Å.

Na Figura 27 (pág. 61) é possível visualizar a posição espacial de cada átomo do ligante etoposídeo co-cristalizado (em amarelo) e do mesmo ligante redocado (em cinza).

Figura 27 - Redocking do Etoposídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando a Figura 22 é possível verificar que a posição espacial dos átomos do etoposídeo redocado é muito semelhante ao mesmo ligante co-cristalizado com a estrutura 5GWK, estando em acordo com o valor de RMSD disposto na Tabela 11. Ainda na mesma figura, observa-se uma pequena diferença entre os ligantes em relação as metoxilas do anel aromático, ocorrendo uma ligeira variação na posição espacial, uma vez que a ligação do grupamento metoxila com o anel benzênico possui rotação livre. Dessa forma, entende-se que o modelo computacional é eficiente em suas previsões, mas possui limitações que devem ser avaliadas cuidadosamente para cada ligante.

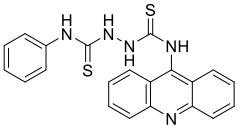
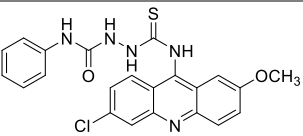
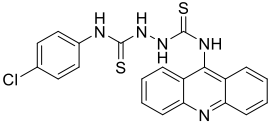
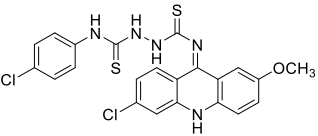
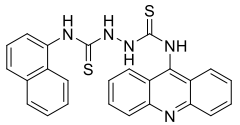
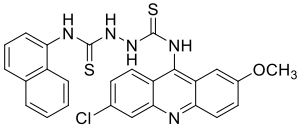
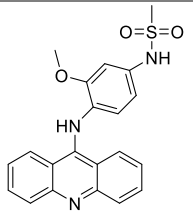
6.1.2 Docking molecular das estruturas propostas

Foram submetidos aos estudos de *docking* molecular as 6 estruturas propostas, sendo testadas a interação com o complexo TopoII α /DNA (PDB ID: 5GWK) e o B-DNA (PDB ID: 1BNA), este último para avaliação da atividade de interação com os sulcos (menor ou maior) do DNA.

Na Tabela 5 encontram-se descritos os resultados do *docking* molecular dos compostos. Também foi realizado o ancoramento da Amsacrina (*m*-MSA) por ser um fármaco inibidor de TopoII α e intercalador de DNA, nos quais foram gerados valores de energia de interação sendo selecionados os melhores resultados para cada estrutura. Foram levados em consideração os resultados de Energia Livre de Ligação (kcal mol⁻¹), o qual, quanto menor o valor, melhor será a interação entre enzima e ligante, e os valores de previsão da Constante de Afinidade (ki) (nM),

os quais apresentarem valores mais baixos indicam maior afinidade do ligante a estrutura cristalográfica.

Tabela 4 - *Docking* molecular entre as estruturas propostas, a Amsacrina (*m*-MSA) e a TopoII α /DNA (5GWK) e B-DNA (1BNA)

Composto	5GWK		1BNA	
	Energia Livre de Ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki)(nM)	Energia Livre de Ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki)(nM)
ACW-01A 	-9,52	105,12	-9,16	194,25
ACW-02A 	-9,80	65,15	-9,52	104,93
ACW-03A 	-9,93	52,31	-9,94	51,49
ACW-04A 	-10,34	26,56	-10,45	21,72
ACW-05A 	-10,91	10,13	-9,97	49,19
ACW-06A 	-11,02	8,39	-10,45	21,75
<i>m</i> -MSA 	-10,13	37,62	-10,03	44,80

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao analisar a Tabela 5, observou-se que os compostos ACW-04A, ACW-05A e ACW-06A apresentaram valores de energia menores que a Amsacrina no *docking* para TopoII/DNA,

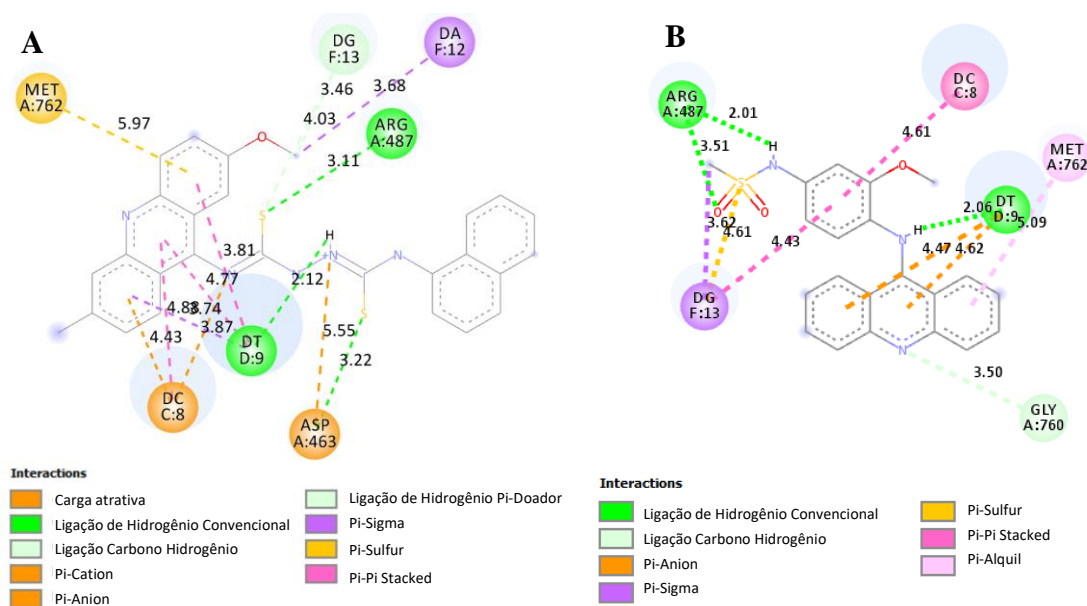
sugerindo que estes compostos podem se apresentar como fortes candidatos a inibidores da Topoisomerase II humana. Já em relação ao *docking* com o B-DNA, somente os compostos ACW-04A e ACW-06A, ambos apresentando núcleo de acridina di-substituído, apresentaram interação com o B-DNA mais forte do que a Amsacrina.

Para as interações com o complexo TopoII/DNA, de modo geral, os compostos que apresentam o núcleo de acridina di-substituído parecem ser mais favorecidos a uma maior interação com esta enzima. Esta mesma análise se faz também para a interação com o B-DNA, porém apresentar forte interação não necessariamente o classifica como intercalador. Uma vez que ocorre a interação por ligações covalentes, caracteriza-se que a estrutura molecular interage com o B-DNA através dos sulcos, e desta forma, esta interação não se classifica como intercalador. Todavia, havendo uma interação forte com o B-DNA, mesmo que pelos sulcos maior ou menor, é possível que a molécula que está interagindo atue como inibidor do crescimento de células uma vez que inibe os processos envolvidos no crescimento molecular a partir do DNA.

A importância do núcleo de acridina na atividade inibitória da topoisomerase II humana e também atuando como intercalador é corroborado com os estudos de Gouveia e colaboradores (2018), os quais submeteram compostos derivados da acridina a estudos de *docking* molecular ao complexo TopoII/DNA e a interação com B-DNA. Os mesmos observaram que seus compostos apresentaram fortes interações com a Topoisomerase II α e, concomitantemente, suas estruturas atuaram como intercaladores de DNA devido a planaridade do núcleo acridínico, o qual interagiu entre as bases nitrogenadas por interações hidrofóbicas, corroborando com os resultados aqui obtidos

A figura 28 (pág. 64) ilustra as interações entre o ACW-06A, composto com melhor resultado de interação ($-11,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e o complexo TopoII/DNA, comparado com a Amsacrina ($-10,13 \text{ kcal.mol}^{-1}$), no qual é possível identificar que o composto ACW-06A apresentou interações semelhantes com Amsacrina como por exemplo ponte de hidrogênio com Arg-487 (referente ao resíduo da TopoII α) e Timina-9 (base nitrogenada do DNA). Além do mais, o ACW-06A apresentou um maior número de interações no somatório geral do que a Amsacrina, justificando uma energia menor e, conseqüentemente, uma maior interação.

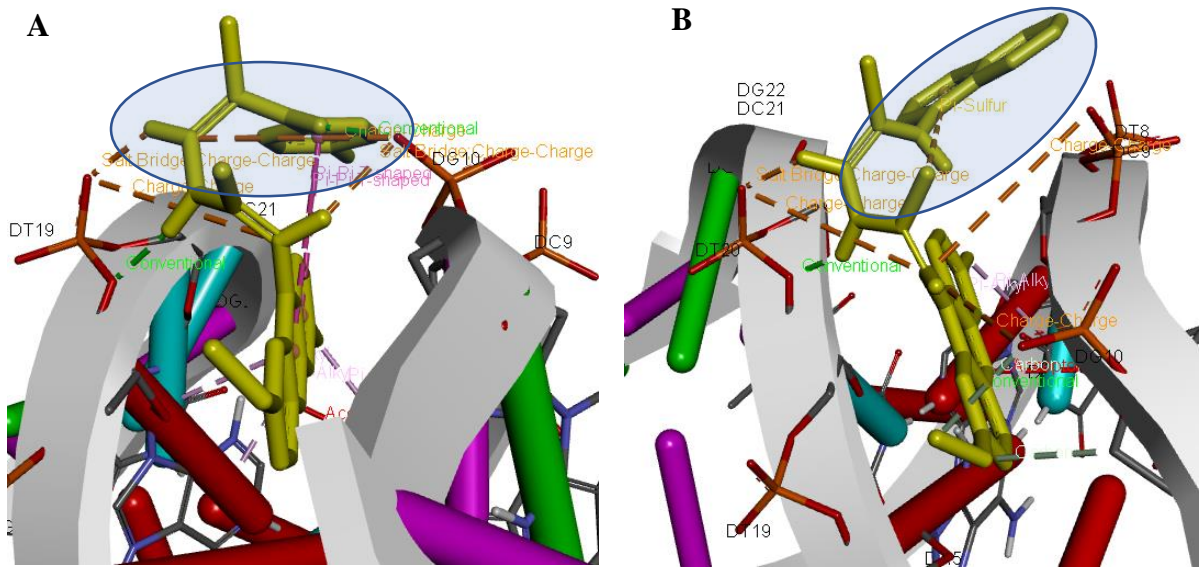
Figura 28 - *Docking* do ACW-06A (A) e Amsacrina (B) com o complexo TopoII/DNA



Fonte: Elaborado pelo autor

Assim como ocorreu para o *docking* entre os compostos e o complexo TopoII/DNA, o mesmo se observou para as interações com o B-DNA onde os compostos com núcleo de acridina di-substituído apresentaram maior interação, isso devido à presença da metoxila no anel acridínico apresentando efeito doador de elétrons favorecendo interações mais fortes. Contudo, os resultados dos compostos ACW-04A ($-10,45 \text{ kcal.mol}^{-1}$) e ACW-06A ($-10,45 \text{ kcal.mol}^{-1}$), ambos apresentando núcleo acridínico di-substituído diferindo apenas na porção do fenilisotiocianato apresentando um substituinte Cl-fenil no ACW-04A e um naftil no ACW-06A, apresentaram mesmo valor de energia de interação. Todavia, essa diferença nesses substituintes não foi significativa para a interação uma vez que as regiões que apresentaram maior interação com o B-DNA foram o núcleo de acridina e a porção carbotioamida, como observado na figura 29 (pág. 65).

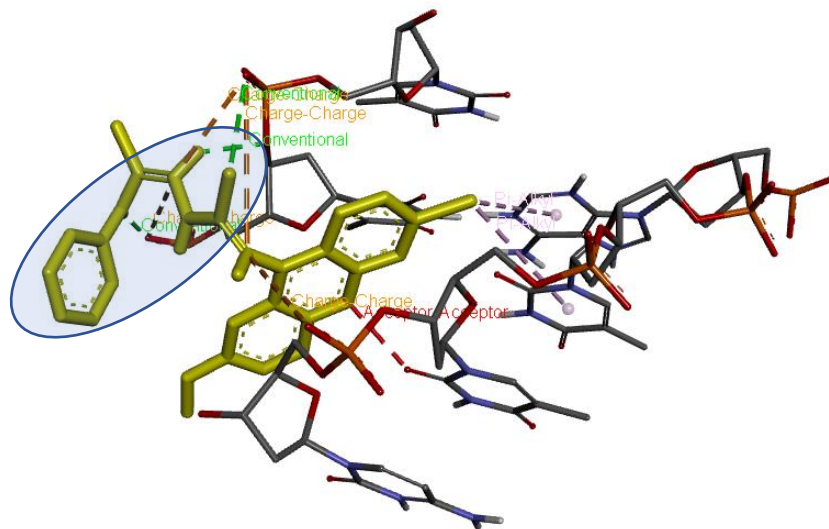
Figura 29 - Interação dos compostos ACW-04 (A) e ACW-06 (B) com o B-DNA



Fonte: Elaborado pelo autor

Como ilustrado na figura 29, a porção Cl-fenil e naftil, respectivamente, apresentaram interação intramolecular favorecendo a conformação maior rigidez, e conseqüentemente, melhorando a interação destes compostos com o B-DNA. Diferentemente dos compostos que apresentam o grupo fenil sem substituinte como por exemplo o ACW-02A, o qual não apresentou interação intramolecular entre o grupo citado e o resto molécula, tornando estrutura molecular mais flexível, como visualiza-se na Figura 30.

Figura 30 - Interação entre o ACW-02A e o B-DNA



Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Caracterização físico-química e elucidação estrutural dos derivados acridínicos

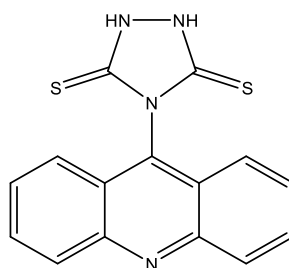
Foram realizadas quatro (04) análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C dos seis (06) compostos sintetizados (ACW-01A, ACW-02A, ACW-04A e ACW-06A)

As análises espectroscópicas a seguir mostram uma padronização dos picos sugerindo na obtenção de um composto diferente dos propostos, no qual se observou desfragmentação com perda do grupo anilina, seguido de uma ciclização intramolecular do intermediário carbotioamídico formando um núcleo inédito triazolidínico-ditiona acoplado ao núcleo de acridina. E assim, com a desfragmentação da região citada anteriormente e a formação do núcleo triazolidínico-ditiona, observou-se nos espectros que as estruturas ACW-01A e ACW-04A, bem como o ACW-02A e ACW-06A, apresentavam similaridade nos picos confirmando que ambos apresentam a mesma estrutura molecular, e desta forma, os compostos foram renomeados para ACW-01B e ACW-02B.

Esta grande descoberta foi comprovada pelos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , seguidos dos espectros de infravermelho e espectrometrias de Massas.

6.2.1 Caracterização e comprovação estrutural do derivado 4-(acridin-9-il)-1,2,4-triazolidine-3,5-dithione (ACW-01B)

Figura 31 - Estrutura molecular do ACW-01B



Fonte: Elaborado pelo autor

F.M.: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2$

M.M.: $310,3930 \text{ g mol}^{-1}$

Característica Física: Sólido Vermelho

Rf: 0,36 – Hexano/Acetato de Etila (7:3). Revelador: Lâmpada de UV

Rendimento: 39%

Faixa de Fusão: $294\text{-}298^\circ\text{C}$ **Log P:** 4,33

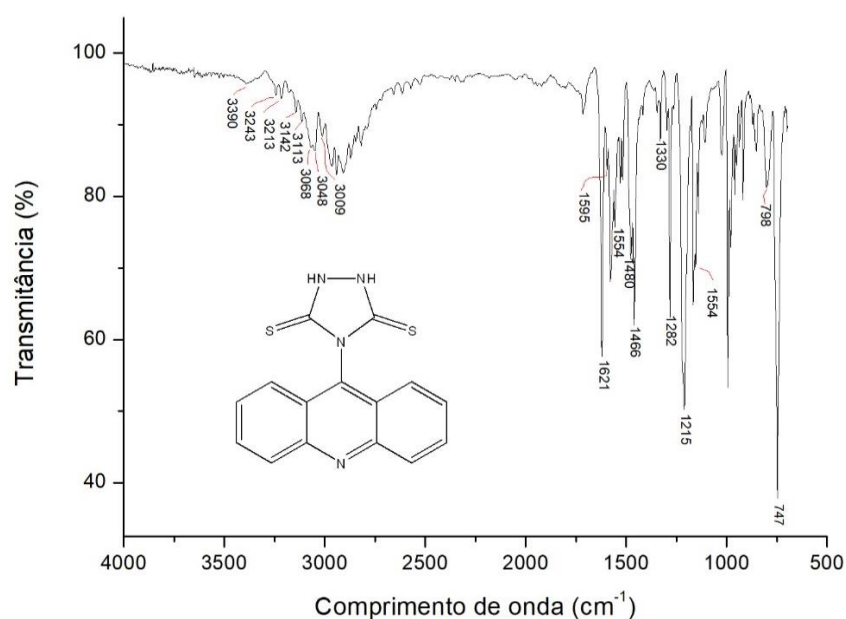
Tabela 5 - Valores de infravermelho do ACW-01B

Composto	IV (KBr), ν (cm^{-1})
ACW-01B	3390 (ν N-H _{Ar}); 3142-3009 (ν C-H _{Ar}); 1621-1466 (ν C=C _{Ar}); 1480 (ν N-C=S); 1215 (ν C=S)

Na Tabela 5 encontram-se descritos as principais bandas de absorção dos grupos funcionais do ACW-01B. No espectro de infravermelho (Figura 32), foi possível identificar uma banda de absorção em 3390 cm^{-1} sugestivo de deformação axial de N-H. Entre 1595 - 1330 cm^{-1} foram observadas bandas de absorção sugestivas de deformação axial do anel aromático. As bandas de absorção sugestivas de deformação axial de C-H aromático foram observadas entre 3142 - 3009 cm^{-1} , e deformação angular fora do plano em 747 cm^{-1} .

De acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2015), o grupo C=S é menos polar do que o grupo C=O e a ligação é consideravelmente mais fraca. Em consequência, a banda não é intensa e localiza-se em frequências mais baixas do que a carbonila, sendo, portanto, mais suscetível a efeitos de acoplamento. A identificação é frequentemente difícil e incerta. Contudo, quando é possível a identificação dos compostos tiocarbonilados, mostram uma absorção na região de 1250 - 1020 cm^{-1} . Além disso, os autores afirmam que, o grupo tiocarbonila, quando ligado a nitrogênio, apresentará uma banda na região de absorção habitual de deformação axial C=S e várias outras na região ampla de 1563 cm^{-1} a 700 cm^{-1} .

Figura 32 - Infravermelho (IV) do ACW-01B.



Fonte: Elaborado pelo autor

Ainda analisando o espectro de infravermelho do ACW-01B (Figura 32, pág. 67), é possível observar uma banda em 1215 cm^{-1} sugestivo de C=S. Várias bandas de intensidade moderada aparecem na região ampla de $1554\text{-}798\text{ cm}^{-1}$ que podem ser atribuídas à interação entre as deformações axiais de C=S e de C-N.

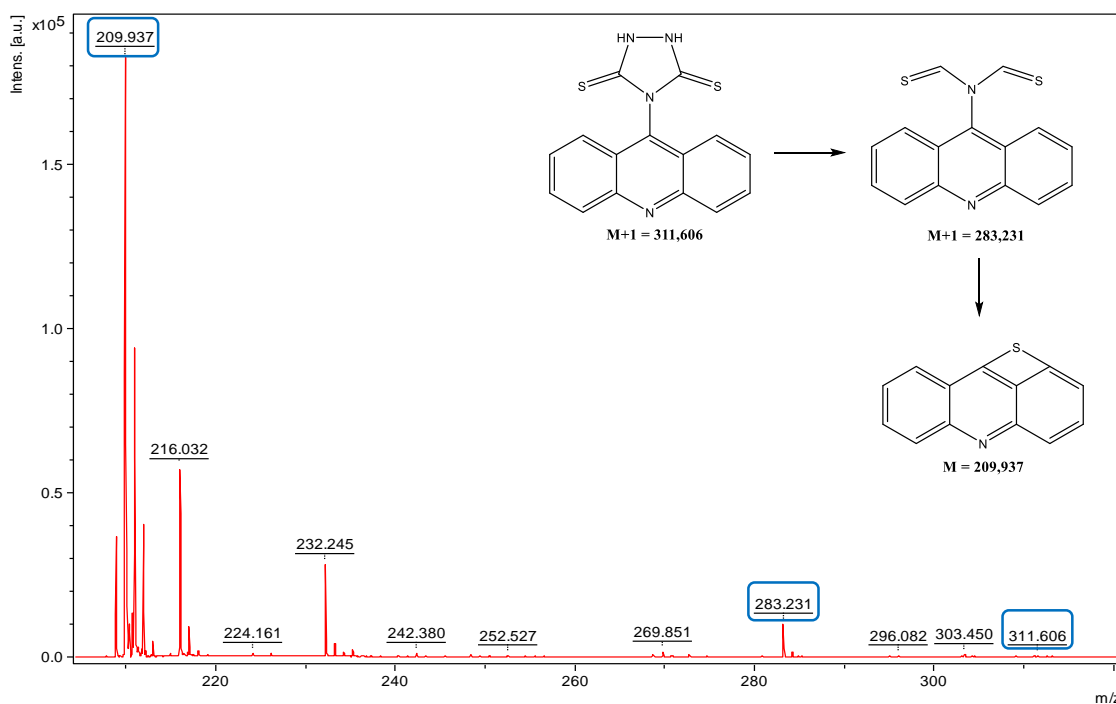
Na tabela 6 pode ser observado o valor de massa exata do íon molecular, tanto o valor obtido quanto o calculado.

Tabela 6 - Valores de massa calculada e obtido do ACW-01B

Composto	Massa Calculada	M/Z	Massa Encontrada
ACW-01B	310,0347	311.0380 (16.2%), 312.0305 (9.0%)	311,6060

De acordo com a Figura 33, observou-se em $m/z = 311,606$ relativo ao íon molecular (M+1). Por conseguinte, ocorreu uma fragmentação com liberação de N_2 obtendo um fragmento com $m/z = 283,231$ (M+1). Em seguida, aconteceu um rearranjo [3,3] sigmatrópico de Claisen resultando em um fragmento $m/z = 209,937$ correspondente ao pico do íon base.

Figura 33 - Espectro de massas ampliado do ACW-01B por MALD-TOF



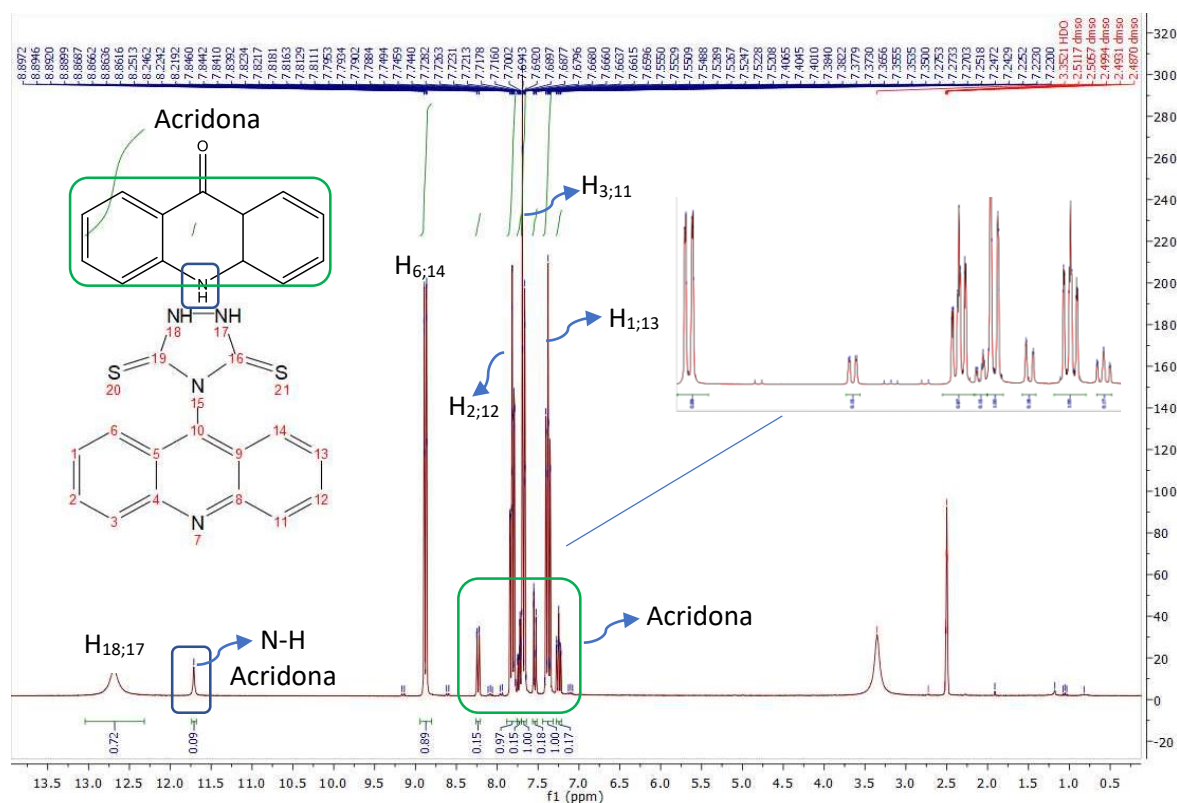
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H do ACW-01B (300 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz)

Composto	Deslocamento (δ ppm)
ACW-01B	$\delta = 7,35$ a $7,40$ (2H, <i>m</i> , H-1 e H-13); $7,68$ (2H, <i>dt</i> , J = 8,49 Hz; J = 1,38 Hz, H-3 e H-11); $7,78$ a $7,84$ (2H, <i>m</i> , H-2 e H-12); $8,88$ (2H, <i>dt</i> , J = 8,55 Hz; J = 1,56 Hz, H-6 e H-14); $12,69$ (2H, <i>s</i> , H-18 e H-17).

De acordo com o espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) (Figura 34), foi possível observar um sinal largo na forma de singlete com integral para 2H com deslocamento em δ_{H} 12,69 característico de NH referente ao núcleo triazolidínico. Também foram observados vários multipletos na região do aromático com integral para 8H. Em contrapartida, observou-se a presença de picos em menores intensidades correspondente a 1/3 (33%) do produto obtido, referentes a estrutura da acridona, presente em um dos reagentes de partida devido a possível oxidação do carbono ligado ao cloro da 9-cloroacridina.

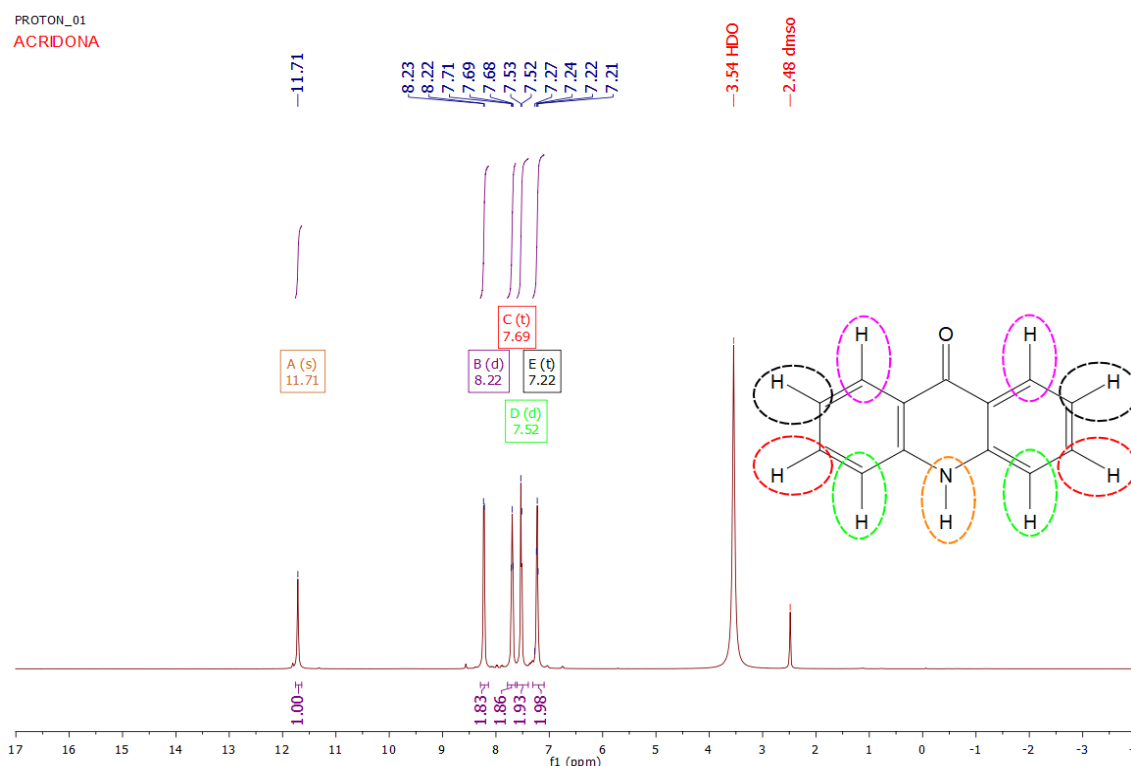
Os resultados observados no espectro de RMN de ^1H do composto ACW-01B corroboraram com os obtidos por Tiwaria e colaboradores (2017) em relação a identificação e comprovação estrutural do núcleo triazolidínio, os quais identificaram sinais característicos do anel triazolidínico, confirmado pelo singlete em δ_{H} 12,48 (1H) referente a um grupo NH ligado a uma tiocarbonila.

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H do ACW-01B (300 MHz, DMSO- d_6)

Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação aos picos sugestivos de acridona presente no RMN de ^1H do ACW-01B são confirmados quando equiparados com os espectros de RMN de ^1H (Figura 35) da molécula de acridona a qual foi sintetizada e submetida as técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C para servir como base na leitura dos espectros dos derivados acridinícos, uma vez que a mesma está presente no reagente comercial e também pode ser formada durante o processo reacional.

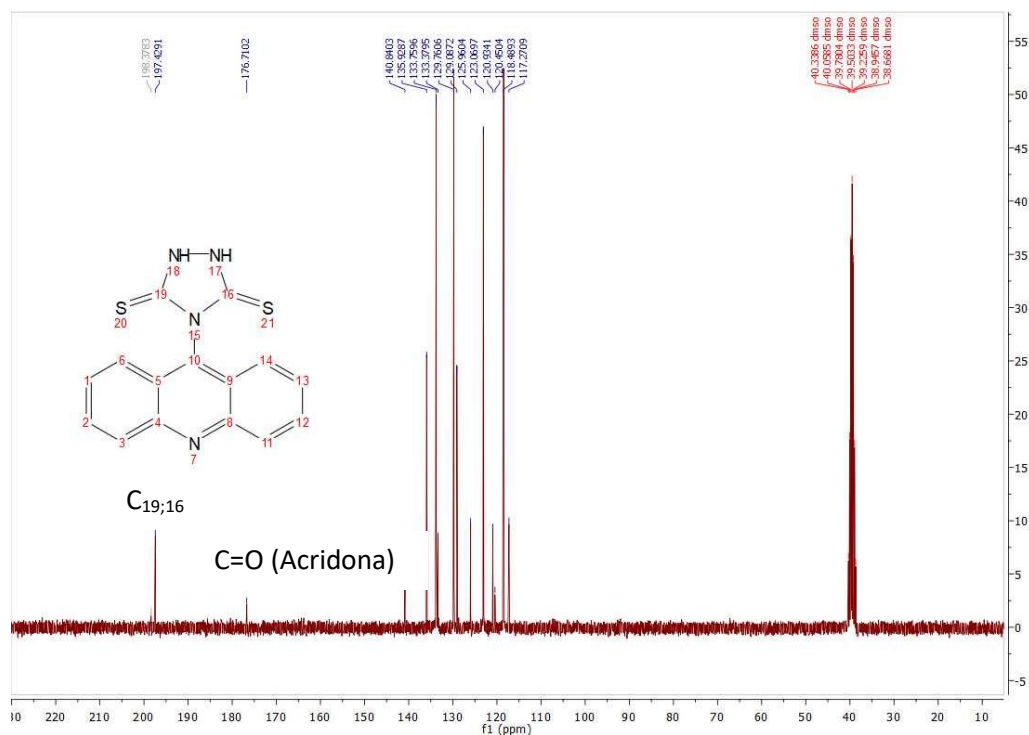
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H da molécula de acridona



Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação ao espectro de RMN de ^{13}C do ACW-01B (Figura 36, pág. 71), nota-se um padrão de deslocamento químico para os carbonos tanto do núcleo acridínico quanto para o triazolidínico, com ressalvas para os carbonos da tiocarbonila os quais apresentaram deslocamento em δ_{C} 197,42.

Contudo, também foi possível identificar a presença de acridona, principalmente pelo pico característico de carbonila em δ_{C} 176,7102 (BELLET, et al., 2012; MACHADO, 2016). Também foram identificados os demais picos referentes a acridona, porém em intensidades menores com concentração de aproximadamente 33% da mesma.

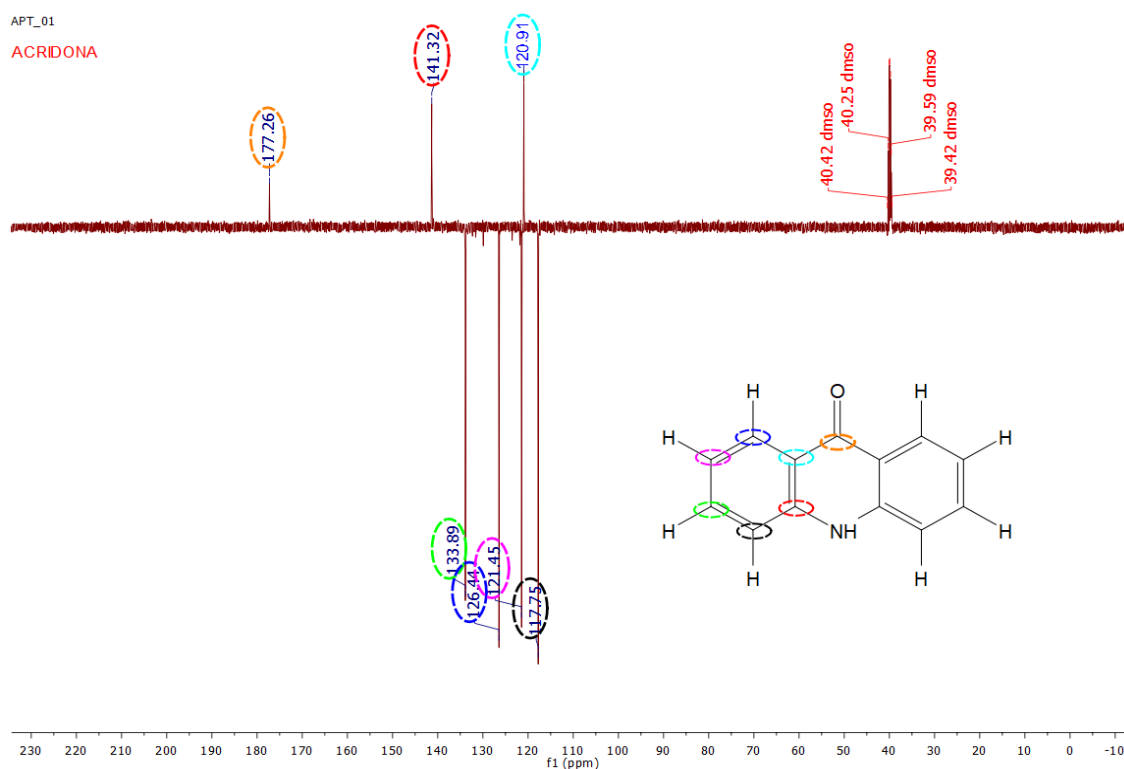
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C do ACW-01B (75 MHz, DMSO- d_6)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C do ACW-01B (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm), J (Hz)

Composto	Deslocamento (δ ppm)
ACW-01B	$\delta = 118,4893$ (C-5 e C-9); $123,0697$ (C-3 e C-11); $129,0872$ (C-1 e C-13); $129,7606$ (C-6 e C-14); $133,3795$ (C-2 e C-12); $135,9287$ (C-4 e C-8); $197,4291$ (C-19 e C-16).

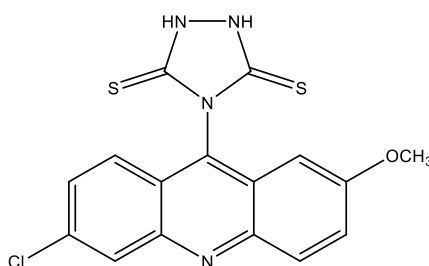
Também foi possível confirmar a presença de acridona através dos espectros de RMN de ^{13}C do ACW-01B (Figura 36) e do espectro de RMN de ^{13}C da acridona (Figura 37, pág. 72), principalmente pelo pico característico de carbonila $\delta_{\text{C}} 176,71$ (Figura 36) e $\delta_{\text{C}} 177,26$ (Figura 37, pág. 72) (BELLET, et al., 2012; MACHADO, 2016). Da mesma forma foram identificados os demais picos referentes a acridona, porém em intensidades menores pois apresentava baixa concentração da mesma.

Figura 37 - RMN de ^{13}C , técnica APT, da acridona

Fonte: Elaborado pelo autor

6.2.2 Caracterização e comprovação estrutural do derivado 4-(6-cloro-2-metoxiacridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-02B)

Figura 38 - Estrutura molecular do ACW-02B



Fonte: Elaborado pelo autor

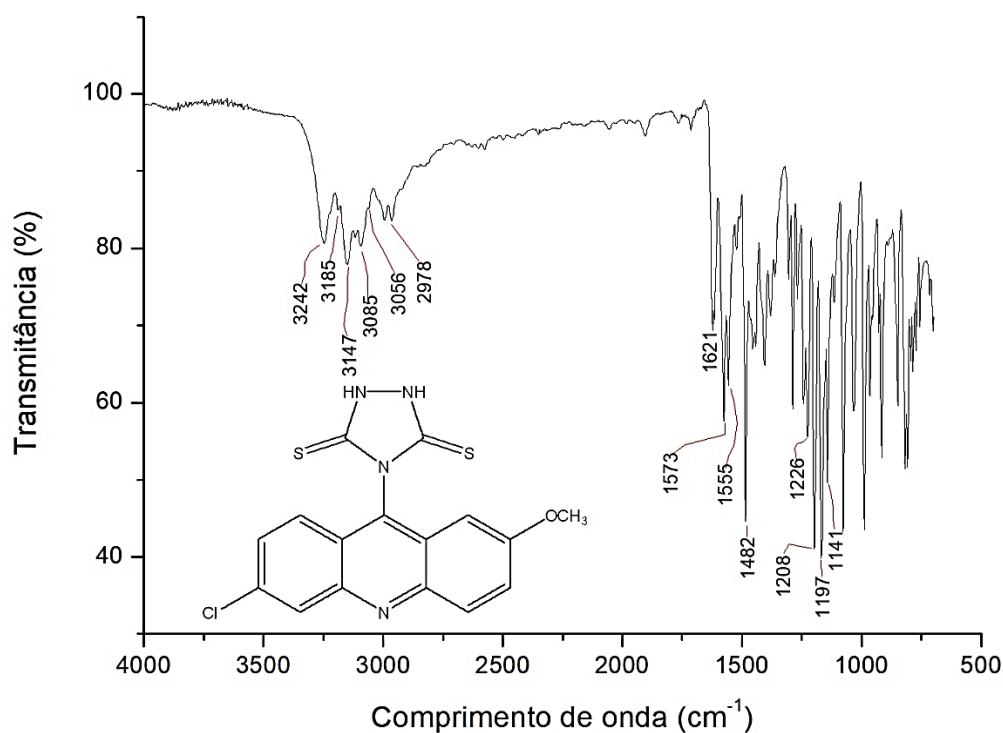
F.M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{OS}_2$ **M.M.:** $374,8610 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **Característica Física:** Sólido Laranja**Rf:** 0,50 – Hexano/Acetato de Etila (7:3). Revelador: Lâmpada de UV**Rendimento:** 50%**Faixa de Fusão:** 282-284 °C**Log P:** 4,76

Tabela 9 - Valores de infravermelho do ACW-02B

Composto	IV (KBr), ν (cm^{-1})
ACW-02B	3242 (estiramento N-H amina secundária); 3085-3056 (estiramento C-H _{Ar}); 2973 (estiramento C-H carbono sp ³); 1621 (dobramento N-H); 1573-1482 (estiramento C=C _{Ar}); 1482 (estiramento N-C=S); 1208 (estiramento C=S); 1197 (estiramento C=C-O)

No espectro de infravermelho (Figura 39), foi possível identificar, por exemplo, uma banda de absorção em 3242 cm^{-1} sugestiva de amina secundária. As bandas de absorção sugestivas de deformação axial de C-H aromático foram observadas na faixa de 3085 a 3056 cm^{-1} . Também foi possível observar uma banda de deformação axial de tiocarbonila (C=S) em 1208 cm^{-1} . Em 1197 cm^{-1} foi possível visualizar uma banda sugestiva de deformação axial assimétrica de C = C - O.

Figura 39 - Infravermelho do ACW-02B



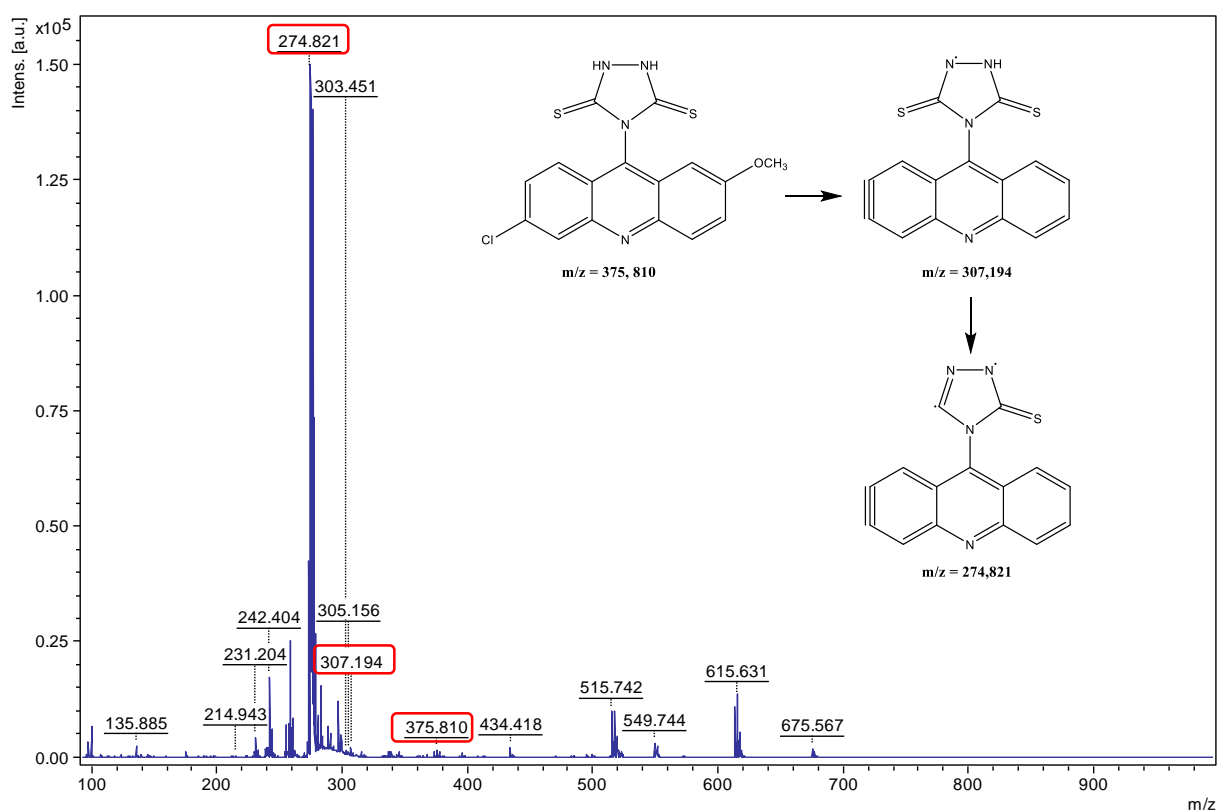
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 10 - Valores de massa calculada e obtido do ACW-02B

Composto	Massa Calculada	M/Z	Massa Encontrada
ACW-02B	374,0063	376.0033 (32.0%), 375.0096 (17.3%)	375,8100

A seguir estão dispostos os resultados com os espectros de massas por duas técnicas, MALDI-TOF, técnica de desorção/ionização a laser com matriz (Figura 40), e através da técnica de ESI (Figura 41, pág. 75), no qual a técnica se baseia pelo acoplamento e ionização por nebulização em um campo elétrico, obtendo uma série de picos, cada um representando um íon da molécula contendo um número específico de prótons.

Figura 40 - Espectro de Massas por MALDI-TOF do ACW-02B



Fonte: Elaborado pelo autor

No espectro de massas utilizando a técnica MALDI-TOF (Figura 40), foi observado um pico em $m/z = 375,810$ que corresponde ao íon molecular do ACW-02B. o que pode ser explicado pela grande instabilidade do íon molecular com a massa esperada. Em seguida ocorreu a fragmentação do isótopo ^{37}Cl (32,5% de abundância relativa) e da metoxila (OCH_3), levando há um rearranjo dos elétrons para formação de um benzino ($\text{C} \equiv \text{C}$ aromático),

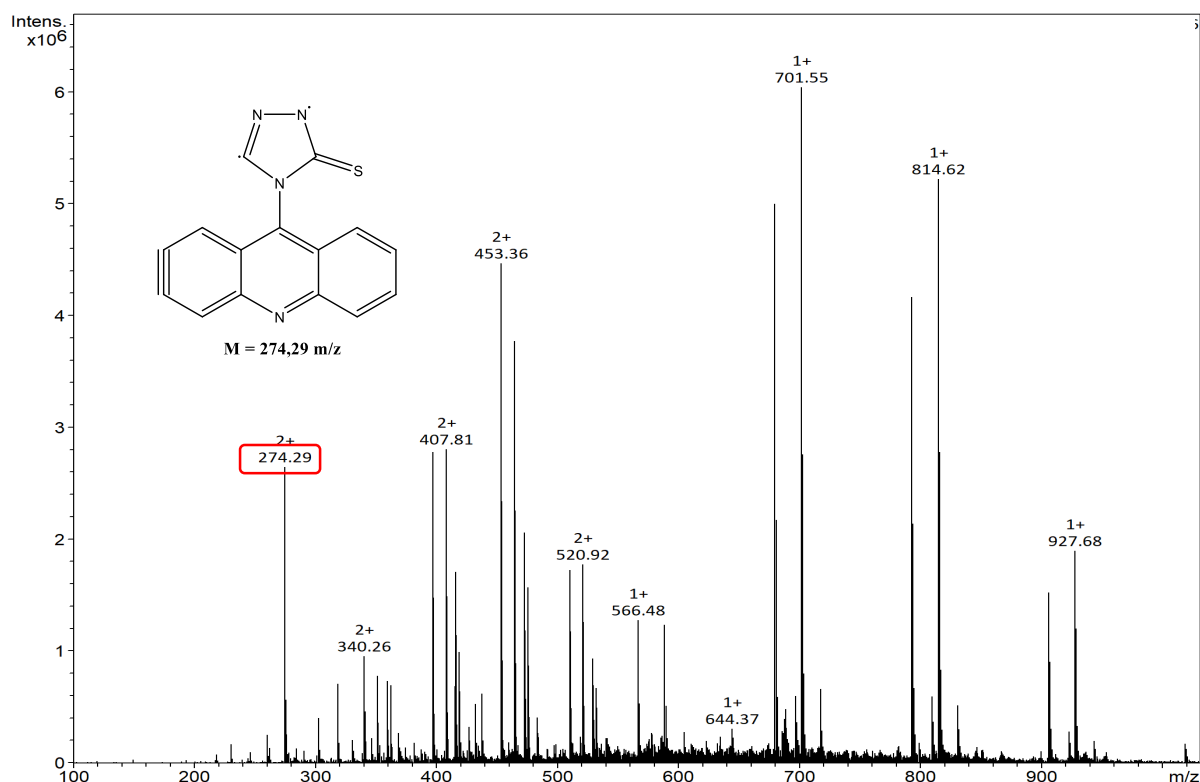
obtendo-se um íon com relação $m/z = 307,194$, o que reforça a presença desses substituintes na estrutura obtida.

Além disso, ocorreu a fragmentação do isótopo ^{32}S (100% de abundância relativa) e de dois átomos de H, favorecendo um novo rearranjo para formação da dupla ligação no anel triazolidínico, obtendo $m/z = 274,821$.

Ainda no mesmo espectro, é possível observar que ocorreu a formação de dímeros como por exemplo: $m/z = 549,744$ equivalentes a dois fragmentos do pico base, assim como em $m/z = 675,567$ corresponde a dois fragmentos da molécula sem o isótopo ^{37}Cl .

O mesmo ocorreu para o espectro de massas aplicando a técnica de ESI, onde foi possível identificar na Figura 41 o pico do íon base com $m/z = 274,29$.

Figura 41 - Espectro de massas por ESI do ACW-02B



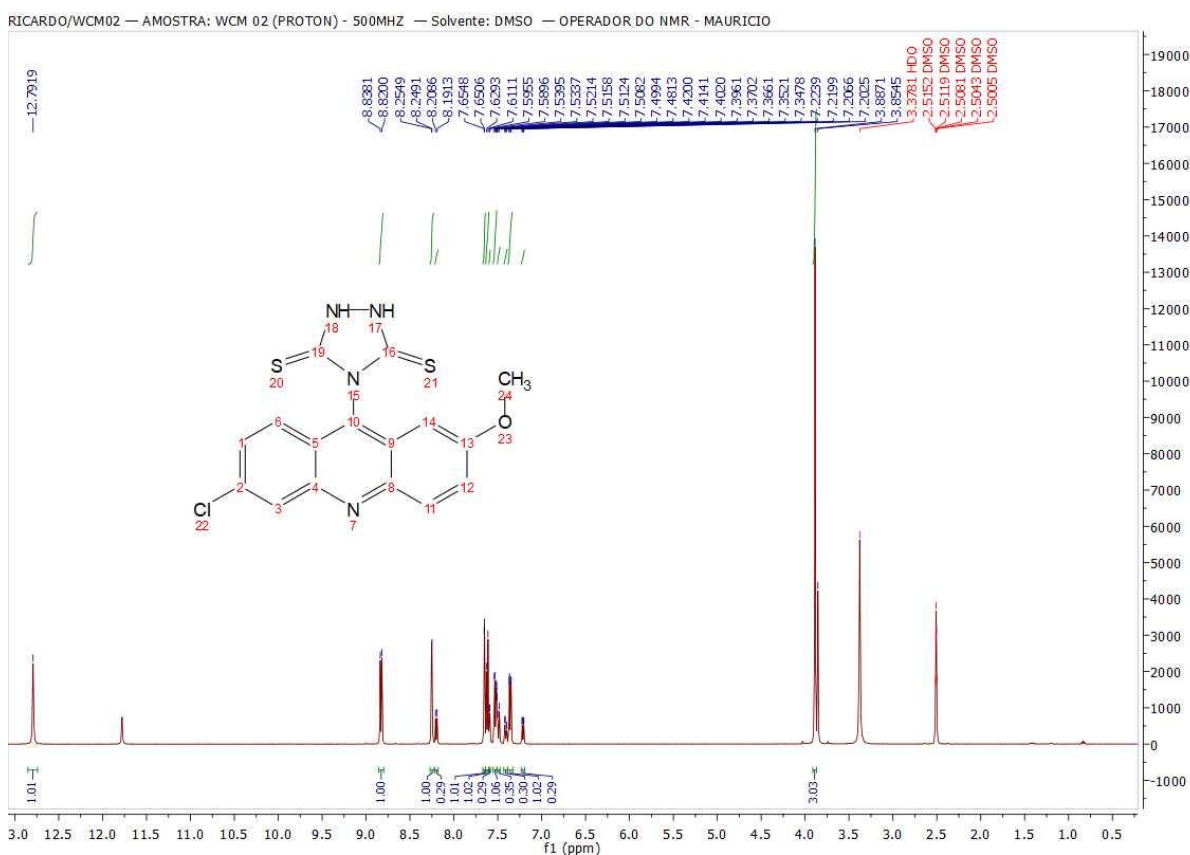
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H do ACW-01B (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz)

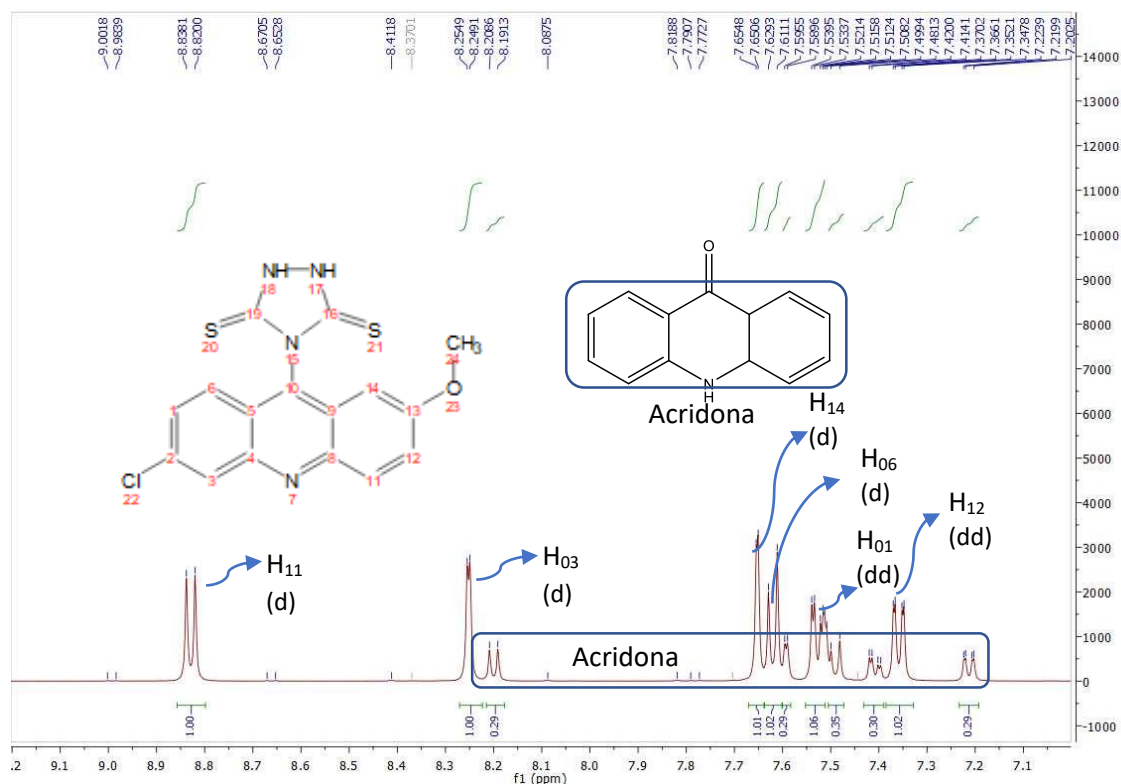
Composto	Deslocamento (δ ppm)
ACW-02B	$\delta = 3,88$ (3H, <i>s</i> , OCH ₃); 7,36 (1H, <i>dd</i> , J = 2,05 Hz; J = 9,05 Hz, H-12); 7,52 (1H, <i>dd</i> , J = 2,9 Hz; J = 9,05 Hz, H-01); 7,62 (1H, <i>d</i> , J = 9,1Hz, H-06); 7,65 (1H, <i>d</i> , J = 2 Hz,1, H-14); 8,25 (1H, <i>d</i> , J = 2,9 Hz, H-03); 8,83 (1H, <i>d</i> , J = 2,9 Hz, H-11); 12,79 (2H, <i>s</i> , NH).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (Figura 42), foram visualizados um conjunto de sinais em δ_{H} 8,83 (d , $J = 9,05$ Hz, 1H), 7,65 (d , $J = 2$ Hz, 1H) e 7,36 (dd , $J = 2,05$ e $9,05$ Hz, 1H), além de sinais em δ_{H} 8,25 (d , $J = 2,9$ Hz, 1H), 7,62 (d , $J = 9,1$ Hz, 1H) e 7,52 (dd , $J = 2,9$ e $9,05$ Hz, 1H) que sugerem a presença de dois anéis aromáticos di-substituídos condizentes com a presença do núcleo acridínico (GOUVEIA, et al., 2018). Foram vistos também os sinais em δ_{H} 12,79 (s , 1H) e 3,88 (s , 3H) característicos hidrogênio ligado a eteroátomo (NH) e metoxila aromática ($\text{OCH}_3\text{-Ar}$), respectivamente.

Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H do ACW-02



A seguir, é possível observar na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 43, pág. 77), os picos característicos dos hidrogênios correspondente ao núcleo de acridina di-substituído, além de sinais que correspondem à aproximadamente 1/3 (33%) correspondentes aos picos de hidrogênio da acridona.

Figura 43 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do ACW-02B (500 MHz)

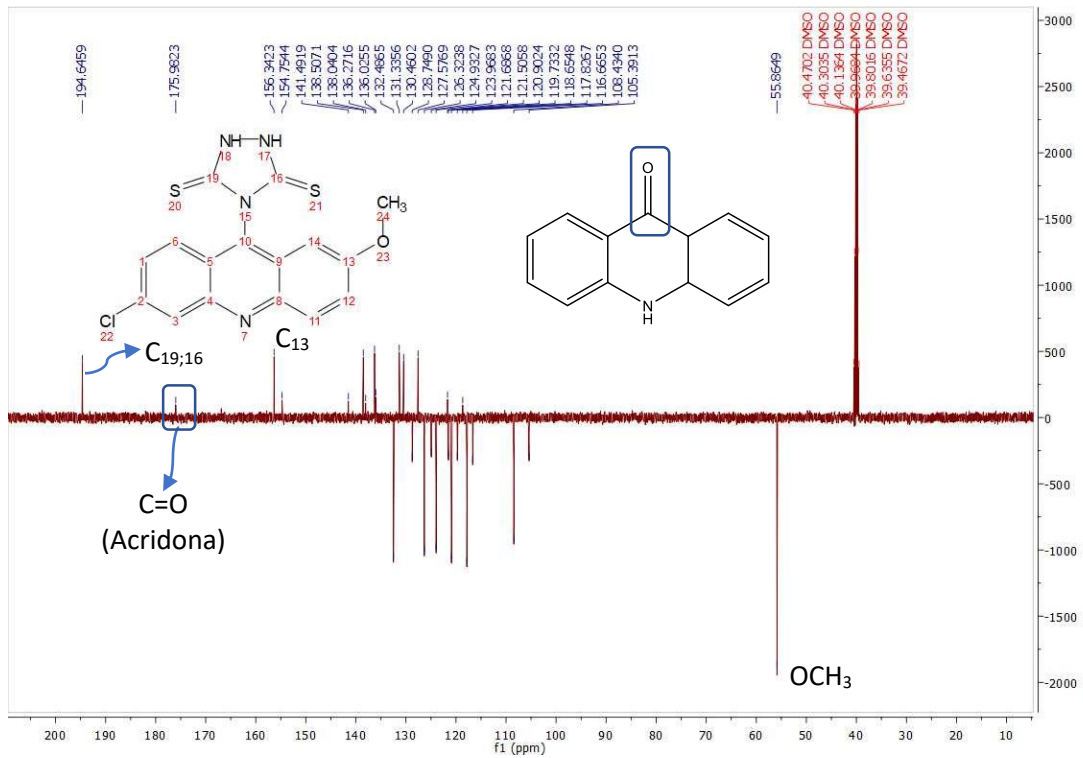
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12 - Dados de RMN de ^{13}C DEPT Q do ACW-02B (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm), J (Hz)

Composto	Deslocamento (δ ppm)
ACW-02B	$\delta = 194,6459$ (C-19 e C-16); $156,3423$ (C-13); $138,5071$ (C-4); $136,2716$ (C-8); $132,4865$ (C-3); $131,3356$ (C-2); $130,4602$ (C-5); $127,5769$ (C-9); $126,3238$ (C-6); $126,9683$ (C-12); $120,9024$ (C-1); $117,8267$ (C-11); $108,4340$ (C-14); $55,8649$ (OCH ₃)

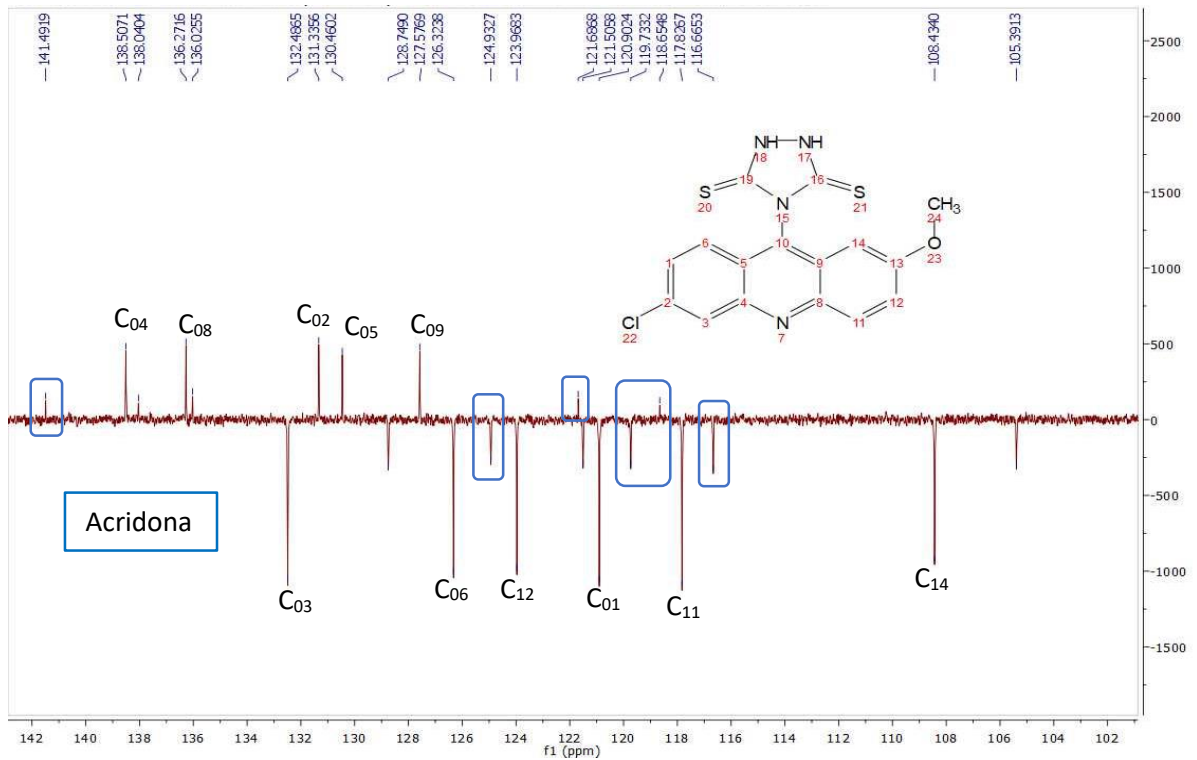
No espectro de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 125 MHz) do ACW-02B (Figura 44 e 45, pág. 78) técnica DEPT Q, observou-se a presença de 14 sinais, sendo 03 sinais sugestivos para carbonos não hidrogenados (δ_c 194,64; 156,34; 131,33), 10 sinais para carbonos metínicos (δ_c 138,50; 136,27; 132,48; 130,46; 127,57; 126,96; 126,32; 120,90; 117,82; 108,43) e 01 sinal para carbono metílico em δ_c 55,86.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT Q) do ACW-02B (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 45 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT Q) do ACW-02B (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



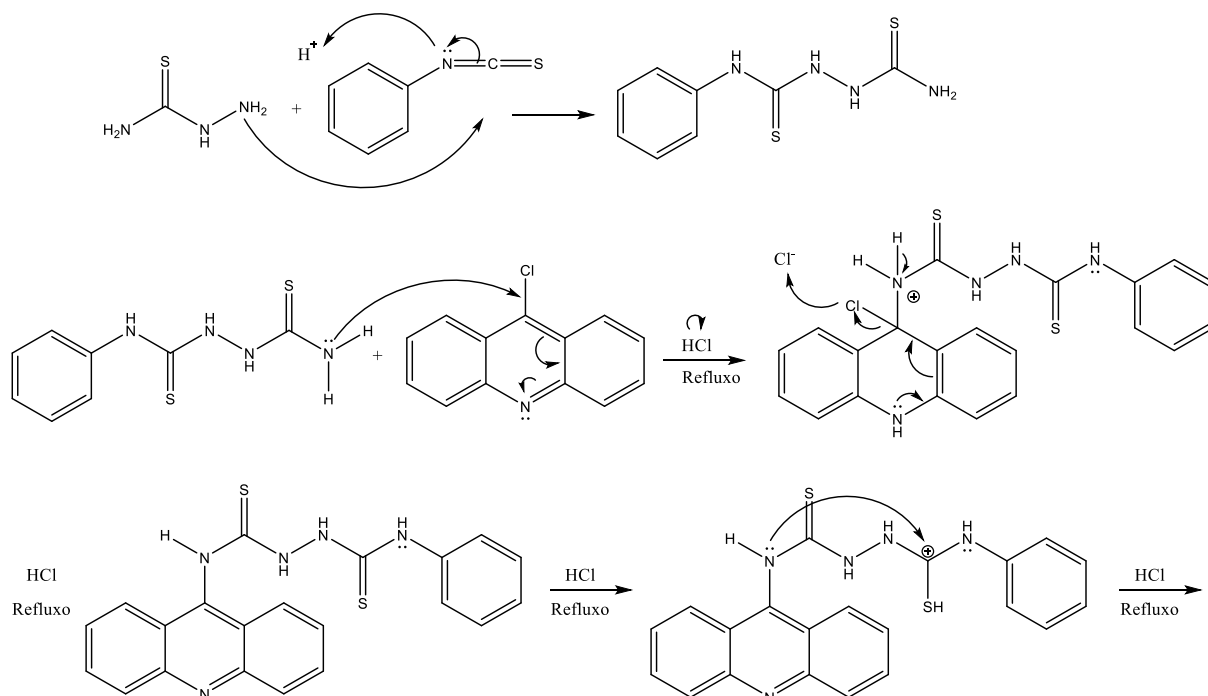
Fonte: elaborado pelo autor

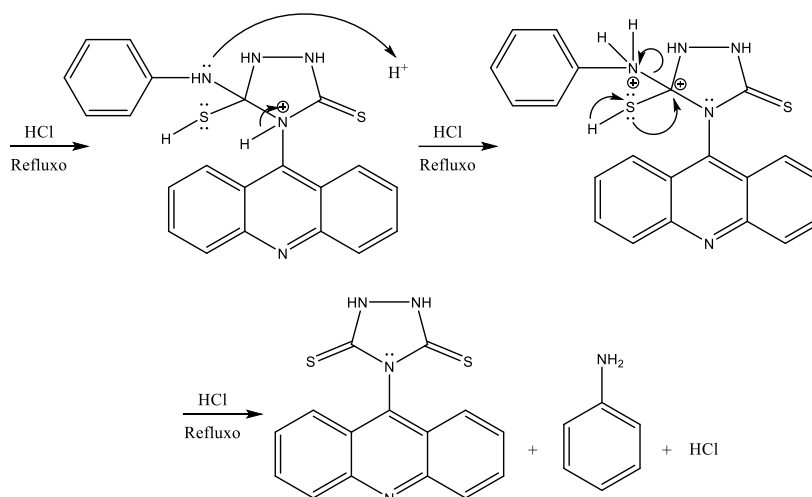
Também foi possível confirmar a presença de acridona através dos espectros de RMN de ^{13}C do ACW-02B (Figura 44 e 45, pág. 78), principalmente pelo pico característico de carbonila δ_{C} 175,98 (Figura 37, pág. 72) e do espectro de RMN de ^{13}C da acridona δ_{C} 177,26 (Figura 37, pág. 72) (BELLET, et al., 2012; MACHADO, 2016). Da mesma forma foram identificados os demais picos referentes a acridona, porém em intensidades menores pois apresentava baixa concentração da mesma.

6.3 Possível mecanismo de reação para os compostos 4-(acridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-01B) e 4-(6-cloro-2-metoxiacridina-9-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-ditiona (ACW-02B)

Após a análise dos espectros foi concluído que provavelmente a estrutura proposta sofre uma ciclização, seguido de fragmentação com provável perda de uma amina aromática estável, de acordo com o mecanismo proposto no Esquema 5.

Esquema 5 – Mecanismo reacional para obtenção dos compostos ciclizados



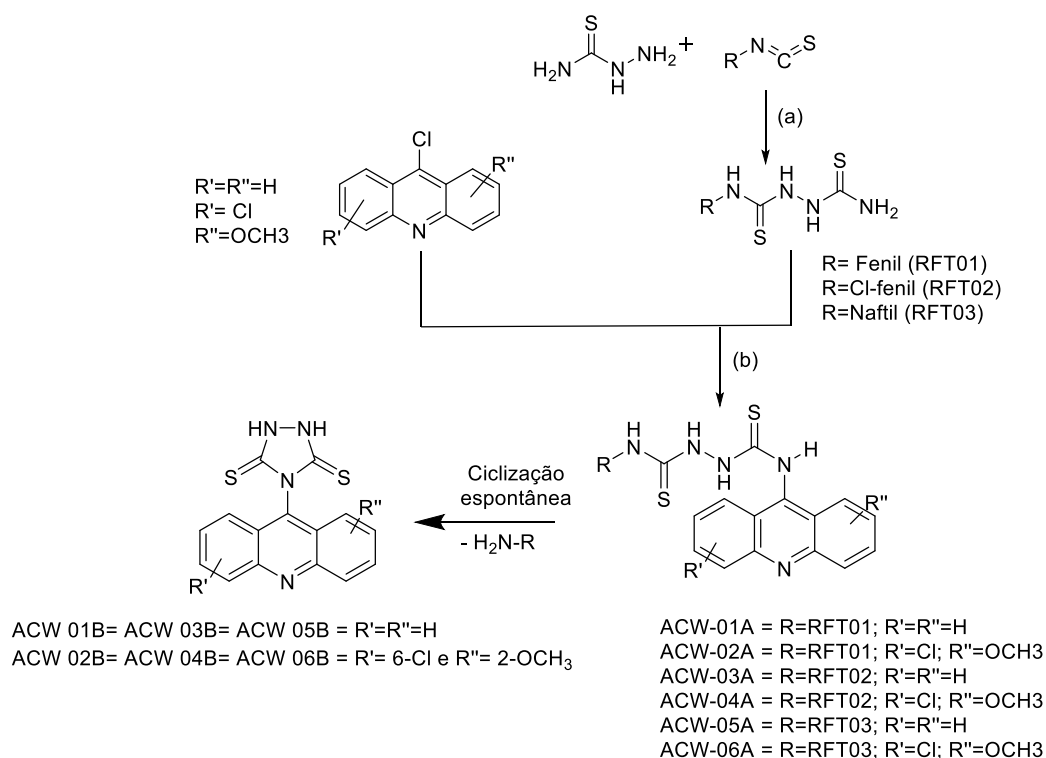


Fonte: Elaborado pelo autor

A primeira etapa consistiu na obtenção do intermediário carbotoioamida a partir de uma reação de adição entre o isotiocianato e a tiossemicarbazida. Em seguida, o intermediário obtido é submetido a reação com o núcleo de acridina sob refluxo na presença de HCl como catalisador, através de uma reação de substituição nucleofílica pelo mecanismo de adição seguida de eliminação, onde o HCl libera o próton (H^+) para o meio, a amina aromática do núcleo de acridina captura este próton ficando protonada e, após a liberação de um H^+ da porção carbotoioamida, ocorre um rearranjo para estabilizar o carbono 9 do núcleo acridínico e o próton ligado a amina aromática é novamente liberado para o meio no qual o mesmo é capturado pelo cloro reestabelecendo o catalisador, em seguida, devido a presença de prótons livres no meio reacional, e o aquecimento da reação a qual fornece energia para o mesmo, favorece a uma autociclização e uma fragmentação formando um derivado triazolidínico acridínico como representado no esquema 4

Seguindo os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas e espectrométricas, de acordo com o esquema reacional proposto (Esquema 5, pág. 79), se propôs uma nova rota sintética para obtenção dos derivados inéditos triazolidínicos acridínicos como demonstrado no Esquema 6 (pág. 81).

Esquema 6 – Rota sintética dos derivados triazolídnicos acridínicos substituídos a partir da ciclização dos intermediários *N*-fenilidrazina-carbotioamida acridínicos.



(a) Etanol, 50 °C; (b) Etanol, HCl e temperatura de 78°C.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com a finalidade de obter o produto pretendido inicialmente, foram realizados estudos de rota sintética com variação das condições reacionais desejando evitar a ciclização da molécula.

6.4 Diferentes metodologias para melhoramento da rota sintética e obtenção da estrutura proposta

Para realizar a síntese variando as condições do meio reacional, o intermediário carbotioamídico (RFT01) e a 9-cloroacridina foram escolhidos como reagentes de partida, e ambos foram submetidos ao teste de solubilidade a fim de se encontrar o melhor solvente (Tabela 13, pág. 82), nos quais os resultados foram interpretados visualmente.

Tabela 13 - Teste de solubilidade do derivado carbotioamídico (RFT01) e 9-cloroacridina (9-Cl-acridina)

Solvente	Composto	Solubilidade	Solvente	Composto	Solubilidade
Metanol	RFT01	Parcial	DMF	RFT01	Insolúvel
	9-Cl-acridina	Solúvel		9-Cl-acridina	Solúvel
Etanol	RFT01	Parcial	Diclorometano	RFT01	Insolúvel
	9-Cl-acridina	Solúvel		9-Cl-acridina	Solúvel
Propanol	RFT01	Parcial	Clorofórmio	RFT01	Insolúvel
	9-Cl-acridina	Solúvel		9-Cl-acridina	Solúvel
Acetonitrila	RFT01	Insolúvel	Água	RFT01	Parcial
	9-Cl-acridina	Solúvel		9-Cl-acridina	Parcial

Fonte: Elaborado pelo autor

Após o teste de solubilidade, foram selecionados dois solventes, etanol e propanol, para a realização das reações com variação nas condições reacionais com a finalidade de se obter uma metodologia com melhor rendimento, bem como verificar se o produto final é obtido por ciclização cinética, na qual ocorre um ataque intramolecular espontânea favorecendo o processo de ciclização, ou se a termodinâmica é o fator essencial para que o produto final ciclize (Tabela 14).

Tabela 14 - Reação na obtenção dos compostos referentes a série ACW-A em diferentes condições reacionais

REAÇÃO	SOLVENTE	TEMPERATURA	CATALISADOR	CICLIZADO	RENDIMENTO
A	ETANOL	78°C	0,1 mL	SIM	38,60%
B		0°C	0 mL	SIM	46,72%
C		78°C	0 mL	SIM	35,21%
D		0°C	0,1 mL	SIM	33,80%
E	PROPANOL	78°C	0,1 mL	SIM	45,74%
F		0°C	0 mL	SIM	87,32%
G		78°C	0 mL	SIM	36,62%
H		0°C	0,1 mL	SIM	35,21%

Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando a Tabela 15 (pág. 83), observa-se que a variação no solvente, na temperatura e a existência ou não de catalisador (HCl) não foram condições suficientes para obtenção de produtos distintos, fato este que sugere uma possível ciclização cinética.

De fato, a característica química do NH da porção do isotiocianato, quando acoplado a tiossemicarbazida formando o intermediário carbotioamida, torna este grupo bastante

nucleofílico, e quando ocorre a reação com a cloro-acridina, naturalmente ocorre a liberação de H^+ tornando o meio ácido e culminando no ataque intramolecular.

Em relação ao melhoramento da rota sintética, os resultados obtidos com as sínteses foram submetidos a avaliação estatística no qual se observou que todos os fatores apresentaram valores significativos (em vermelho) como observado na análise de variância (ANOVA) (Tabela 15)

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para o modelo sugerido

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) SOLV	629,464	1	629,4641	128,5639	0,042996
(2) TEMP	563,122	1	563,1221	195,5285	0,045250
(3) CAT	666,306	1	666,3059	231,3562	0,041794
Falta de Ajuste	1,733,979	4	433,4947	150,5190	0,061047
Erro Puro	2,880	1	2,8800		
Total SS	4008,155	8			

SS: Soma dos quadrados; df: Grau de liberdade; MS: Quadrados médios; F: Valor de F;
p: Valor p provável > F; $R^2 = 0,56667$; Ajuste $R^2 = 0,30667$
Fonte: Elaborado pelo autor

Como o planejamento experimental foi efetuado em apenas dois níveis, os dados obtidos resultaram numa visão um tanto imprecisa da verdadeira relação funcional, ligando a resposta aos fatores que influenciam a síntese.

Desta forma, foi verificado que a síntese nas condições utilizando propanol (-1), em temperatura a $0^\circ C$ (-1) e na ausência de catalisador (HCl) (+1), é favorável para a obtenção do composto final com maior rendimento (Tabela 16, pág. 84).

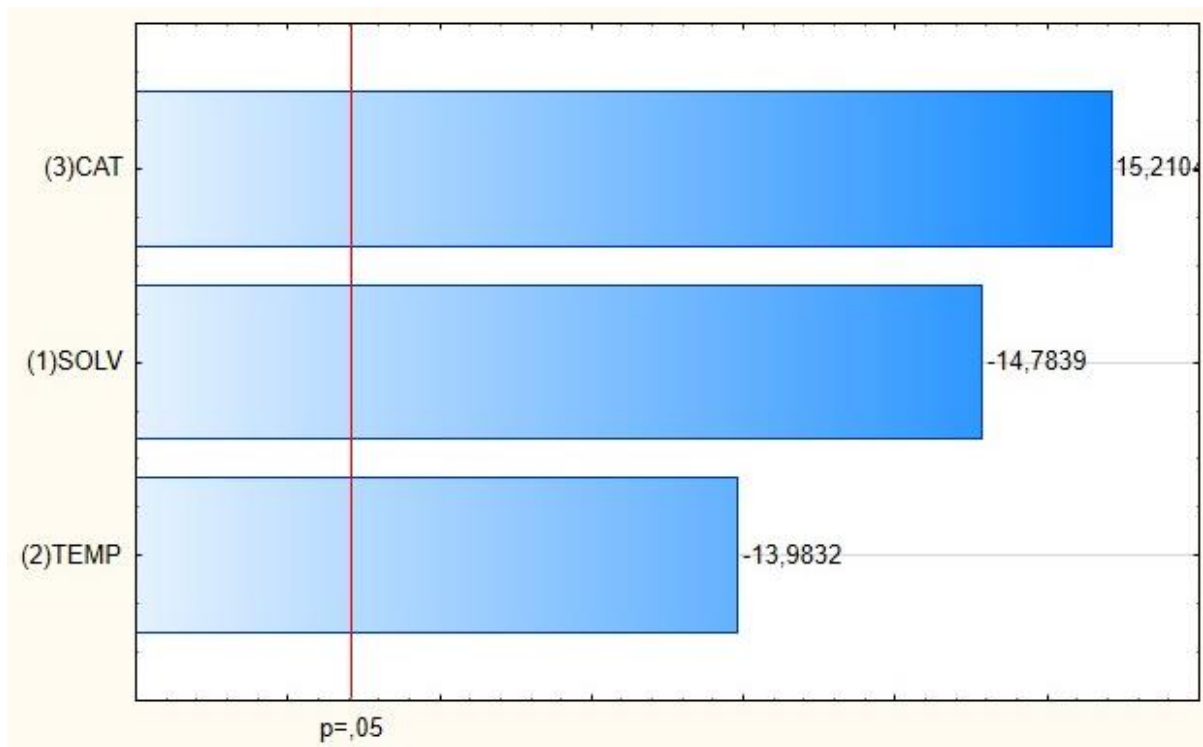
O tipo de solvente é uma escolha importante, não só pelas características de polares próticos, mas também pelo tamanho de sua estrutura molecular tendo a ordem de tamanho com propanol > etanol > metanol, pois é provável que os mesmos possam interagir com os reagentes de partida. Desta forma, pode-se diminuir o tempo reacional bem como o rendimento final com a formação de subprodutos. Por este motivo, o propanol apresentou melhores resultados, quando comparados ao etanol, e o metanol não foi utilizado uma vez que seria a menor estrutura, e desta forma, poderia acarretar na formação de subprodutos e um rendimento final ainda menor.

Tabela 16 - Matriz mostrando os fatores e seus níveis nos experimentos tendo o rendimento como resposta

EXPER.	SOLV.	TEMP.	CAT.	REND. (%)
1	-1	-1	-1	35,21
2	+1	-1	-1	33,80
3	-1	+1	-1	45,74
4	+1	+1	-1	38,60
5	-1	-1	+1	87,32
6	+1	-1	+1	46,72
7	-1	+1	+1	36,62
8	+1	+1	+1	35,21
9	-1	-1	+1	89,72

Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 4 – Efeitos padronizados de acordo com o Gráfico de Pareto



Fonte: Elaborado pelo autor

O gráfico de Pareto evidencia que a repetição da síntese no qual ocorreu o melhor rendimento acarretou na significância de todas os fatores (Gráfico 4). Também é possível observar que a ausência de catalisador (+) é favorável para um maior rendimento uma vez que a própria reação libera H^+ em quantidade suficiente para favorecer a reação. e assim, torna o meio ácido.

6.5 *Docking molecular dos derivados triazolidínicos acridínicos*

Foram submetidos aos estudos de *docking* molecular os compostos sintetizados, ACW-01B e ACW-02B, e a estrutura molecular ACW-01A, inicialmente proposto, como comparação entre as estruturas obtidas e a prevista inicialmente, sendo os mesmos testados para interação com Topoisomerase II α (5GWK) e B-DNA (1BNA), este último para avaliação da atividade de interação das estruturas moleculares dos 2 compostos sintetizados com os sulcos (maior ou menor) do próprio DNA.

Além do mais, as 3 estruturas foram ancoradas com a enzima Bcl-2 (câncer de mama) e a proteína BSA (albumina de soro bovino). Também foi realizado o *docking* da Amsacrina (m-MSA) para todas as enzimas citadas anteriormente, para servir de comparação com os demais compostos uma vez que as estruturas dos derivados acridínicos foram planejadas baseadas no núcleo de acridina (FBDD) e na própria estrutura da Amsacrina (SBDD)

Apesar de não existir a enzima cristalográfica da Topo II α co-cristalizada com Amsacrina no banco de dados do PDB, a estrutura da mesma foi desenhada no ChemDraw 14.0 e aplicada as técnicas de minimização molecular para ser feito o *docking* molecular.

Na Tabela 17 encontram-se descritos os resultados do ancoramento dos 2 compostos sintetizados, o composto que se pretendia obter e da Amsacrina, nos quais foram gerados valores de *scores* sendo selecionados os melhores resultados para cada estrutura. Foram levados em consideração os resultados de Energia Livre de Ligação (kcal/mol), o qual, quanto menor o valor, melhor será a interação entre enzima e ligante, e os valores de previsão da Constante de Afinidade (k_i) (nM), sendo que os valores mais baixos indicam maior afinidade do ligante a estrutura cristalográfica.

Tabela 17 - *Docking* molecular dos compostos com a Topo II α (PDB ID: 5GWK), BCL-2 (PDB ID: 4AQ3), DNA (PDB ID: 1BNA) e BSA (PDB ID: 4OR0).

COMPOSTOS	5GWK		1BNA		4AQ3		4OR0	
	Energia Livre de Ligação (Kcal mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki)(nM)	Energia Livre de Ligação (Kcal mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki) (nM)	Energia Livre de Ligação (Kcal mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki) (nM)	Energia Livre de Ligação (Kcal mol ⁻¹)	Constante de Afinidade (ki)(nM)
ACW-01A	-9,52	105,12	-9,16	194,25	-10,97	9,17	-----	-----
ACW-01B	-8,10	1160	-7,78	1980	-7,27	4720	-8,15	1060
ACW-02B	-8,76	377,77	-8,73	379,31	-7,11	6170	-8,92	287,80
AMSACRINA	-10,13	37,62	-10,03	44,80	-10,84	16,07	-11,75	4,76
LIGANTE COMPLEXADO	Etoposídeo		-----		Fenilacilsulfonamida		-----	
	-12,19	1,15	-----	-----	-16,68	0,0004	-----	-----

Fonte: Elaborado pelo autor

No *docking* da Topo II α (5GWK), de acordo com a Tabela 11, é possível identificar o composto ACW-01A por apresentar maior interação para a mesma enzima, uma vez que o referido composto apresentou os menores valores de Energia Livre de Ligação (-9,52 kcal mol⁻¹) e Constante de Afinidade (ki) com 105,12 nM. Porém o ACW-01A, mesmo apresentando considerável interação com a Topo II α , sua interação ainda foi inferior do que o inibidor de referência que é o Etoposídeo, que apresentou valores de Energia Livre de Ligação e Constante de Afinidade de -12,19 kcal/mol e 1,15 nM, respectivamente.

Já em relação ao *docking* dos derivados triazolidínicos acridínicos com a Topo II α , foi possível observar, primeiramente, que ocorreu uma grande diminuição da interação entre os compostos e a TopoII quando comparados com o ACW-01A apresentando uma estrutura aberta. Porém na comparação entre o ACW-01B e ACW-02B, este último apresentou interação ligeiramente mais forte com valor de energia de interação de -8,76 kcal mol⁻¹.

Para a ancoragem com o B-DNA (1BNA), o ACW-01A foi o mais ativo, variando somente os valores numéricos, tendo Energia Livre de Ligação com -9,16 kcal mol⁻¹ e Constante de Afinidade (ki) de 194,25 nM. Contudo, a ciclização acarretando na obtenção dos derivados triazolidínicos acridínicos cuminou na diminuição da interação destes derivados com

o B-DNA, onde novamente, o ACW-02B se destacou com menor energia de interação com valor de $-8,73 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Nos testes de ancoragem entre a enzima Bcl-2 e os compostos se observou uma inversão dos resultados quanto aos derivados triazolidínicos acridínicos, no qual o ACW-01B foi o que apresentou menor energia de interação com valor de $-7,27 \text{ kcal mol}^{-1}$, sugerindo que o referente derivado possua provável atividade frente a células de tumores sólidos, uma vez que a enzima Bcl-2 está presente em células de câncer de mama.

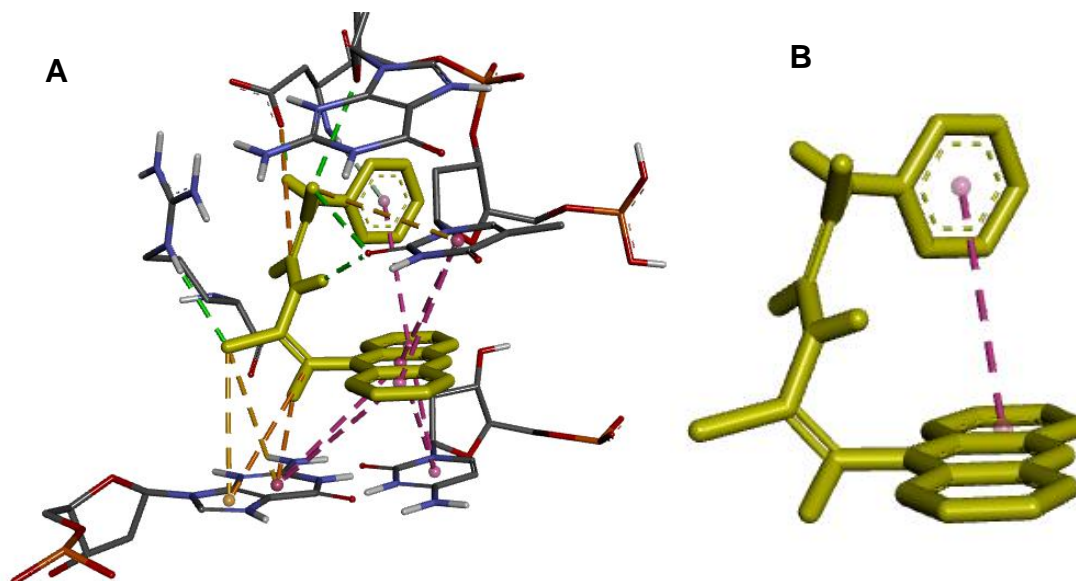
Em relação a ancoragem dos compostos com BSA (4OR0), observou-se que a molécula ACW02-B apresentou valor de energia de interação ligeiramente mais forte que o ACW-01B, sugerindo que a substituição do núcleo de acridina, para este caso, favorece a interação do ligante com a enzima. Ainda no mesmo estudo, ambas as estruturas ciclizadas foram superiores do que a estrutura não-ciclizada, proposta inicialmente.

Nos ancoramentos da Amsacrina com as enzimas cristalográficas foi observado que este fármaco apresentou interação superior aos compostos sintetizados, comprovando sua eficácia, principalmente, como inibidor de Topo II α , exceto para a enzima Bcl-2 a qual a Amsacrina apresentou interação inferior ao ACW-01A com valores de energia de interação de $-10,84 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-10,97 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente.

Além dos valores de energia livre de ligação e constante de afinidade, foram gerados através do Discovery Studio, a ilustração em 3D e 2D da conformação ativa interagindo com a enzima em estudo, bem como foram identificadas as interações entre os mesmos e suas respectivas distâncias em angstrom (Å).

Corroborando com os dados obtidos no ADT, a Figura 46 (pág. 88) ilustra a conformação de menor energia em 3D do ACW-01A, gerado pelo Discovery Studio Visualizer, bem como a conformação de menor energia do composto.

Figura 46 - Conformação ativa do ACW-01A (amarelo, A) interagindo com a Topo II α (5GWK) e conformação de menor energia (B) fora da enzima.



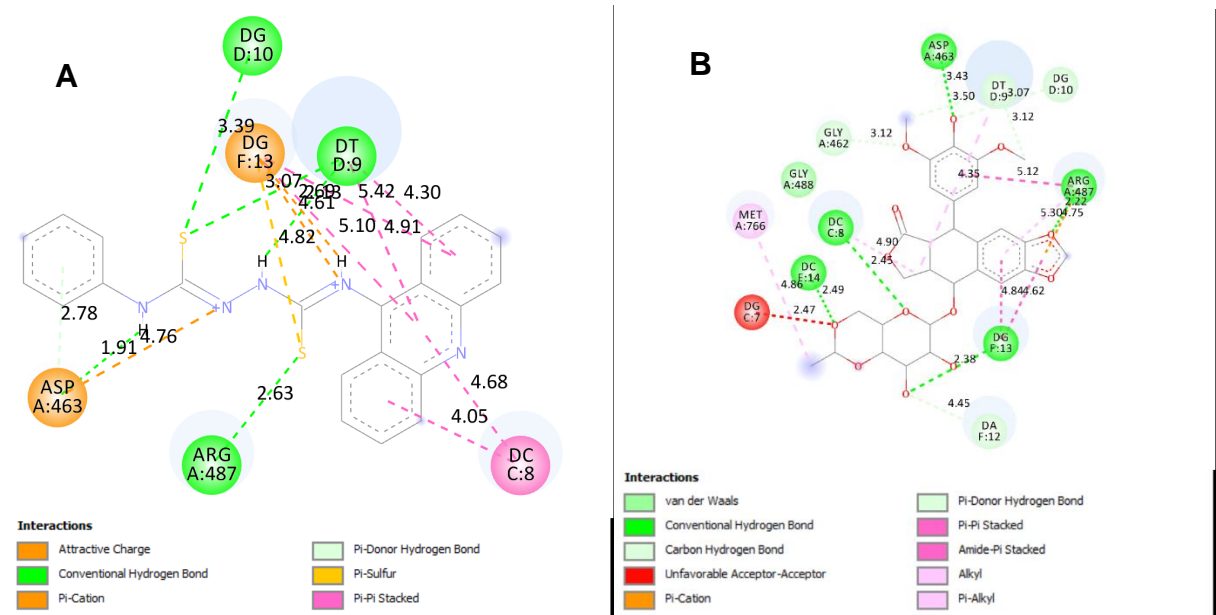
Fonte: Elaborado pelo autor

Como a enzima apresenta a capacidade de modulação e o ligante (ACW-01A) é capaz de obter diferentes conformações devido as ligações livres da molécula, o mesmo se ajusta a fim de obter o maior número de interações com os resíduos de aminoácidos da enzima, bem como com o DNA, complexado com a Topo II α .

Comparando o ACW-01A com o etoposídeo, verificamos na Figura 47 (pág. 89) que ocorreram algumas interações em comum para ambos os ligantes, no qual a porção C=S do ACW-01A interagiu com o resíduo de aminoácido da Topo II α através de ligação de hidrogênio com ARG487, semelhante ao etoposídeo que apresenta a mesma interação. Além do mais, é possível verificar que o ACW-01A apresentou mais interações com as bases nitrogenadas do DNA do que a Topo II α , como por exemplo a outra porção C=S que faz interações por ligação de hidrogênio com Guanina10 e Timina9, tendo somente Guanina 13 e Citosina 8, como interação semelhante com o etoposídeo, porém diferindo no tipo de interação.

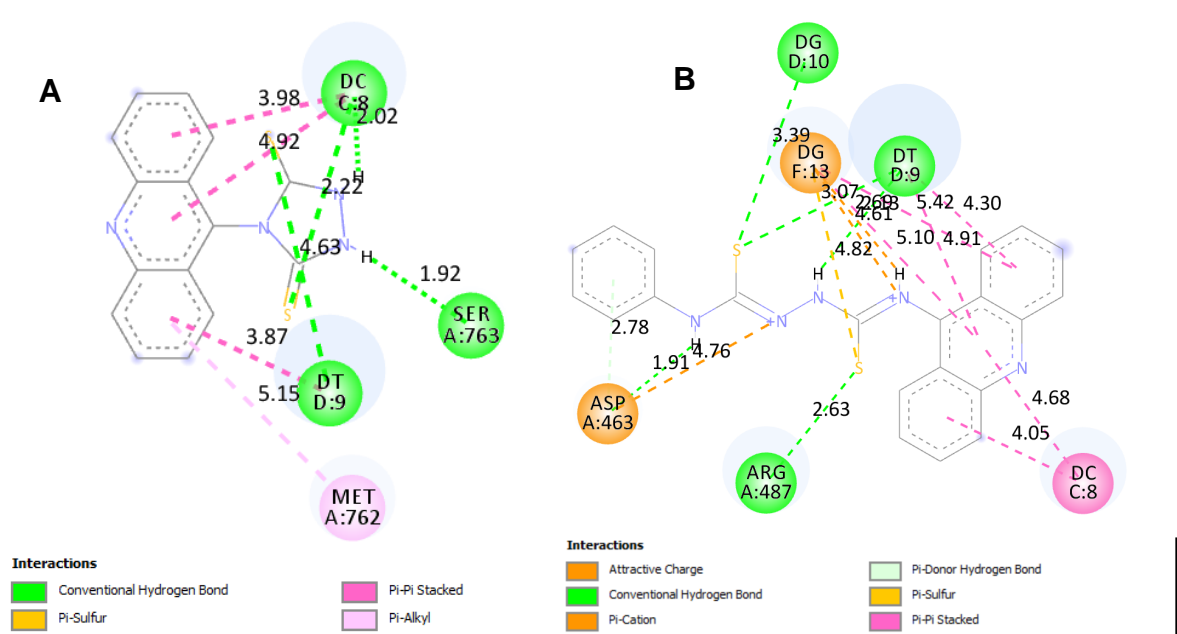
Apesar de não existir a enzima cristalográfica da Topo II α co-cristalizada com Amsacrina no banco de dados do PDB, a estrutura da mesma foi desenhada no ChemDraw 14.0 e aplicada as técnicas de minimização molecular para ser feito o *docking* na enzima 5GWK (Topo II α) e 1BNA (DNA) a fim de avaliar sua interação nos respectivos alvos.

Figura 47 - Ilustração 2D das interações entre os ligantes e a Topo II α , tendo como ligantes o ACW-01A (A) e o Etoposídeo (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 48 - Ilustração 2D das interações entre os ligantes e a Topo II α , tendo como ligantes o ACW-01B (A) e o ACW-01A (B).



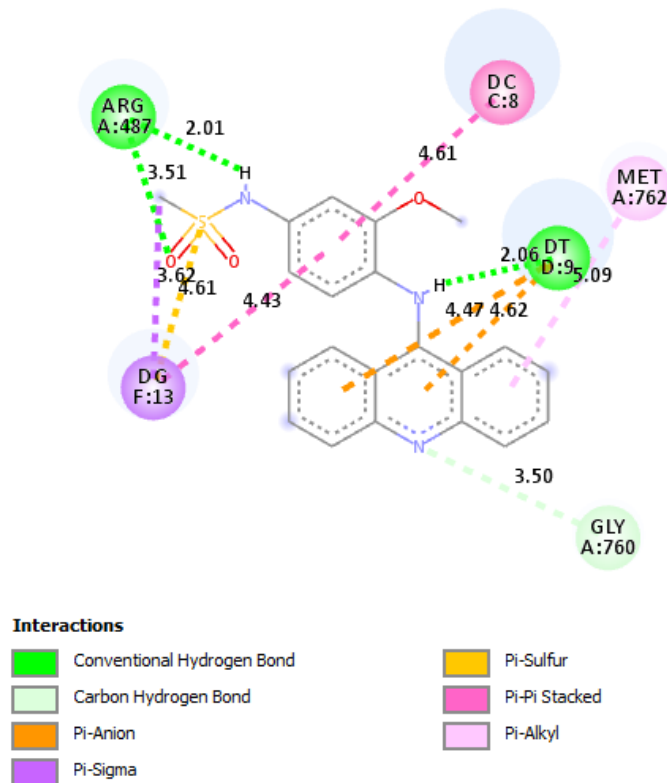
Fonte: Elaborado pelo autor

Como observado na figura 48, o ACW-01B apresentou menos interações do que o ACW-01A, e também ocorreu divergência entre os tipos e resíduos das interações entre os dois compostos. Contudo, o ACW-01B apresentou uma interação por ligação de hidrogênio com o

resíduo da base nitrogenada do DNA Timina 8 se assemelhando ao etoposídeo neste quesito que também apresentou esta mesma ligação com o mesmo resíduo. Porém, o ACW-01A, como visto anteriormente, apresentou mais regiões de interação, o que justifica sua maior interação com o complexo TopoII/DNA quando comparado ao ACW-01B.

De certa forma, é importante a presença de regiões aromáticas, como por exemplo aos aromáticos presentes no etoposídeo e na amsacrina (Figura 49/), os quais são inibidores de Topoisomerase II α . Mas também, é necessária uma região mais ramificada e com grupamentos capazes de fazerem ponte de hidrogênio. Desta forma, a amsacrina, mesmo não estando co-cristalizada com a topoisomerase II humana e o DNA, e não estando na sua conformação ativa, ainda assim, apresentou boa interação.

Figura 49 - Amsacrina e suas interações com a Topo II α e o DNA.



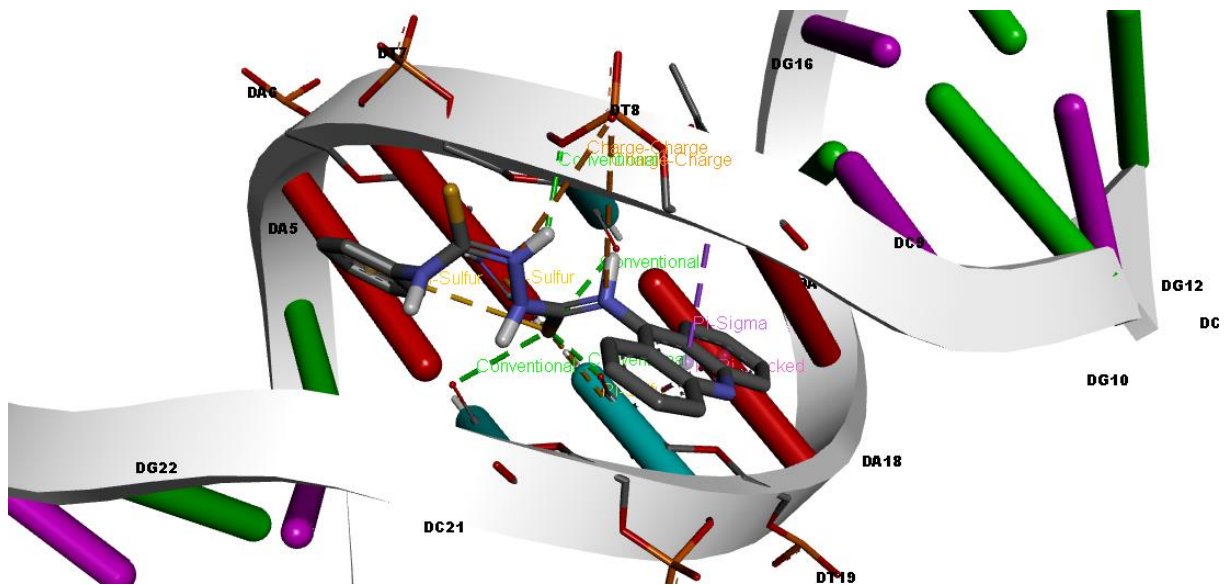
Fonte: Elaborado pelo autor

Como observado na Figura 50 (pág. 91), a amsacrina apresenta forte interação por ponte de hidrogênio do grupamento sulfonamida com a Arg-487 e Timina-9, assim como é visível uma interação carbono hidrogênio do N-H da acridina com o resíduo Gly-760, corroborando

com a importância de estruturas inibitórias de Topo II α e DNA apresentarem regiões planares aromáticas (para interações hidrofóbicas com o DNA) e regiões com rotação livre contendo átomos capazes de doar ou receber prótons (para interações covalentes com os resíduos de aminoácidos da Topoisomerase II).

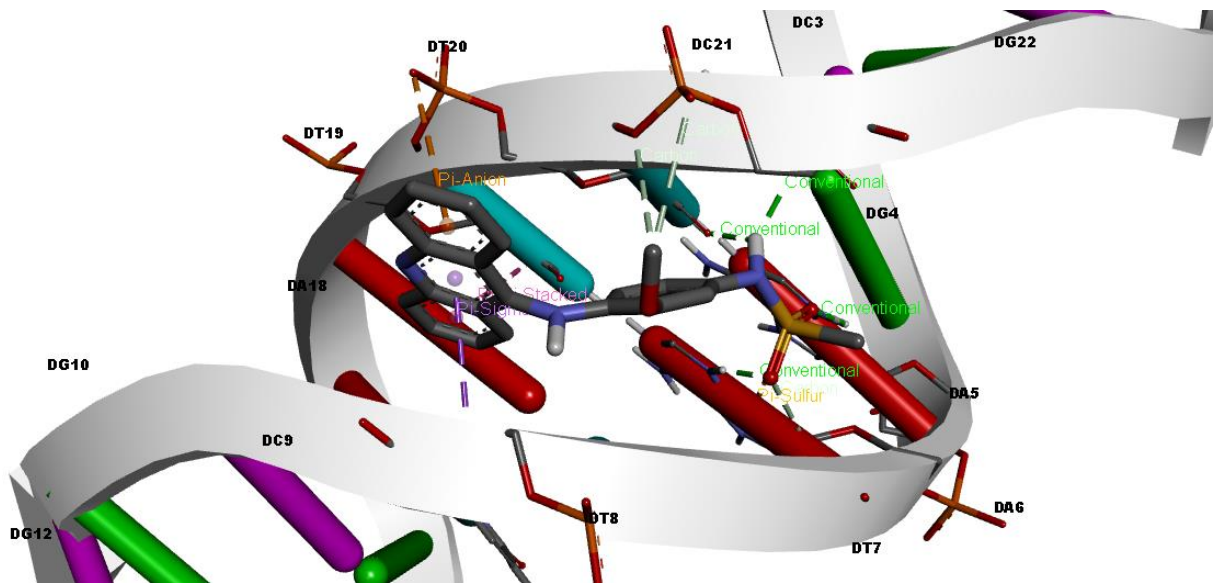
Em relação ao DNA as Figuras 50 e 51, ilustram as interações entre o ACW-01A e a Amsacrina, fármaco que apresenta atividade intercaladora de DNA, ambos apresentando interação com o sulco menor do DNA.

Figura 50 - ACW-01A ilustrando suas interações com o B-DNA (1BNA)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 51 -Amsacrina ilustrando suas interações com o B-DNA (1BNA)

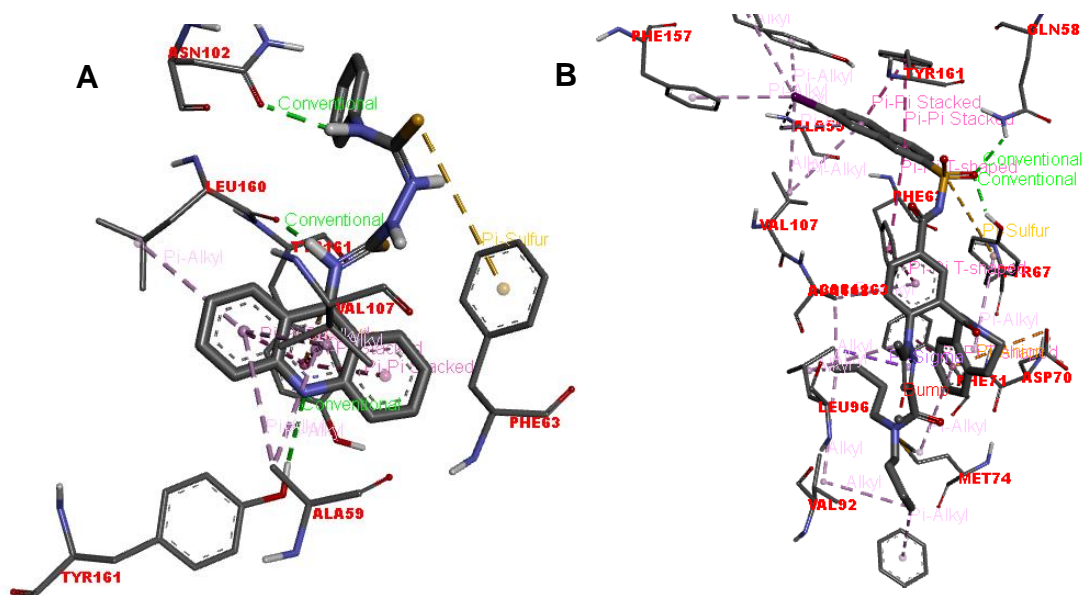


Fonte: Elaborado pelo autor

Como observado nas Figuras 50e 51 (pág. 91), foi notório o número de interações da amsacrina com o DNA, diferente do ACW-01A, o qual apresentou menor número de interações. Também, a presença do núcleo acridínico é fator crucial para a intercalação entre as fitas de DNA. Mesmo assim, o ACW-01A pode apresentar atividade intercaladora de DNA uma vez que suas interações, principalmente com a tionila, são suficientes para que a sua estrutura permaneça entre as duplas fitas, e assim, apresente uma baixa energia livre de interação.

No *docking* molecular da proteína Bcl-2 (4AQ3), o composto ACW-01A, novamente, apresentou maior interação com a enzima quando comparado com os derivados triazolidínicos acridínicos, com valores de Energia Livre de Ligação com $-10,97 \text{ kcal mol}^{-1}$ e Constante de Afinidade (ki) com 9,17 nM. O inibidor utilizado como padrão foi a Fenilacilsulfonamida, que apresentou valores de Energia Livre de Ligação com $-16,68 \text{ kcal mol}^{-1}$ e Constante de Afinidade (ki) com 0,0006 nM (Figura 52).

Figura 52 - Interações entre os ligantes e a enzima Bcl-2 (4AQ3), tendo como ligantes o ACW-01A (A) e a fenilacilsulfonamida (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

O resultado do *docking* molecular entre a fenilacilsulfonamida e a enzima Bcl-2 gerou interações variadas, sendo uma quantidade bastante numerosa fazendo com que o programa Discovery Studio Visualizer não fosse capaz de gerar a ilustração em 2D do referente estudo.

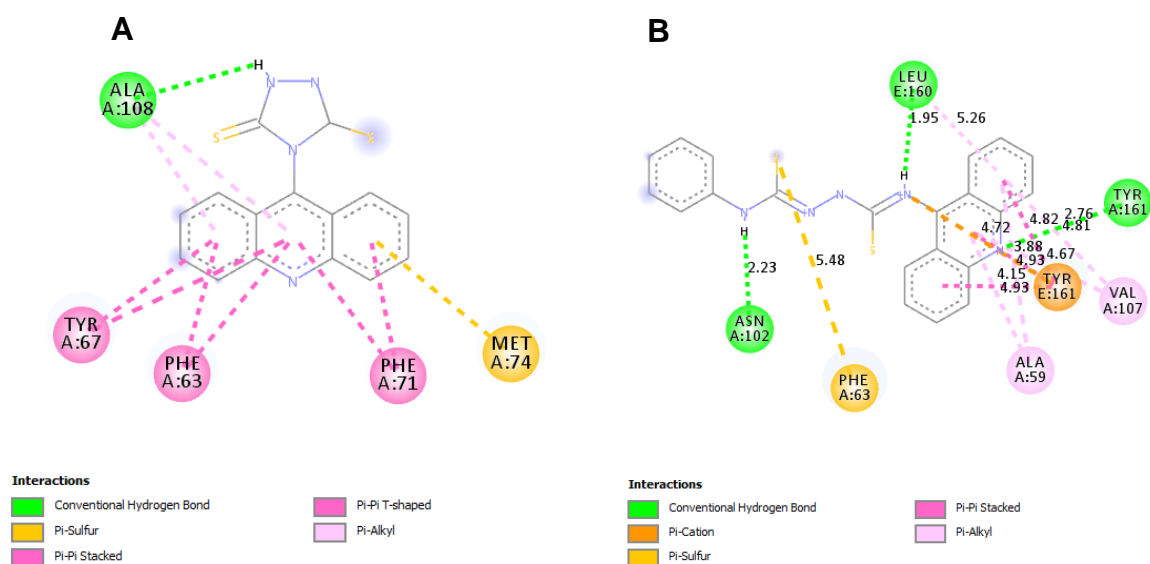
Todavia, a ilustração em 3D é possível visualizar as inúmeras interações bem como suas características.

Este grande número de interação entre a estrutura da fenilacilsulfonamida e a BCL-2 demonstraram que o referido ligante apresenta fortes características de inibição da enzima, porém, mesmo com todas essas interações, apenas se observou uma por ligação de hidrogênio, sendo as demais por interação de elétrons π .

Todavia, a quantidade de interações foi suficiente para este ligante apresentar menor energia de interação ($-16,68 \text{ kcal mol}^{-1}$) quando comparado com o composto ACW-01A (figura 52, pág. 92), o qual apresentou 03 interações por ligações de hidrogênio, porém quantitativamente, inferiores ao ligante fenilacilsulfonamida.

Na figura 53 é possível fazer uma comparação entre as interações do ACW-01B (composto ciclizado) com o ACW-01A (composto não-ciclizado), onde se observou uma diminuição no número de interações bem como nos tipos de ligações, tendo o ACW-01A, três (03) interações importantes por ligação de hidrogênio, enquanto o ACW-01B apresentou só uma.

Figura 53 - Interação do ACW-01B (A) e ACW-01A (B) com a enzima Bcl-2

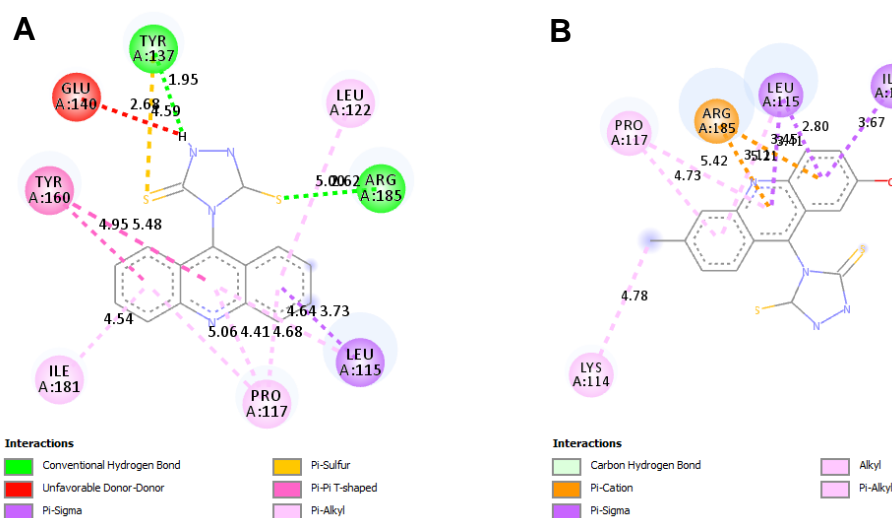


Fonte: Elaborado pelo autor

Uma característica importante é que a presença de grupos doadores e aceptores de hidrogênio é relevante para que a molécula possa interagir mais fortemente com a enzima, aumentando a sua ação farmacológica.

Em relação ao *docking* molecular entre os compostos e o BSA (PDB ID: 4OR0), o ACW-01B e o ACW-02B apresentaram energia de interação de $-8,15 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-8,92 \text{ kcal mol}^{-1}$, mostrando que os compostos ciclizados apresentaram menores energias de interação com a albumina de soro bovino. Todavia, a Amsacrina continua sendo a estrutura molecular com melhor interação frente a todos os compostos ancorados, como demonstrado na Tabela 17 (pág. 86).

Figura 54 - Interação do ACW-01B (A) e ACW-02B (B) com a enzima BSA



Fonte: Elaborado pelo autor

Como ilustrado na Figura 54, o ACW-01B (A) apresentou duas interações por ligação de hidrogênio com distâncias de $2,62 \text{ \AA}$ (Arg-185) e $1,95 \text{ \AA}$ (Tyr-137). Em contrapartida, o ACW-02B, apresentou menor energia de interação entre os dois compostos com valor de $-8,92 \text{ kcal mol}^{-1}$. O referido composto apresentou interações próximas a estrutura do ACW-01B, porém com tipos de ligação envolvendo elétrons π , destacando-se a interação da metoxila com o resíduo Lys-136 por ligação C-H com distância de $3,69 \text{ \AA}$.

Também foi possível observar que a região ciclizada da tiocarboamida do ACW-02B não interagiu com o BSA, diferentemente do ACW-01B, no qual toda sua estrutura molecular apresentou pontos de interação com a enzima ancorada.

6.6 Interação com DNA por propriedades absorptivas

Os parâmetros obtidos a partir da análise espectrofotométrica estão resumidos na Tabela 18. Os espectros de absorção UV-vis dos derivados ACW-01B e ACW-02B analisados nesse estudo mostraram uma absorção significativa na região entre 400-500 nm. Estes derivados exibiram picos máximos a 474 e 460 nm, respectivamente, na ausência de ctDNA, e picos máximos de 474 e 461 nm, respectivamente, na presença de ctDNA.

Tabela 18 - Dados de absorção UV-vis dos derivados triazolidínicos acridinícos na ausência e presença de ctDNA

COMPOSTO	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$	Hipercromismo	Hipocromismo	Kb (M^{-1})
ACW-01B + DNA	474 nm	474 nm	-	-	21.73%	4.30×10^4
ACW-02B + DNA	460 nm	461 nm	1	47.53%	-	$1,17 \times 10^6$

Fonte: Elaborado pelo autor

Quando ocorre a interação de um complexo ao DNA por intercalação, o orbital π^* do ligante intercalador pode interagir com o orbital π dos pares de base do DNA e, assim, diminuir a energia da transição $\pi-\pi^*$, resultando em batocromismo (deslocamento para a região do vermelho). Em contrapartida, o orbital π está parcialmente preenchido com elétrons, diminuindo a probabilidade das transições e, conseqüentemente, resultando em hipocromismo (diminuição do valor do coeficiente de extinção molar) (GAO, et al., 2010). Desse modo, a combinação de batocromismo e hipocromismo é característica de intercalação.

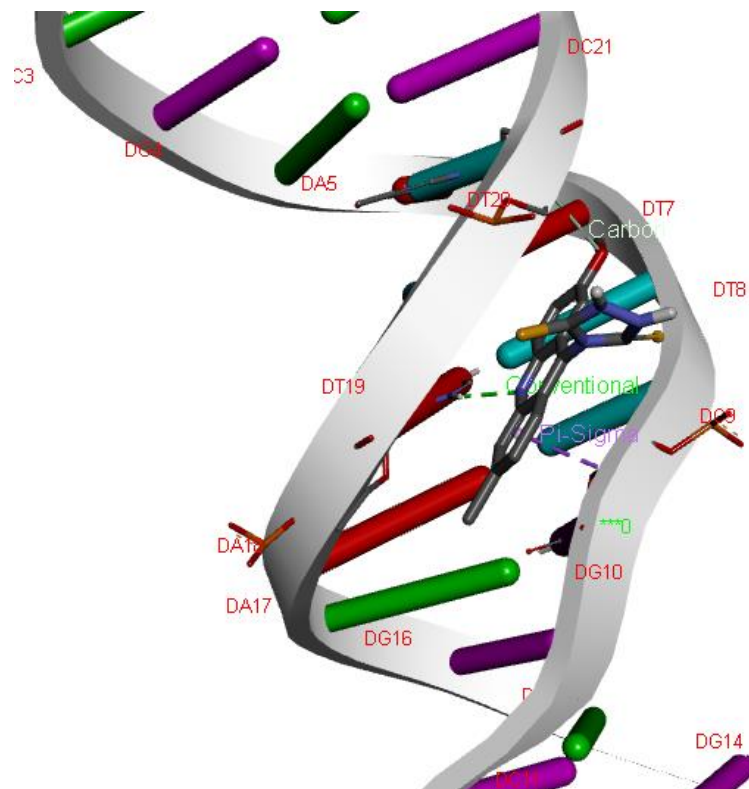
O efeito hipercrômico ou de aumento da absorvidade molar, após adição de quantidades crescentes de DNA é também indicativo de que há uma forte interação entre a molécula e o DNA (SHAHABADI et al., 2010; ULIANA et al., 2012), contudo este efeito está associado a outros tipos de interações, como por atração eletrostática ou por ligação covalente (SIRAJUDDIN; BADSHAH, 2013).

Em relação a constante de ligação (K_b), para que a molécula apresente atividade como intercalador de DNA, as constantes devem estar no intervalo de 1×10^4 a $1 \times 10^6 M^{-1}$ e são significativamente menores do que as constantes de ligação de agentes ligantes em sulco do

DNA, que estão em torno de 1×10^5 a $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (IHMEELS; OTTO, 2005; LAFAYETTE, et al., 2013).

De acordo com essas informações, foi possível observar que o composto ACW-01B apresentou provável atividade intercaladora uma vez que o mesmo apresentou hipocromismo de 21,73% com constante de $K_b (\text{M}^{-1})$ de $4,30 \times 10^4$. Em contrapartida o composto ACW-02B apresentou hipercromismo de 47,73%, e mesmo este composto apresentando $K_b (\text{M}^{-1})$ de $1,17 \times 10^6$, sua provável atividade intercaladora pode ter sido suprimida devido sua estrutura molecular apresentar uma interação eletrostática (van der Waals) entre o oxigênio da metóxila ligado ao anel de acridina e o carbono da pentose da base Timina 20, interagindo com o suco menor do DNA, de acordo com os resultados observados no *docking* molecular, como se observa na Figura 55.

Figura 55 - *Docking* molecular entre o composto ACW-02B e o 1BNA com interação entre as bases nitrogenadas do DNA



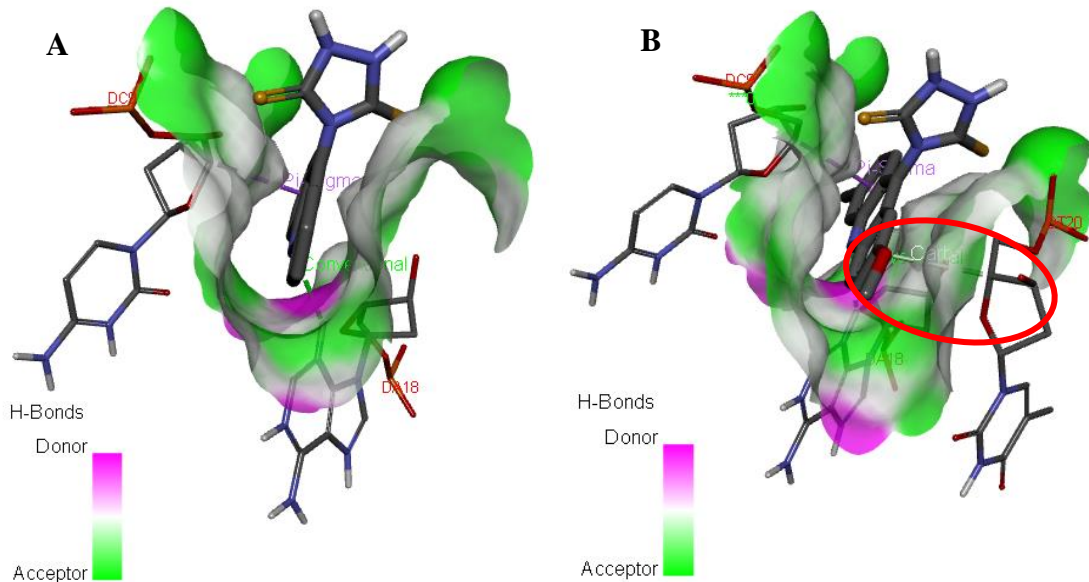
Fonte: Elaborado pelo autor

As bases nitrogenadas dos nucleotídeos são aptas a formarem ligações de hidrogênio específicas, devido à presença de grupos doadores e aceptores de elétrons. Contudo, pode

ocorrer a interação com as bases do DNA nos sulcos, os quais envolvem em geral, ligação de hidrogênio ou interações de van der Waals (LAFAYETTE, et al., 2013).

A figura 51 ilustra as interações entre os derivados triazolidínicos acridínicos com as bases nitrogenadas do DNA, com destaque para as regiões com grupos doadores e aceptores de hidrogênio, onde é possível observar uma ligação de hidrogênio entre o nitrogênio aromático da acridina e base Adenina18 (Figura 56, A), em ambas as estruturas, e a interação por Van der Waals do ACW-02B com a base Timina20 (Figura 56, B).

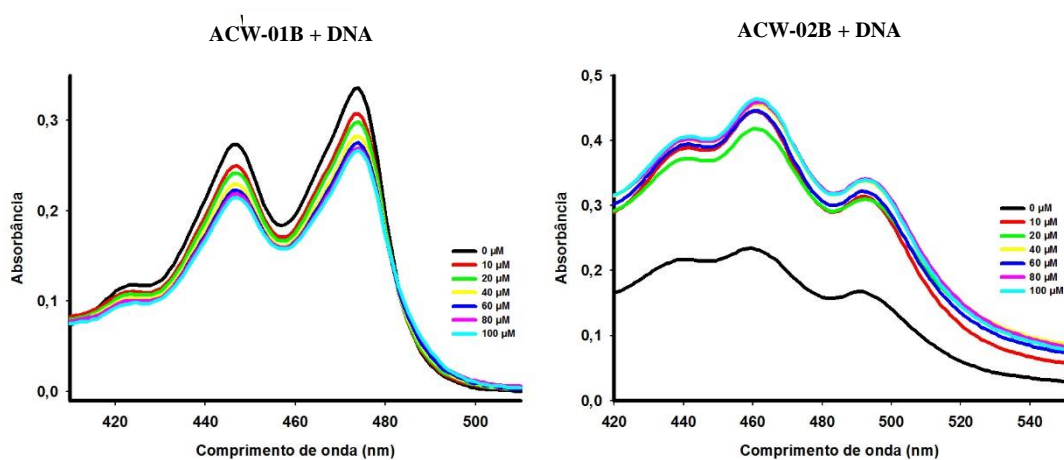
Figura 56 - Interação entre o composto ACW-01B (A) e ACW-02B (B) com as bases nitrogenadas do DNA



Fonte: Elaborado pelo autor

A fim de confirmar a interação desses novos compostos com o ctDNA, as propriedades de ligação também foram investigadas por espectroscopia de absorvância (Gráfico 5, pág. 98). Os espectros de absorvância foram monitorados em uma concentração fixa de 10 μM de ctDNA e diferentes concentrações de cada derivado.

Gráfico 5 – Espectros de absorção dos derivados triazolidínicos acridínicos analisados na ausência e presença de ctDNA na concentração de 10 μM .



Fonte: Elaborado pelo autor

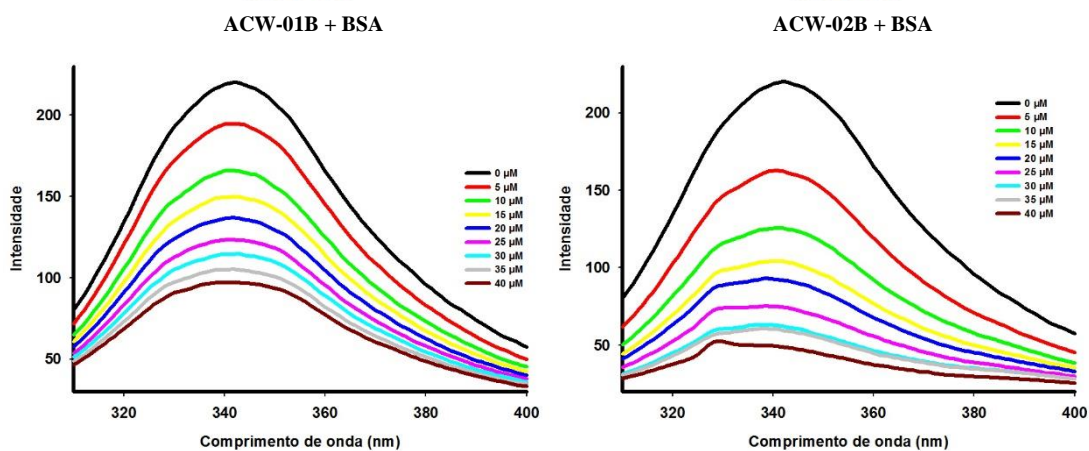
Ambos os derivados apresentaram propriedades absorptivas, contudo o ACW-01B apresentou diminuição nas bandas de absorção, à medida que se aumentava a concentração do derivado, o que caracteriza o efeito hipocrômico. Já o ACW-02B ocorreu um efeito hiper-crômico, pois as bandas de absorção aumentaram consideravelmente de acordo com o aumento na concentração do mesmo.

6.7 Interação com BSA por fluorescência

Alteração no espectro de fluorescência do BSA na presença de quantidade crescentes dos compostos, podem fornecer informações relativas ao modo de interação. Os espectros de emissão foram registrados na região de 310-400 nm usando um comprimento de onda de excitação de 285 nm. Vale ressaltar que nenhum dos derivados triazolidínicos acridínicos, na ausência de BSA, foram fluorescentes quando excitados em 285 nm nos parâmetros selecionados para o BSA, o que torna a análise de BSA muito autêntica.

As alterações conformacionais do BSA foram avaliadas pela medida da intensidade de fluorescência da proteína antes e depois da adição dos derivados triazolidínicos acridínicos. O efeito dos derivados na intensidade de fluorescência de BSA é visualizado no Gráfico 6 (pág. 99).

Gráfico 6 - Espectros de fluorescência comparando a extinção da fluorescência de BSA na concentração de 20 μM , na presença dos derivados triazolidínicos acridínicos



Fonte: Elaborado pelo autor

Como pode ser observado, o ACW-02B foi o derivado que apresentou maior diminuição na intensidade de fluorescência do BSA, provavelmente devido a substituição do anel acridínico.

Os valores de K_{sv} foram obtidos a partir da inclinação das parcelas de Stern-Volmer. Isso indica a interação de extinção estática entre os derivados triazolidínicos acridínicos e a BSA (Tabela 19).

Tabela 19 - Dados de fluorescência dos derivados triazolidínicos acridínicos com BSA

COMPOSTO	Bandas Exc_Emi (nm)	$\lambda_{\text{máx livre}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx ligado}}$ (nm)	$\Delta\lambda$	Hipocromismo	K_{sv} (M^{-1})
ACW-01B + BSA	2.5_2.5	342 nm	341 nm	1	61%	8.4×10^4
ACW-02B + BSA	2.5_2.5	342 nm	341 nm	1	58.13%	3.17×10^4

K_{sv} : constantes de extinção de Stern-Volmer.

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com as constantes de extinção de Stern-Volmer resultantes (K_{sv}), ambos os derivados triazolidínicos acridínicos apresentaram uma constante de 10^4 M^{-1} , onde o ACW-01B apresentou efeito hipocrômico ligeiramente maior do que o ACW-02B, o que confirma a existência de interação entre os compostos e o BSA.

Todos as parcelas apresentaram uma boa relação linear, indicando um mecanismo de extinção que pode ser estático (a formação de um complexo entre o inibidor e o BSA) ou dinâmico (um processo colisional) (WANG, et al., 2014).

Quando comparado esses resultados obtidos nos testes de interação por fluorescência com a BSA e o *docking* molecular entre os compostos triazolidínicos acridínicos e a BSA, observa-se que nos testes *in silico*, o ACW-02B apresentou interação ligeiramente mais forte do que o ACW-01B. Contudo, no processo de extinção pelo modelo de Stern-Volmer a supressão da fluorescência depende da colisão entre a molécula da proteína excitada e a espécie supressora, e durante este processo pode ocorrer uma mudança conformacional da molécula supressora, o que pode justificar a pequena divergência entre os testes *in vitro* e *in silico*.

6.8 Atividade antiproliferativa

As amostras foram dissolvidas em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em meio de cultura até a concentração final de 0,5%. A amostra é considerada ativa para fins de repetição do experimento e determinação da CI_{50} (concentração inibitória média) quando produz pelo menos 70% de inibição do crescimento celular na concentração de 50 μ M.

O MCF-7 são células do câncer de mama (tumor sólido), a HL-60 são linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda (tumor líquido) e HCT 116 são células do câncer de cólon. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de experimentos independentes em triplicata, testados na concentração de 50 μ M. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. As amostras foram testadas na concentração de 50 μ M apresentando citotoxicidade conforme a Tabela 20.

Tabela 20 - Efeito das amostras na viabilidade das células MCF-7, HL-60 e HCT após 72 h de tratamento.

Produtos teste/ linhagens celulares	% de inibição					
	MCF-7	Erro	HL-60	Erro	HCT	Erro
ACW-01B	-----	-----	30,59*	0,061	64,56*	0,82
ACW-02B	11,94	0,015	0,0	0,036	34,54*	1,27

* $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado; (----): Não foi possível fazer a leitura.

Fonte: Elaborado pelo autor

Nesse contexto, ao analisar a Tabela 16, observou-se que nenhuma das substâncias testadas apresentaram inibição superior a 70% para todas as linhagens testadas, tendo como melhor resultado o ACW-01B, que apresentou uma atividade moderada com 64,56% de inibição da linhagem celular HCT 116 (câncer de cólon). Já o ACW-02B apresentou pouca ou nenhuma atividade nas linhagens testadas.

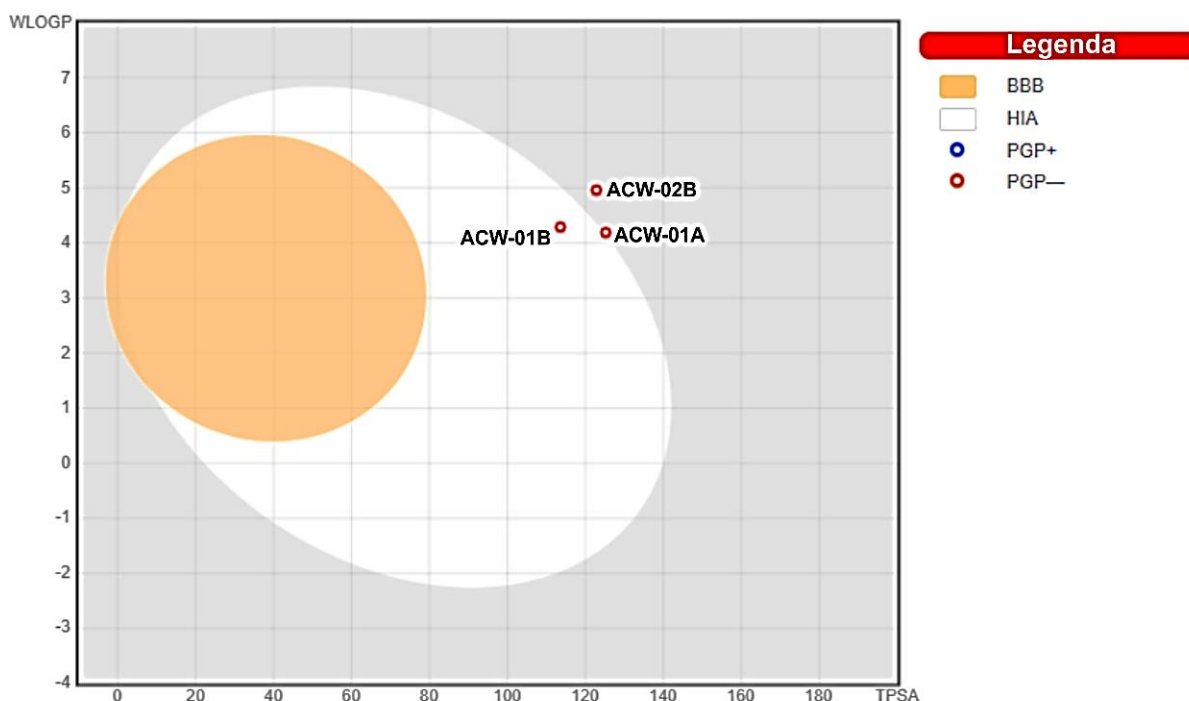
No teste de citotoxicidade frente a linhagem MCF-7 (câncer de mama). Não foi possível realizar a leitura dos resultados do ACW-01B, pois a coloração intensa prejudicou a leitura dificultando a observação da inibição ou não das células. Contudo, Almeida e colaboradores (2016) observaram que os seus compostos derivados da acridina apresentaram atividade anti-proliferativa considerável para a linhagem MCF-7. Desta forma, não se pode descartar uma possível atividade citotóxica do ACW-01B para esta mesma linhagem celular.

Em relação ao resultado com a linhagem celular HCT 116, por o mesmo estar presente em tumores sólidos, a atividade citotóxica moderada do ACW-01B para tumor sólido corrobora com os dados obtidos no *docking* molecular com a enzima Bcl-2 (câncer de mama), no qual o composto ACW-01B apresentou menor energia de interação ($-7,21 \text{ kcal mol}^{-1}$) do que o composto ACW-02B ($-7,11 \text{ kcal mol}^{-1}$).

6.9 Estudos de ADME

Os compostos ACW-01A, ACW-01B e ACW-02B foram submetidos a estudos farmacocinéticos e de predição de possíveis alvos farmacológicos através do programa SWISS ADME, disponível online. No referente estudo foi possível definir algumas características farmacocinéticas através no modelo Boiled-Egg, o qual ilustra as previsões para permeação gastrointestinal humana passiva (HIA) e barreira hematoencefálica (BBB) (Figura 57, pág. 102).

Figura 57 - Modelo Boiled-Egg dos compostos sintetizados.



Fonte: Swiss ADME

Como ilustrado na figura 57, nenhum dos compostos apresentaram capacidade de permeação da barreira hematoencefálica, contudo, o ACW-01A e o ACW-01B se destacaram em apresentar alta capacidade de permeação gastrointestinal, o que pode favorecer a melhores resultados nos estudos *in-vivo*, quando realizados, pois de acordo com o modelo Boiled-Egg, os compostos encontram-se dentro da área branca, o que potencialmente caracteriza alta permeabilidade no aparelho gastrointestinal.

Esta característica pode estar diretamente relacionada ao núcleo de acridina que não apresenta substituinte, no caso dos compostos que apresentaram alta permeabilidade, em contrapartida com o composto ACW-02B, o qual apresenta núcleo de acridina di-substituído, porém apresentou baixa permeabilidade gastrointestinal (GI), como demonstrando também na Tabela 21 (pág. 103).

Tabela 21 - Dados farmacocinéticos, gerados pelo Swiss ADME, dos compostos sintetizados

Composto	GI	BBB	P-gp	CYP 1A2	CYP 2C19	CYP 2C9	CYP 2D6	CYP 3A4	Log K _p
ACW-01A	Alta	Nao	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	-5,24
ACW-01B	Alta	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	-5,72
ACW-02B	Baixa	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	-5,68

GI: Absorção gastrointestinal; BBB: Permeação na Barreira Hematoencefálica; P-gp: Substrato de P-glicoproteína; CYP: Inibidor de Citocromo P450; Log K_p: Coeficiente de permeabilidade da pele.

Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando os resultados dispostos na Tabela 21, é possível identificar que os compostos ACW-01B e ACW-02B apresentaram-se como possíveis inibidores dos Citocromo 1A2 (enzima envolvida no metabolismo de xenobióticos no organismo humano), P450 2C19 (proteína envolvida no metabolismo de xenobióticos, incluindo muitos inibidores da bomba de prótons e antiepiléticos) e Citocromo P450 2C9 (enzima importante do citocromo P450 com um papel importante na oxidação de compostos xenobióticos e endógenos), contendo ainda, o ACW-02B e o ACW-01A, possível atividade inibitória para o Citocromo P450 3A4 (é uma das enzimas mais importantes dos mamíferos, pois oxida medicamentos, toxinas, alimentos e xenobióticos, geralmente inativando-as e tornando-as mais fáceis de serem eliminadas. Também atuam na síntese de lipídeos, como o colesterol).

Outra informação relevante é o Log K_p, que visa prever o coeficiente de permeabilidade da pele. Ele é adaptado de Potts e Guy (1992), que encontraram K_p linearmente correlacionado com tamanho molecular e lipofilicidade ($R_2 = 0,67$). Quanto mais negativo o log K_p (com K_p em $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), menos permeante de pele é a molécula. De acordo com essas informações, os três compostos apresentaram baixa permeabilidade da pele, tendo o ACW-01A, Log K_p de -5,24 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, o ACW-01B apresentou Log K_p de -5,72 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e o ACW-02B com Log K_p de -5,68 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Em relação ao Log P, amplamente utilizado para estimar como uma droga pode ser transferida entre diferentes meios biológicos (YOUNG et al., 2011; LIPINSKI et al., 1997) e amplamente utilizado para prever hidrofobicidade de uma molécula (SANGSTER, 1989), foi possível obter os valores de Log P para as moléculas estudadas, utilizando dois métodos que fundamentam as *druglikeness* de Lipinski, utilizando modelo M Log P, metodologia de

Moriguchi (1994) (o qual considera parâmetros como: átomos lipofílicos, átomos hidrofílicos, ligações insaturadas, hidrogênios livres, rigidez da estrutura, entre outras que foram acompanhadas em 1230 compostos e analisados estatisticamente originando este método) (LIPINSKI et al., 1997) e Ghose, utilizando o modelo W Log P, criado por Wildman e Crippen (1999) (modelo aplicado em um conjunto de 9920 moléculas, com $r^2 = 0,918$ (dado estatístico), apresentou um método que acrescentou 68 parâmetros ajustáveis ao cálculo de Log P).

A Tabela 22 ilustra os resultados obtidos a partir do SwissADME para os valores de W Log P (WILDMAN; CRIPPEN, 1999) e M Log P (LIMPINSKI, et al., 2012; MORIGUCHI, 1994) referente aos compostos ACW-01B e ACW-02B.

Tabela 22 - Log P dos derivados triazolidínicos acridínicos obtidos no SwissADME

Composto	W Log P	M Log P
ACW-01B	4,29	2,49
ACW-02B	4,96	2,69

Fonte: Elaborado pelo autor

Outra informação importante gerada pela plataforma SwissADME é o Log S a qual representa a solubilidade dos compostos orgânicos onde S é a concentração do composto em mol L⁻¹. De modo geral, cerca de 85% dos fármacos tem valores de Log S entre -5 e -1. Moléculas com valores de Log S acima de -1 estão relacionadas com estruturas muito polares, tais como açúcares ou pequenos peptídeos, que apresentam baixa permeabilidade de membrana na ausência de transporte ativo. Este parâmetro é importante pois a solubilidade aquosa e a hidrofobicidade estão diretamente ligadas a capacidade de permeação na membrana (HUUSKONEN et al., 1998; JORGENSEN et al., 2002).

Na Tabela 23 é possível observar as variações os valores de solubilidade dos compostos sintetizados em água através de três modelos de Log S: Log S (ESOL) (DELANEY, 2004), Log S (Ali) (ALI, et al., 2012) e Log S (SILICOS-IT).

Tabela 23 - Solubilidade dos derivados triazolidínicos acridínicos através do Log S

Composto	ACW-01B	ACW-02B	
(ESOL)	Log S	-4,57	-5,19
	Solubilidade	$8,42 \times 10^{-3} \text{ mg.ml}^{-1}$	$2,39 \times 10^{-3} \text{ mg.ml}^{-1}$
	Classificação	Moderada solubilidade	Moderada solubilidade
(Ali)	Log S	-5,56	-6,37
	Solubilidade	$8,59 \times 10^{-4} \text{ mg.ml}^{-1}$	$1,58 \times 10^{-4} \text{ mg.ml}^{-1}$
	Classificação	Moderada solubilidade	Baixa solubilidade
(SILICOS-IT)	Log S	-5,74	-6,44
	Solubilidade	$5,66 \times 10^{-4} \text{ mg.ml}^{-1}$	$1,36 \times 10^{-4} \text{ mg.ml}^{-1}$
	Classificação	Moderada solubilidade	Baixa solubilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando a Tabela 17, foi observado que o ACW-01B apresentou melhor solubilidade em água do que o ACW-02B. Esta característica é de extrema importância para realização dos testes *in vitro* realizados neste estudo, bem como os testes *in vivo* que por ventura venham a ser realizados posteriormente, pois a solubilidade do ACW-01B pode ter influenciado nos resultados dos testes *in vitro*, justificando um melhor resultado deste composto com a interação com DNA e BSA, quando comparado com o ACW-02B, uma vez que este último apresentou baixa solubilidade em meio aquoso.

Outra característica importante quanto aos resultados *in silico* de solubilidade por Log S, é que a dificuldade de leitura no teste *in vitro* da atividade antiproliferativa do ACW-01B frente a linhagem celular, está diretamente relacionada a solubilidade deste composto, o que pode ter potencializado a coloração avermelhada do mesmo em meio aquoso, uma vez que seus cristais solubilizam com mais facilidade do que os cristais de cor laranja do ACW-02B.

7 CONCLUSÃO

Inicialmente foram propostas 06 estruturas a serem sintetizadas, porém após os estudos espectroscópicos e espectrométricos chegou-se à conclusão que dos 6 compostos sintetizados apenas 2 foram obtidos com estruturas diferentes devido ao processo de ciclização com desfragmentação da porção referente ao núcleo anilínico, resultando na obtenção dos derivados inéditos triazolidínicos acridínicos.

Os compostos inéditos foram confirmados através da comprovação estrutural a partir das técnicas espectroscópicas e espectrométricas de RMN de ^1H e ^{13}C , Massas e Infravermelho.

Foram realizadas sínteses mantendo os mesmos reagentes de partida, mas variando as condições reacionais com a finalidade de se obter o composto previsto inicialmente bem como melhorar o rendimento do produto final obtido. Todavia, não foi possível obter o composto previsto visto que a reação final ocorria por processo de ciclização cinético.

Foi possível realizar estudo estatístico o qual se observou que alguns fatores contribuíram para a obtenção do produto final com maior rendimento (87%), sendo as condições propanol (-1), temperatura de 0 °C (-1) e ausência de catalisador (+1).

Os estudos *in silico* através do *docking* molecular, mostraram que o composto ACW-01A foi o que apresentou melhor interação dentre os compostos testados, e que a modificação em sua estrutura o qual se obteve os derivados triazolidínicos, mostrou uma diminuição nas interações demonstrando que a estrutura aberta faz importantes interações com os alvos testados.

Ao transpor os dados obtidos dos estudos *in silico* (*docking* com B-DNA) e *in vitro* (interação com ctDNA), observou-se que ambos os resultados obtidos pelos respectivos estudos direcionam para uma considerável interação dos derivados triazolidínicos acridínicos com o DNA.

Nos estudos de interação com BSA, tanto *in vitro* quanto *in silico*, os resultados obtidos demonstram que ambos os compostos apresentam interação com a albumina de soro bovino, sendo o ACW-02B o de maior interação.

No teste de atividade anti-proliferativa se observou que o ACW-01B apresentou moderada atividade quanto a linhagem celular HCT 116, presente no câncer de cólon, o que sugere que este composto pode apresentar moderada atividade antitumoral para tumores sólidos pois os resultados obtidos no *docking* molecular para a enzima Bcl-2 (câncer de mama) demonstraram que o composto ACW-01B apresentou o melhor resultado de interação.

Por fim, os estudos *in silico* para avaliação das características farmacocinéticas demonstraram que ambos os compostos sintetizados apresentaram Log P entre 2 e 5, enquadrando-se na regra de Limpinski. Em relação a solubilidade o ACW-01B apresentou-se mais solúvel em água do que o ACW-02B. Ambos os compostos não apresentaram permeação pela barreira hematoencefálica, porém o ACW-01B apresentou alta permeação gastro-intestinal de acordo o método de Boiled-Egg. Contudo, em relação a inibição do Citocromo P450 o ACW-02B apresentou diferença ao ser inibidor da CYP 3A4, onde os compostos que inibem a atividade da CYP3A4 geralmente diminuem o clearance hepático e aumentam a concentração plasmática de medicamentos que são substratos da CYP3A4.

8 PERSPECTIVAS

Dentre as ações futuras a serem executadas, se faz necessário tentar sintetizar a 9-cloroacridina com a finalidade de que se obtenha o produto final sem acridona, ou que a quantidade da mesma seja muito pequena, para que dessa forma, possa ser re-sintetizado os derivados triazolidínicos acridínicos com a maior pureza possível, uma vez que foram feitas tentativas de síntese da 9-cloroacridina, mas a mesma apresentava baixa estabilidade oxidando com grande rapidez. E também a comercial foi submetida a processos de recristalização para retirar a acridona, mas sem sucesso.

Para obtenção dos compostos previamente idealizados, será necessária fazer alterações na rota sintética com a finalidade de evitar o ataque intramolecular, como por exemplo adicionando um grupamento retirador de elétrons no fenilisotiocianato para diminuir o poder nucleofílico do NH ligado ao referido núcleo.

Os derivados triazolidínicos acridínicos devem ser submetidos aos estudos *in vitro* de interação com a Topo II α , bem como devem ser realizadas as técnicas de Dicroísmo Circular e Interação com DNA por fluorescência a fim de confirmar se o ACW-01B pode apresentar atividade intercaladora, mesmo que moderado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; SERAFIM, V. L.; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; JÚNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, New York, v. 92, p. 467-475, 2016.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining *docking* and molecular dynamic simulation in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

AMRITA. **Energy minimization of a molecule**. (2013) Disponível em: <<http://vlab.amrita.edu/index.php?sub=3&brch=277&sim=1491&cnt=1>> Acesso em 12 de setembro de 2018.

BARRA, C. V.; NETO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.

BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO M. Acridine and acridone Derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where Are we now? **Advances in AntiCancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 7, p. 139-169, 2007.

BROMBERG, K.D.; BURGIN, A.B.; OSHEROFF, N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7406-7412, 2003.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. A review on molecular *docking*: Novel tool for drug discovery. **JSM Chemistry**, Allahabad, v. 4, n. 3, p. 1-4, 2016.

CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K.; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 63, p. 305-336, 2011.

CHOLEWIŃSKI, G.; Synthesis of the inosine 50-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [Basingstoke], v. 30, n. 4, p. 550-563, 2015.

CHOLEWIŃSKI, G.; IWASZKIEWICZ-GRZES, D.; TRZONKOWSKI, P.; DZIERZBICKA, K. Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/ acridones as potential immunosuppressive agentes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [Basingstoke], v. 31, n. 6, p. 974-982, 2016.

CHTITA, S.; GHAMALI, M.; HMAMOUCHE, R.; ELIDRISSI, B.; BOURASS, M.; LARIF, M.; BOUACHRINE, M.; LAKHLIFI, T. Investigation of antileishmanial activities of acridines derivatives against promastigotes and amastigotes form of parasites using quantitative structure activity relationship analysis. **Advances in Physical Chemistry**, New

Jersey, v. 2016, p. e5137289, 2016. Disponível em:
<<https://www.hindawi.com/journals/apc/2016/5137289/>>. Acesso em 17 Abr. 2017.

CLASSEN, S.; OLLAND, S.; BERGER, J. M. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 100, n. 19, p. 10629-10634, 2003.

COREY, B. W.; THOMPSON, M. G.; HITLLE, L. E.; JACOBS, A. C.; ASAFO-ADJEI, E. A.; HUGGINS, W. M.; MELANDER, R. J.; MELANDER, C.; ERNST, R. K.; ZURAWSKI, D. V. 1,2,4-Triazolidine-3-thiones have specific activity against *Acinetobacter baumannii* among common nosocomial pathogens. **ACS Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, p. 62-71, 2017.

DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss ADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. v. 7, p. 42717, 2017.

DIMMOCK, J. R.; SIDHU, K. K.; TUMBER, S. D.; BASRAN, S. K.; CHEN, M.; QUAIL, J. W.; YANG, J.; ROZAS, I.; WEAVER, D. F. Some aryl semicarbazones possessing anticonvulsant activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 30, n. 4, p. 287-301, 1995.

DOBBELSTEIN, M.; MOLL, Y. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. **Nature reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 179-196, 2014.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A. T. What is the most important approach in current drug discovery: Doing the right things or doing things right? **Drug Discovery Today**, Amsterdã, v. 17, n. 21-22, p. 1166-1169, 2012.

EL-SUBBAGH, H. I.; AL-OBAID, A. M. 2,4-Disubstituted thiazoles II: a novel class of antitumor agents, synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 31, n. 12, p. 1017-1021, 1996.

EHMANN, D. E.; LAHIRI, S. D. Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase / DNA gyrase. **Current Opinion in Pharmacology**, Amsterdã, v. 18, p. 76-83, 2014.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. 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.

GAIKWAD, P.L.; GANDHI, P.S.; JAGDALE, D.M.; KADAM, V.J. The use of bioisosterism

in drug design and molecular modification. **American Journal of Pharmtech Research**, Ahmedabad, v. 2, n. 4, p. 1-23, 2012.

GAO, C.; LIU, F.; LUAN, X.; TAN, C.; LIU, H.; XIE, Y.; JIN, Y.; JIANG, Y. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, n. 21, p. 7507-7514, 2010.

GAO, E.; ZHU, M.; LIU, L.; HUANG Y.; WANG, L.; SHI, C.; ZHANG, W.; SUN, Y. Impact of the carbon chain length of novel palladium(II) complexes on interaction with DNA and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3261-370, 2010.

GFELLER, D.; GROSDIDIER, A.; WIRTH, M.; DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p32-38, 2014.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Res**, v. 39, p. 270-277, 2011.

GOUVEIA, R. G.; RIBEIRO, A. G.; SEGUNDO, M. A. S. P.; OLIVEIRA, J. F.; LIMA, M. C. A.; SOUZA, T. R. C.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURA, R. O. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5911-5921, 2018.

HEINDEL, N. D.; JR-REID, J. 4-Amino-3-mercapto-4H-1,2,4-triazoles and propargyl aldehydes: A new route to 3-R-8-aryl-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazepines. **Journal of Heterocyclic Chemistry**. Wiley-Blackwell, v. 17, n. 5, p. 1087-1088, 1080.

HUGGINS, W. M.; MINROVIC, B. M.; COREY, B. W.; JACOBS, A. C.; MELANDER, R. J.; SOMMER, R. D.; ZURAWSKI, D. V.; MELANDER, C. 1,2,4-Triazolidine-3-thiones as narrow spectrum antibiotics against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Atlanta, v. 8, p. 27-31, 2017.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. **Topics in Current Chemistry**. v. 258, p. 161-204, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**. Rio de Janeiro, 2017a. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/>. Acesso em: 13 jan. 2019.

JANOČKOVÁ, J.; PLSIKOVÁ, J.; KASPÁRKOVÁ, J.; BRADEC, V.; JENDZELOVSKÝ, R.; MIKES, J.; KOVAI, J.; HAMULOKOVÁ, S.; FEDOROCKO, P.; KUČA, K.; KOZURKOVÁ, M. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL 60 cells by novel acridine-based compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 76, p. 192-202, 2015.

JANOVEC, L.; KOŽURKOVÁ, M.; SABOLOVÁ, D.; UNGVARSKÝ, J.; PAULÍKOVÁ, H.; PLŠÍKOVÁ, J.; VANTOVÁ, Z.; IMRICH, J. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 1790-1801, 2011

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 1126–1132, 2009

KATRITZKY, A. R.; RAMSDEN, C. A.; JOULE, J. A.; ZNDANKIN, V. V. **Handbook of Heterocyclic Chemistry**. Third. Ed. Elsevier, 1010 p., 2010.

KAVA, H. W.; MURRAY, V. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, n. 19, p. 4701-4710, 2016.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 132, n. 3, p. 171-183, 2008

KIRKIN, V.; JOOS, S.; ZÖRNIG, M. The Role of Bcl-2 Family Members in Tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, Amsterdã, v. 1644, n. 2-3, p. 229–249, 2004.

KUMAR, A.; BORA, U. Molecular *Docking* Studies of Curcumin Natural Derivatives with DNA Topoisomerase I and II-DNA Complexes. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, Shanghai, v. 6, p. 1-7, 2014.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: a versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**. Warsaw, v. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; SHARMA, S.; SILAKARI, O.; SINGH, M.; KAUR, M. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, Varsóvia, v. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

LAFAYETTE, E. A.; ALMEIDA, S. M. V.; PITTA, M. G.; BELTRÃO, E. I. C.; SILVA, T. G.; MOURA, R. O.; IDA, R. P.; CARVALHO, L. B. JR.; LIMA, M. C. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035-15050, 2013.

LAGIER-TOURENNE, C.; POLYMERIDOU, M.; CLEVELAND, D. W. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. **Human Molecular Genetic**, Oxford, v. 19, n. R1, p. R46-R64, 2010.

LANG, X.; LI, I.; CHEN, Y.; SUN, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 21, n. 14, p. 4170-4177, 2013.

LEITE, A. C. L.; DE LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNADES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, *docking*, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 3749-3757, 2006.

LI, B.; GAO, C-M.; SUN, Q-S.; LI, L-L.; TAN, C-Y.; LIU, H-X.; JIANG, Y-Y. Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Chinese Chemical Letters*, Beijing, v. 25, n. 7, p. 1021-1024, 2014.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1456-1468. 2007.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modifications and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, Q.; ZHANG, J.; WANG, D-W.; LU, Q-S.; HUANG, Y.; LIN, H-H.; YU, X-Q. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 11, p. 5302-5308, 2010.

MACHADO, R. C. **Síntese, caracterização e avaliações biológicas de 4-piridinil, 7-cloro-4-quinolinil e 9-acridinil, semicarbazidas e tiosemicarbazidas**. 2016. 290 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, 2016. Disponível em: < <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1143>>. Acesso em: 17 Abr. 2017.

MAJOREKA, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A.; ZIMMERMAN, M. D.; JABLONSKA, K.; STEWART, A. J.; CHRUSZCZ, M.; MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, v. 52, n. 3-4, p. 174-182, 2012.

MCGHEE, J. D.; VON HIPPEL, P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, n. 2, p. 469-489, 1974.

METWALLY, M. A.; BONDOCK, S.; EL-AZAP, H.; KANDEEL, E-E. M. Thiosemicarbazides: synthesis and reactions. **Journal of Sulfur Chemistry**, London, v. 32, n. 5, p. 489-519, 2011.

MITRA, P.; CHAKRABORTY, P. K.; SAHA, P.; RAY, P.; BASU, S. Antibacterial efficacy of acridine derivatives conjugated with gold nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 473, n. 1-2, p. 636-643, 2014.

MCGHEE, J. D.; VON HIPPEL, P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of Molecular Biology**, London, v.86, n. 2, p. 469-489, 1974.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Edusp, 1ª Ed., 720 p., 2011.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por Complexo de rutênio. **Químca Nova**, São Paulo, v. XY, n. 00, p. 1-6, 2014.

MORIGUCHI, I.; HIRONO, S.; NAKAGOME, I.; HIRANO, H. **Comparison of Reliability of Log P Values for Drugs Calculated by Several Methods**. 1994.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. J.; GOODSELS, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and autodocktools4: Automated *Docking* with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, Nova York, v. 30, n. 16, p.2785-2791, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L.; **Eur. J. Med. Chem.** 2014, 77, 422.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, Reino Unido, v. 9, n. 5, p. 338–350, 2009.

PALANIJARA, J.; KUMAR, S. S.; RAMKI, S.; ARUNACHALAM, P.; ROOPAN, S. M. Conventional spectroscopic identification of biologically active imidazo-pyrimido fused acridines: In vitro anti-bacterial and anti-feedant activity. **Journal of Molecular Liquids**, New York, v. 230, p. 634-640, 2017.

PATANI, G.A.; LAVOIE, E.J. Bioisosterism: a racional approach in drug design. **Chemical Reviews**, Nova York, v. 96, n. 8, p. 3147-3176, 1996.

PATHAK, D.; YADAV, M.; SIDDIQUI, N.; KUSHAWAH, S. Antileishmanial agents: an updated review. **Der Pharma Chemica**, [Hyderabad], v. 3, n. 1, p. 239-249, 2011.

PATOLE, J.; PADHYE, S.; PADHYE, S.; NEWTON, C. J.; ANSON, C.; POWELL, A. K. Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activities of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives of salicylaldehyde and their copper complexes against human breast câncer. **Indian Journal of Chemistry-A**, New Delhi, v. 43A, p. 1654-1658, 2004.

PLSIKOVA, J.; JANOVEC, L.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; MIKES, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROCKO, P.; IMRICH, J.; KRISTIAN, P.; KASPARKOVA, J.; BRABEC, V.; KOZURKOVA, M. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating

antitumor agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 57, p. 283-295, 2012.

POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting Skin Permeability. **Pharmaceutical. Research**, Berlin, v. 09, n. 5, p. 663–669, 1992.

PRASAD, A.; RAJU, G.; SIVALINGAM, V.; GIRDHAR, A.; VEMA, M.; VATS, A.; PRABUSANKAR, G.; PATEL, B. An acridine derivative, [4,5-bis{(n-carboxy methyl imidazolium) methyl}acridine] dibromide, shows anti-TDP-43 aggregation effect in ALS disease models. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. e39490, Dezembro 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep39490>>. Acesso em: 17 Abr. 2017.

RANE, R. A.; NAPHADE, S. S.; BANGALORE, P. K.; PALKAR, M. B.; SHAIKH, M. S.; KARPOORMATH, R. Synthesis of novel 4-nitropyrrole-based semicarbazide and thiosemicarbazide hybrids with antimicrobial and anti-tubercular activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 24, n. 14, p. 3079-3083, 2014.

RASTOGI, S.; RASTOGI, H. An efficient synthesis of some substituted piperidin-4-one thiosemicarbazone derivatives as potential anticonvulsant under microwave irradiation. **Indian Journal of Chemistry**, v. 48B, p. 547-553, 2010.

ROSSI, S.; COZZOLINO, M.; CARRÌ, M. T. Old versus new mechanisms in the pathogenesis of ALS. **Brain Pathology**, Los Angeles, v.26, n. 2, p. 276-286, 2016.

RYBENKOV, V.V.; ULLSPERGER, C.; VOLOGODSKII, A.V.; COZZARELLI, N.R. Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases, **Science**, v. 277, p. 690-693, 1997.

SALEM, O. M.; VILKOVÁ, M.; JANOČKOVÁ, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROCKO, P.; ZILECKÁ, E.; KASPÁRKOVÁ, J.; BRABEC, V.; IMRICH, J.; KOZURKOVÁ, M. New spiro tria(thia)zolidine acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 690-700, 2016.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, D. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of *N*- and *O*- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SANCHEZ, I.; RECHES, R.; HENRY, D. C.; RENARD, P. PUJOL, M.D. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of *N*- and *O*- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 340–352, 2006.

SETHY, S.P.; MEHER, C. P.; BISWAL, S.; SAHOO, U.; PATRO, S. K. The role of bioisosterism in molecular modification and drug design: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 1, p. 61-87, 2013.

SILVA, R. T.; PERERA, R. P.; NANAYAKKARA, C. M. Design, Synthesis and antibacterial activity evaluation of 9-phenyl-10-(2-phenylalkyl) acridinium bromide: a novel

acridine based antibacterial agent. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Gunter, v. 8, n. 2, p. 114-123, 2014.

SILVA, S. V. R. L. Pesquisa computacional de inibidores de fatores de virulência de *Bacillus anthracis*. 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **Livros Técnicos e Científicos – LTC**, Rio de Janeiro, 7^o ed., 490 p., 2015.

SINGH, P.; KUMAR, A.; SHARMA, A.; KAUR, G. Identification of amino acid appended acridines as potential leads to anti-cancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, n. 18, p. 3854-3858, 2015.

SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Synthesis and in vitro evaluation of novel triazine analogues as anticancer agents and their interaction studies with bovine serum albumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 117, p. 59-69, 2016.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug DNA interactions and their study by UV Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1, 2013.

SIWEK, A.; STĄCZEK, P.; WUJEC, M.; STEFAŃSKA, J.; KOSIKOWSKA, U.; MALM, A.; JANKOWSKI, S.; PANETH, P. Biological and *docking* studies of topoisomerase IV inhibition by thiosemicarbazides. **Journal of Molecular Modeling**, Berlin, v. 17, n. 9, p. 2297-2303, 2011.

SIWEK, A.; STEFAŃSKA, J.; DZITKO, K.; RUSZCZAK, A. Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. **Journal of Molecular Modeling**, Berlin, v. 18, n. 9, p. 4159-4170, 2012.

SHAIKH, B. M.; KONDA, S. G.; MEHARE, A. V.; MANDAWAD, G. G.; CHOBE, S. S.; DAWANE, B. S. One-pot multicomponent synthesis and antibacterial evaluation of some novel acridine derivatives. **Der Pharma Chemica**, [Hyderabad], v. 2, n. 4, p. 25-29, 2010.

SHAHABADI, N.; KASHANIAN, S.; DARABI, F. DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: the effect of metal on the mode of binding. **European Journal Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 4239-4295, 2010.

SHIPMAN JR, C.; SMITH, S. H.; DRACH, J. C.; KLAYMAN, D. L. Antiviral activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [Washington], v. 19, n. 4, p. 682-685, 1981.

SONDHI, S. M.; SINGH, J.; RANI, R.; GUPTA, P. P.; AGRAWAL, S. K.; SAXENA, A. K. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 2, p. 555-563, 2010.

SWISS ADME. A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

TANCHUK, V. Y.; TANIN, V. O.; VOVK, A. I.; PODA, G. A New Scoring Function for Molecular *Docking* Based on AutoDock and AutoDock Vina. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, p. 170-178, 2015.

TAVARES, A. B. M. L. A. **Inibição do cancer de mama utilizando imunoterapia através de uma modelagem computacional quântica**. 2017. 112 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

TIWARIA, J.; SAQUIBA, M.; SINGHA, S.; TUFAILA, F.; SINGHC, J.; SINGH, J. Catalyst-free glycerol-mediated green synthesis of 5'-thioxospiro[indoline-3,3'-[1,2,4]triazolidin]-2-ones/spiro[indoline-3,3'-[1,2,4]triazolidine]-2,5'-diones. **Synthetic Commun.** v. 47, p. 1999–2006, 2017.

THOMAS, K. D.; ADHIKARI, A. V.; TELKAR, S.; CHOWDHURY, I. H.; MAHMOOD, R.; PAL, N. K.; ROW, G.; SUMESH, E. Design, synthesis and *docking* studies of new quinoline-3-carbohydrazide derivatives as antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 46, n. 11, p. 5283-5292, 2011.

TROTT, A. E OLSON, A. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of *Docking* with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **J Comput Chem.** 31, pp. 455-461, 2010.

ULIANA, C.V; GARBELLINI, G.S; YAMANAKA, H. Spectrophotometric evaluation of the behavior of disperse red 1 dye in aqueous media and its interaction with calf thymus ds-DNA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 8, p. 1469-1475, 2012.

ULUS, R.; ADAY, B.; TANÇ, M.; SUURAN, C. T.; KAYA, M. Microwave assisted synthesis of novel acridine–acetazolamide conjugates and investigation of their inhibition effects on human carbonic anhydrase isoforms hCA I, II, IV and VII. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 24, n. 16, p. 3548-3555, 2016.

ULUS, R.; KAYA, M.; DEMIR, D.; TUNCA, E.; BÜLBÜL, M. Three-component synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel octahydroacridines incorporating sulfaguanidine scaffold. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [Basingstoke], v. 31, n. S2, p. 63-69, 2016.

VALDÉS, A. F-C. Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, Sharjah, v. 5, p. 11-20, 2011.

WANG, F.; YIN, H.; CUL, J.; ZHANG, Y.; GENG, H.; HONG.; Synthesis, structural characterization, in vitro cytotoxicities, DNA-binding and BSA interaction of diorganotion (IV) complex derived from hydrazone Schiff base. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 759, p. 83-91, 2014.

- WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. **Glossary of terms in Medicinal Chemistry**. Pure and Applied Chemistry, 3 ed. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 2008.
- WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 39, n. 5, p. 868–873, 1999.
- WIRTH, M., ZOETE, V., MICHIELIN, O. & SAUER, W. H. B. SwissBioisostere: a database of molecular replacements for ligand design. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. 1137–1143, 2013.
- XIANG, M. et al. Computer-aided drug design: lead discovery and optimization. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 15, n. 4, p. 328–37, 1 maio 2012.
- YOUNG, R. J.; GREEN, D. V. S.; LUSCOMBE, C. N.; HILL, A. P. Getting physical in drug discovery II: the impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17-18, p. 822-830, 2011.
- ZHANG, W.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; YANG, T.; WANG, N.; GAO, C.; TAN, C.; LIU, H.; JIANG, Y. Synthesis and antiproliferative activity of 9-benzylamino-6-chloro-2-methoxy-acridine derivatives as potent DNA-binding ligands and topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 116, p. 59-70, 2016.
- ZHAO, J.; LI, W.; MA, R.; CHEN, S.; REN, S.; JIANG, T. Design, synthesis and DNA interaction study of new potential DNA bis-intercalators based on glucuronic acid. **International Journal of Molecular Sciences**, California, v. 14, p. 16851-16865, 2013.
- ZOETE, V.; CUENDET, M. A.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, p. 2359–2368, 2011.
- ZOETE, V.; DAINA, A.; BOVIGNY, C.; MICHIELIN, O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, p. 1399–1404, 2016.

ANEXOS

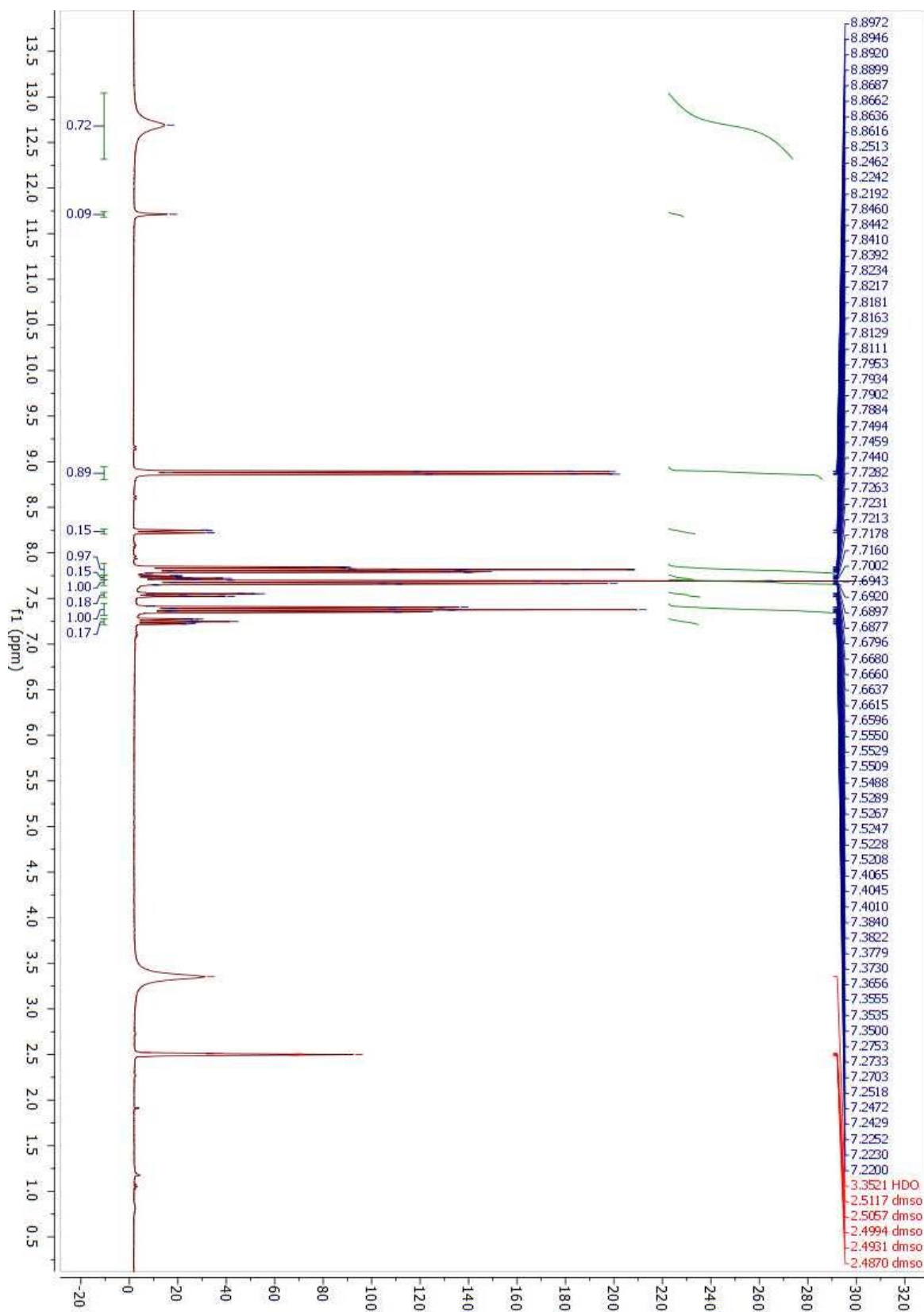
Figura Suplementar A1 - RMN de ^1H do composto ACW-01B

Figura Suplementar A2 - RMN de ^1H do composto ACW-01B (Ampliação)

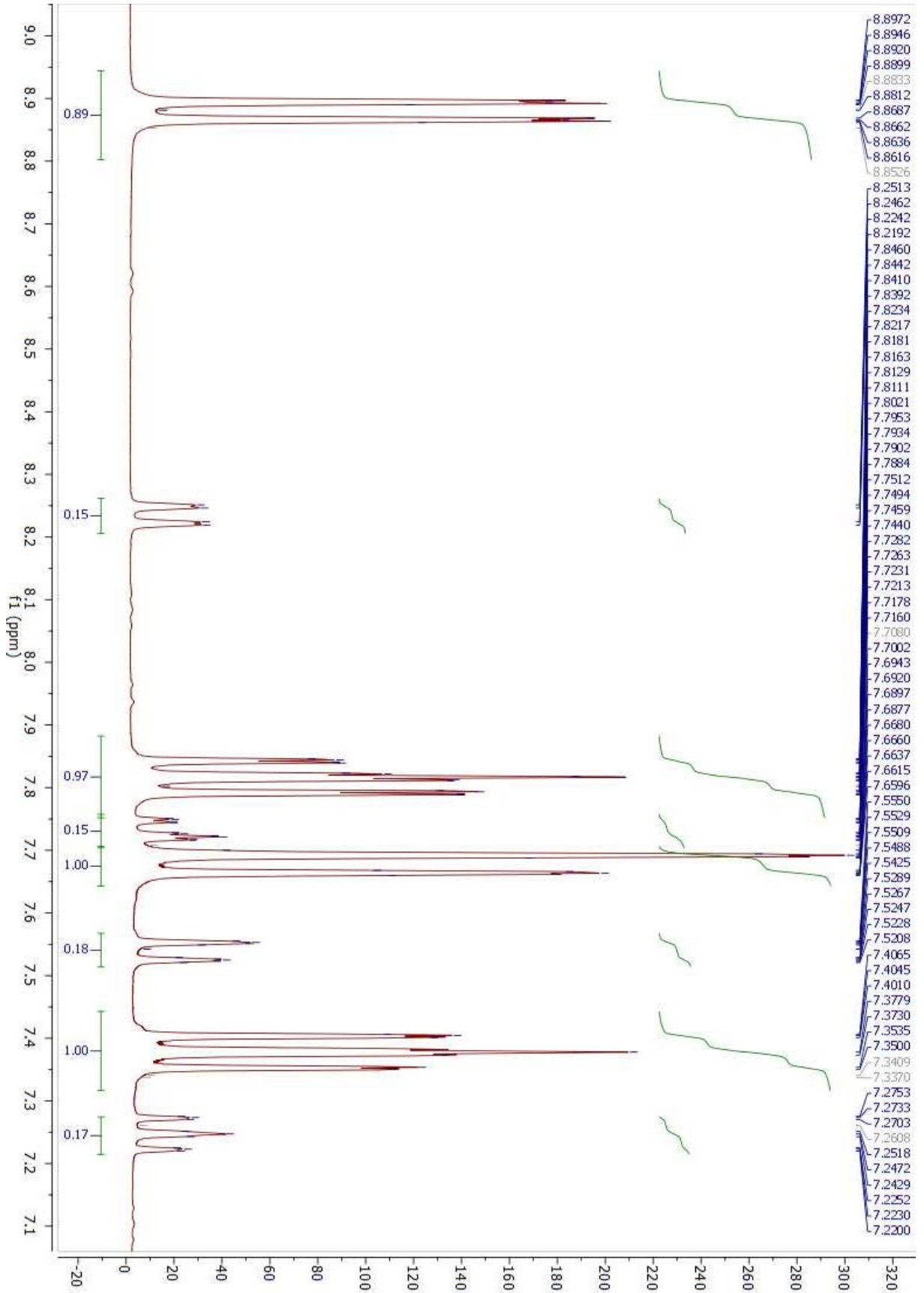


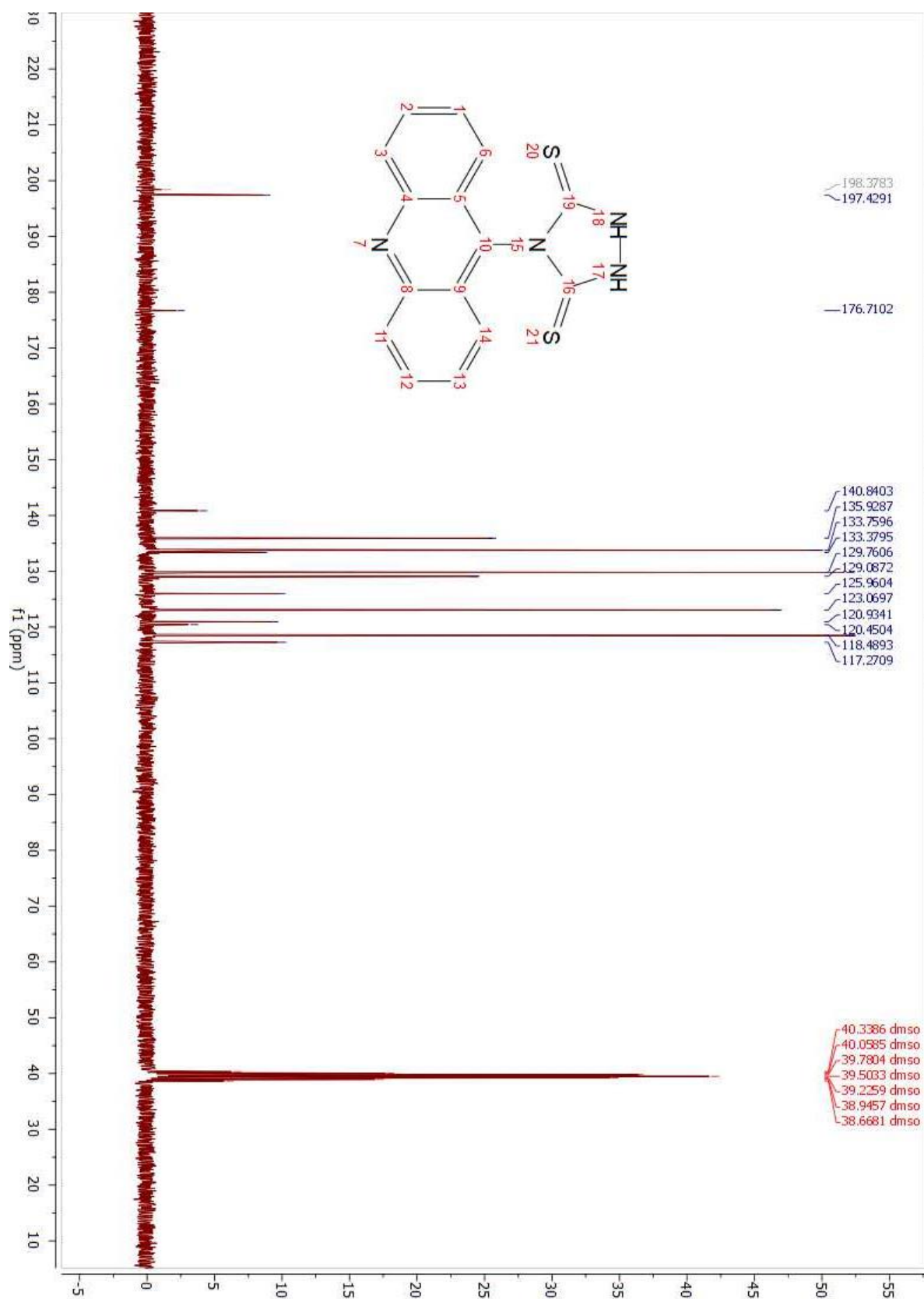
Figura Suplementar A3 - RMN de ^{13}C do composto ACW-01B

Figura Suplementar A4 - Infravermelho do composto ACW-01B

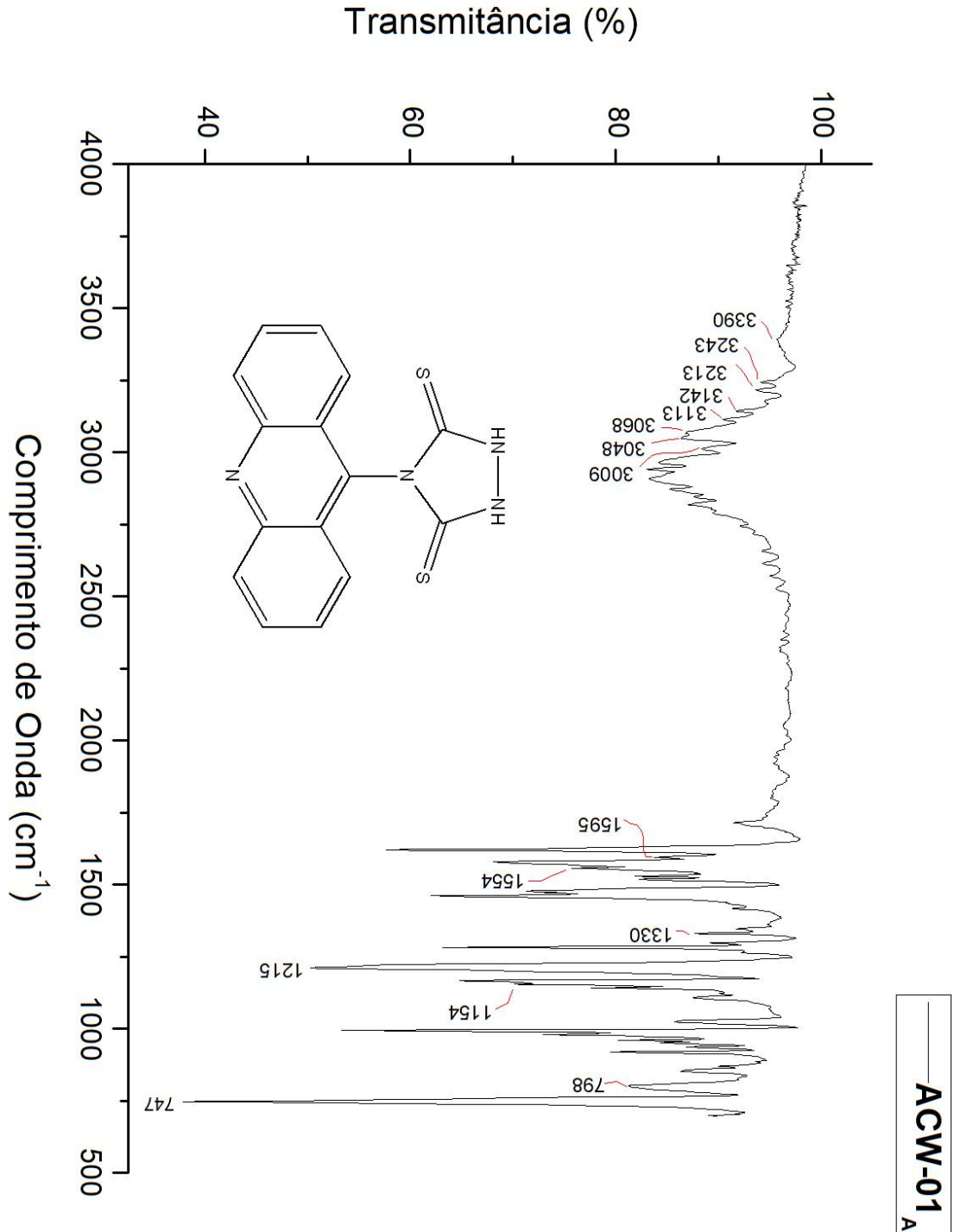


Figura Suplementar A5 - Espectro de Massas por MALDI-TOF do composto ACW-01B

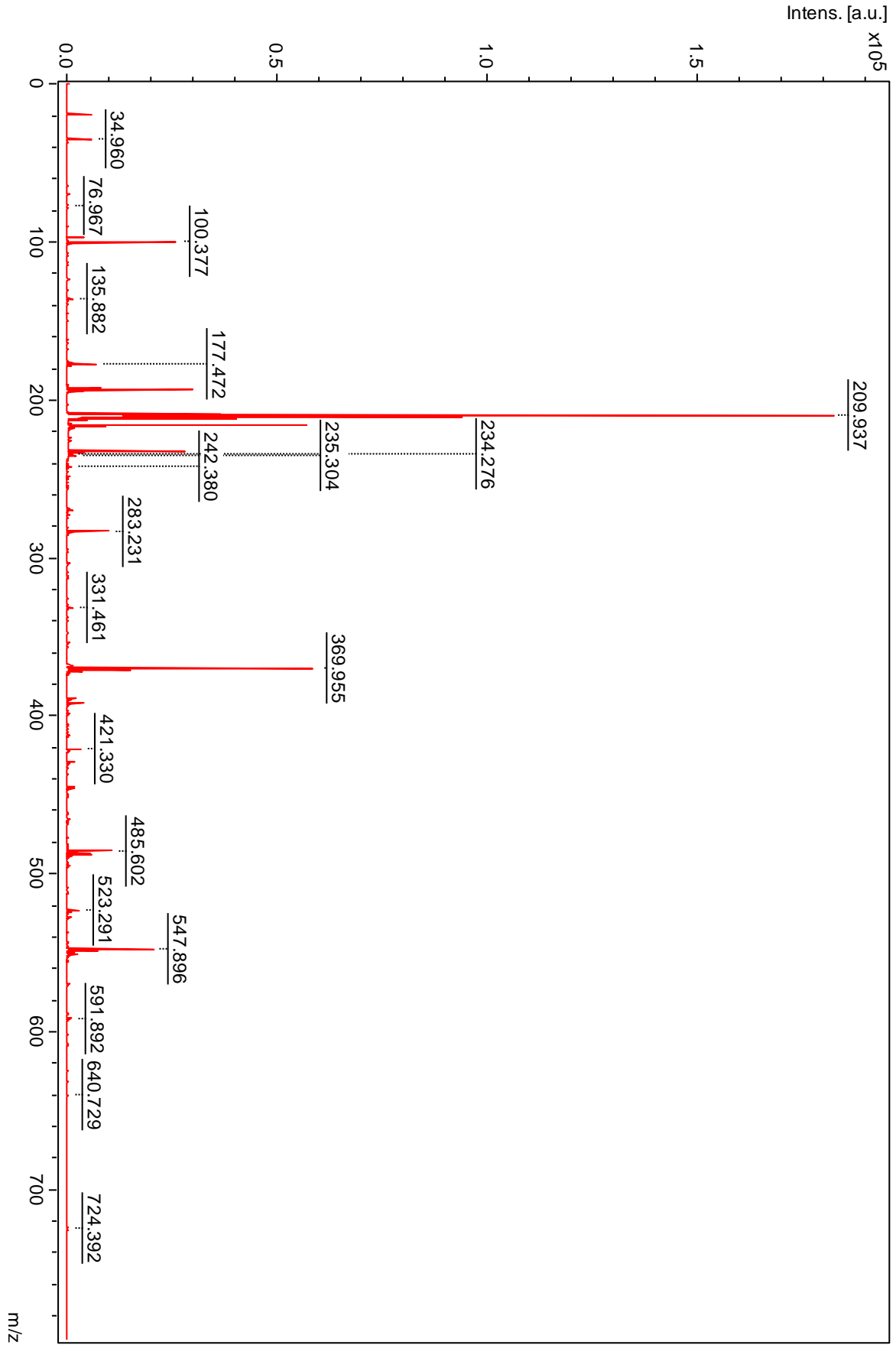


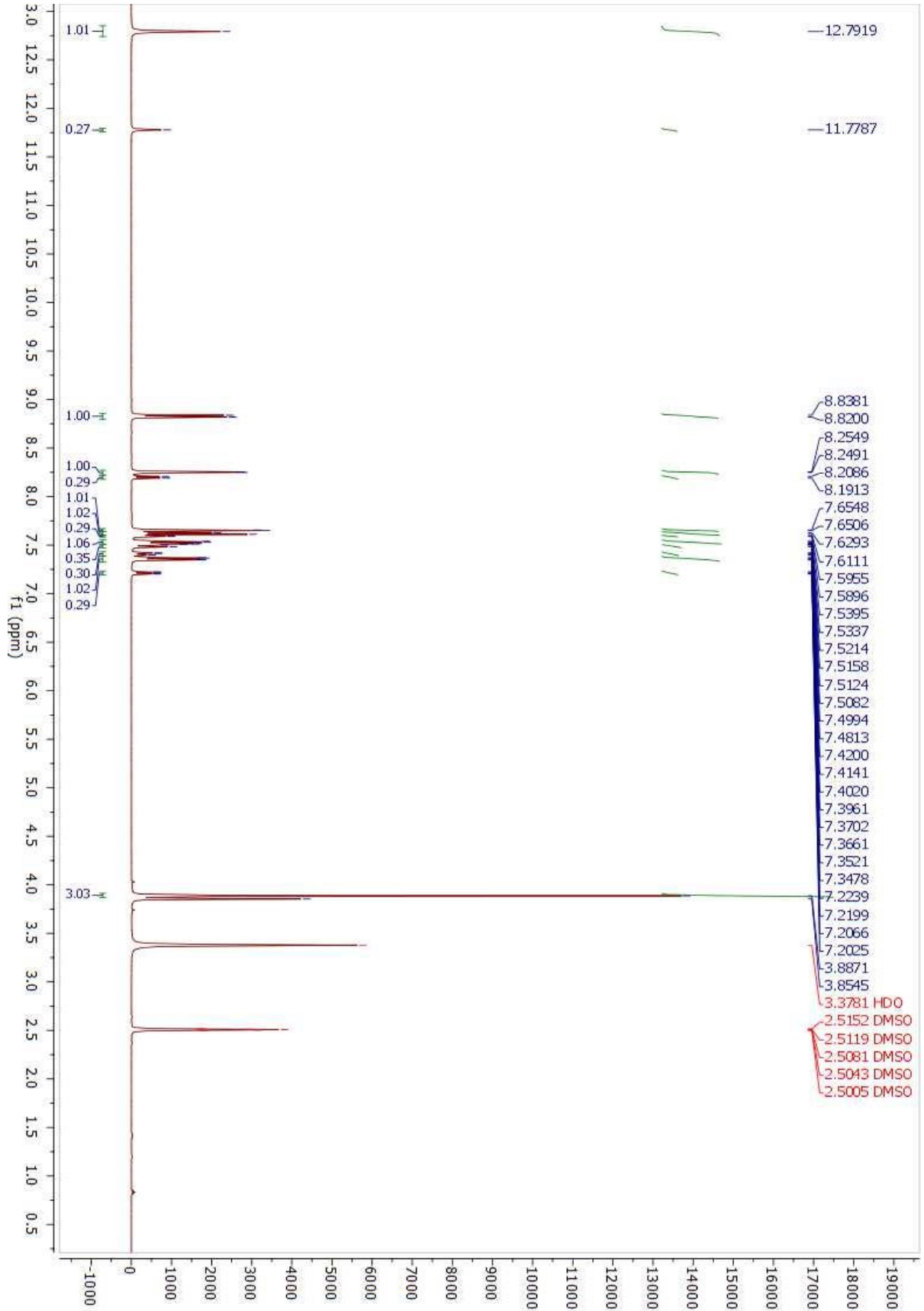
Figura Suplementar A6 - RMN de ^1H do composto ACW-02B

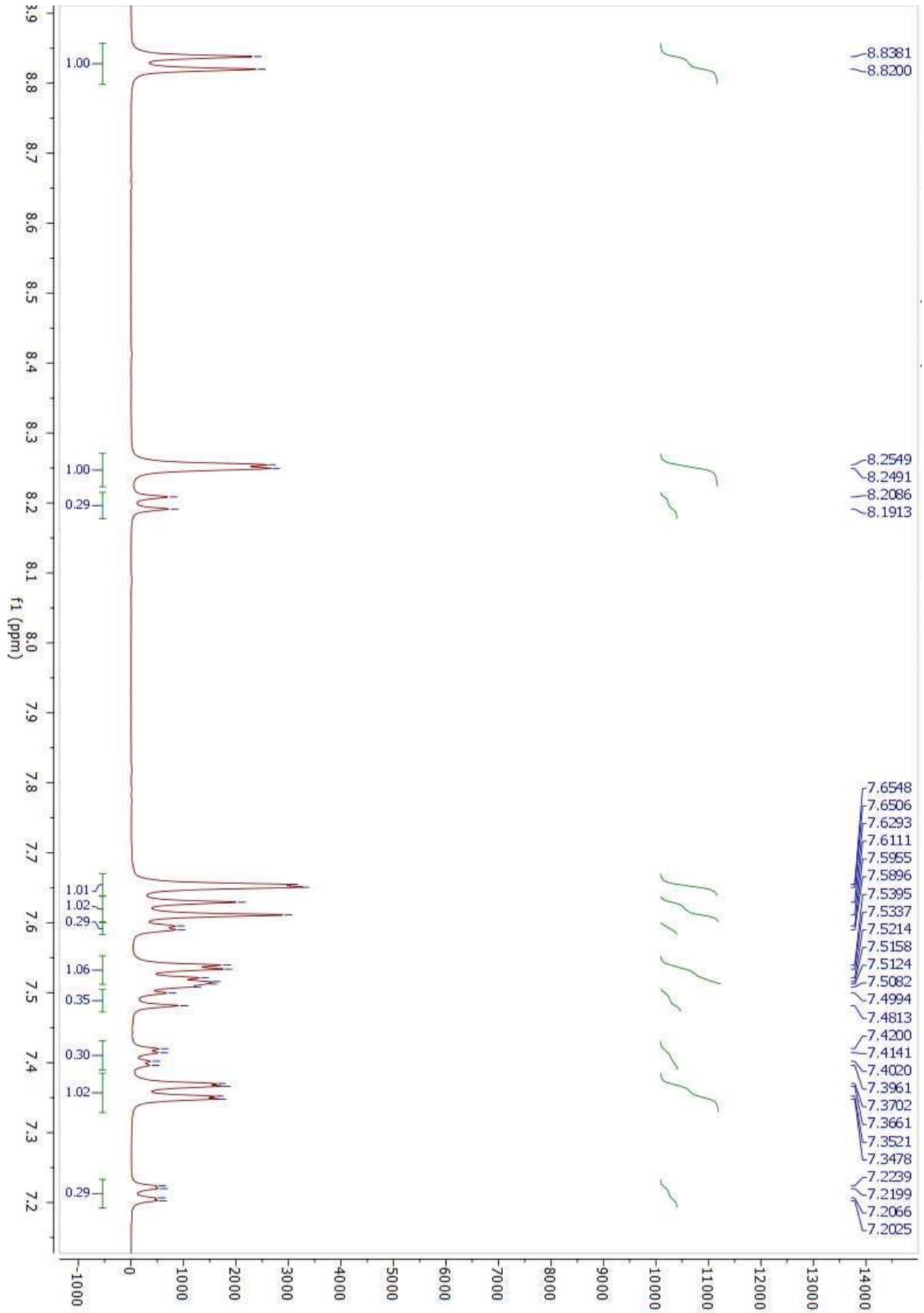
Figura Suplementar A7 - RMN de ^1H do composto ACW-02B (Ampliação)

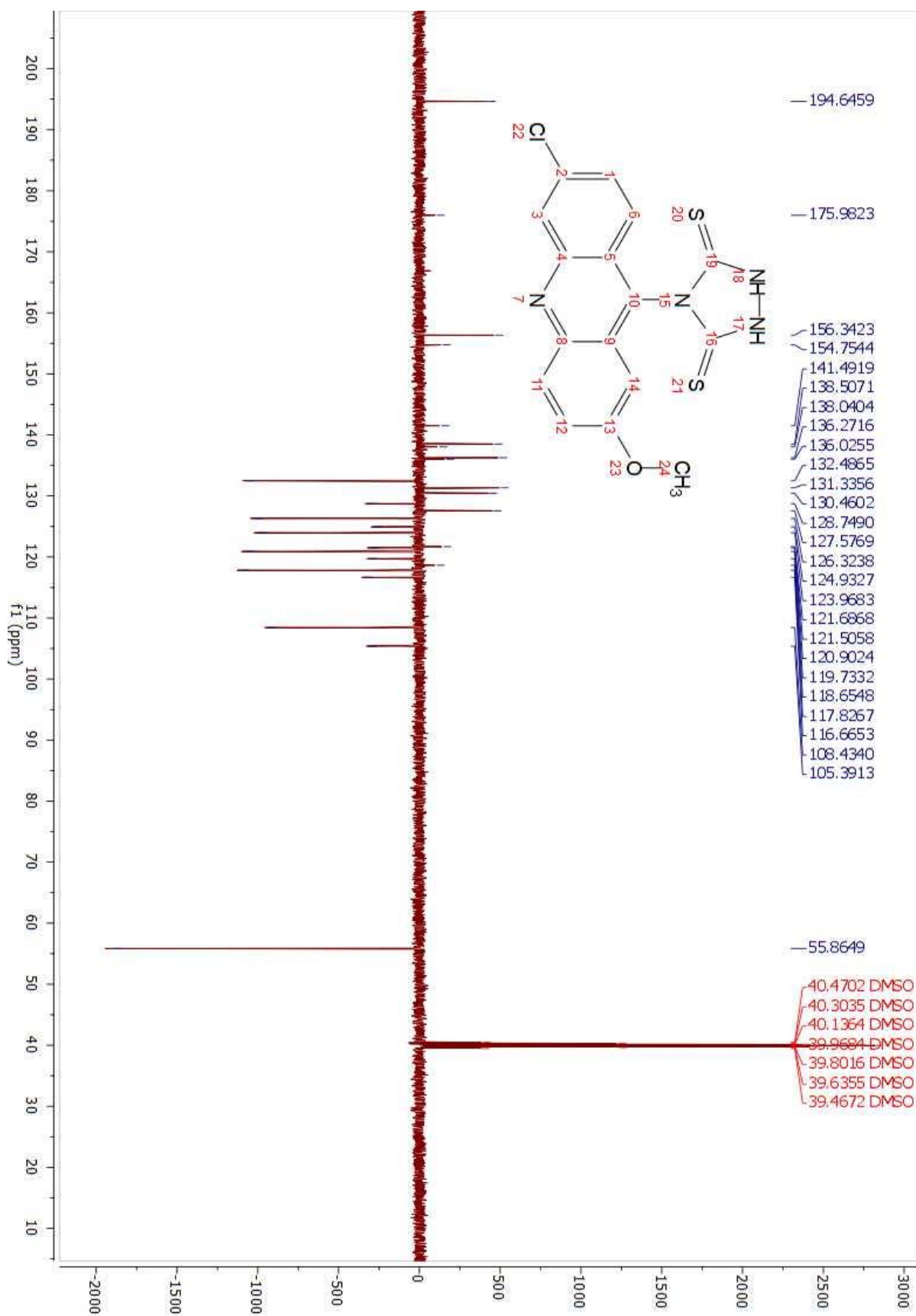
Figura Suplementar A8 - RMN de ^{13}C (DEPT-Q) do composto ACW-02B

Figura Suplementar A9 - Infravermelho do composto ACW-02B

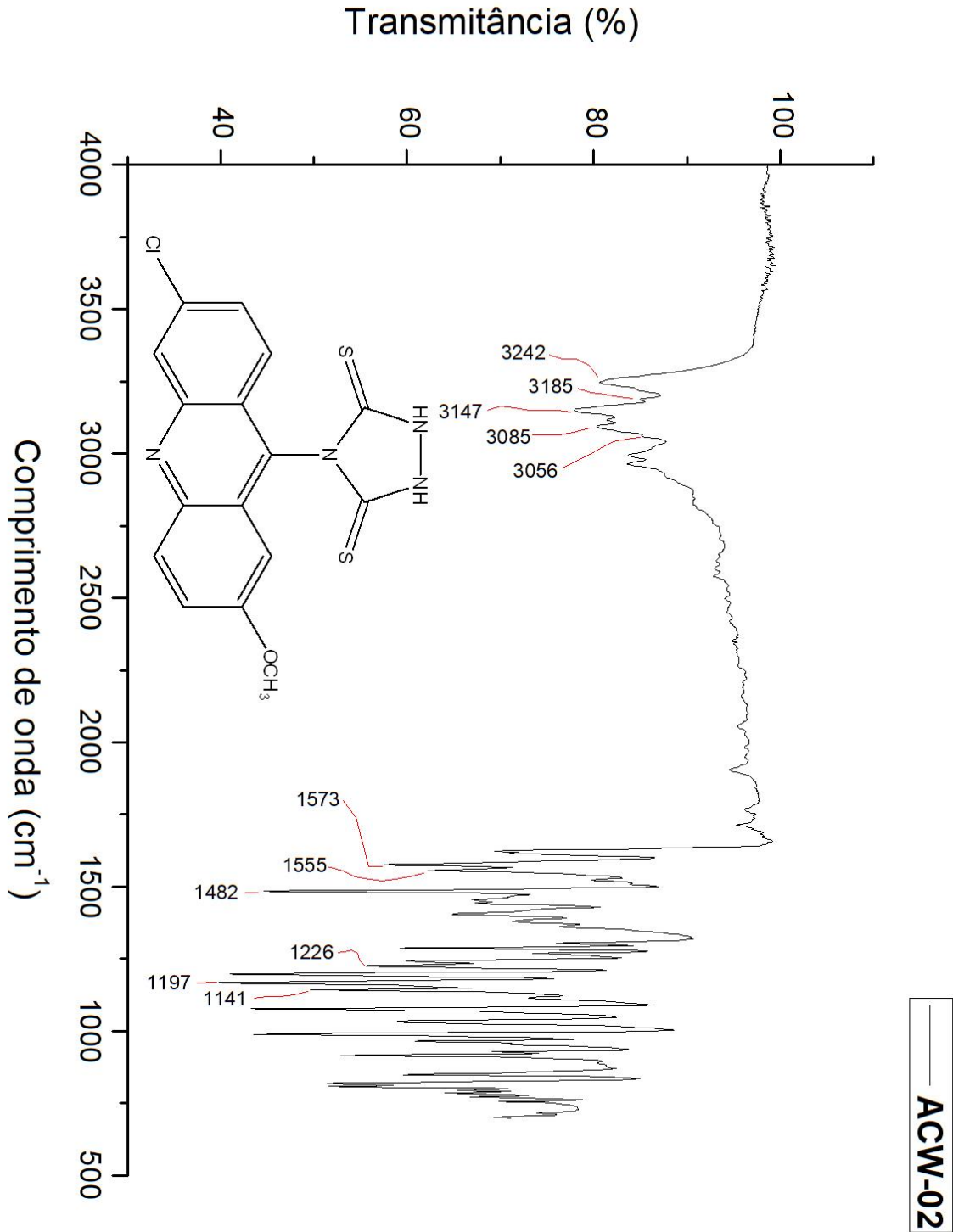


Figura Suplementar A10 - Espectro de Massas por MALDI-TOF do composto ACW-02B

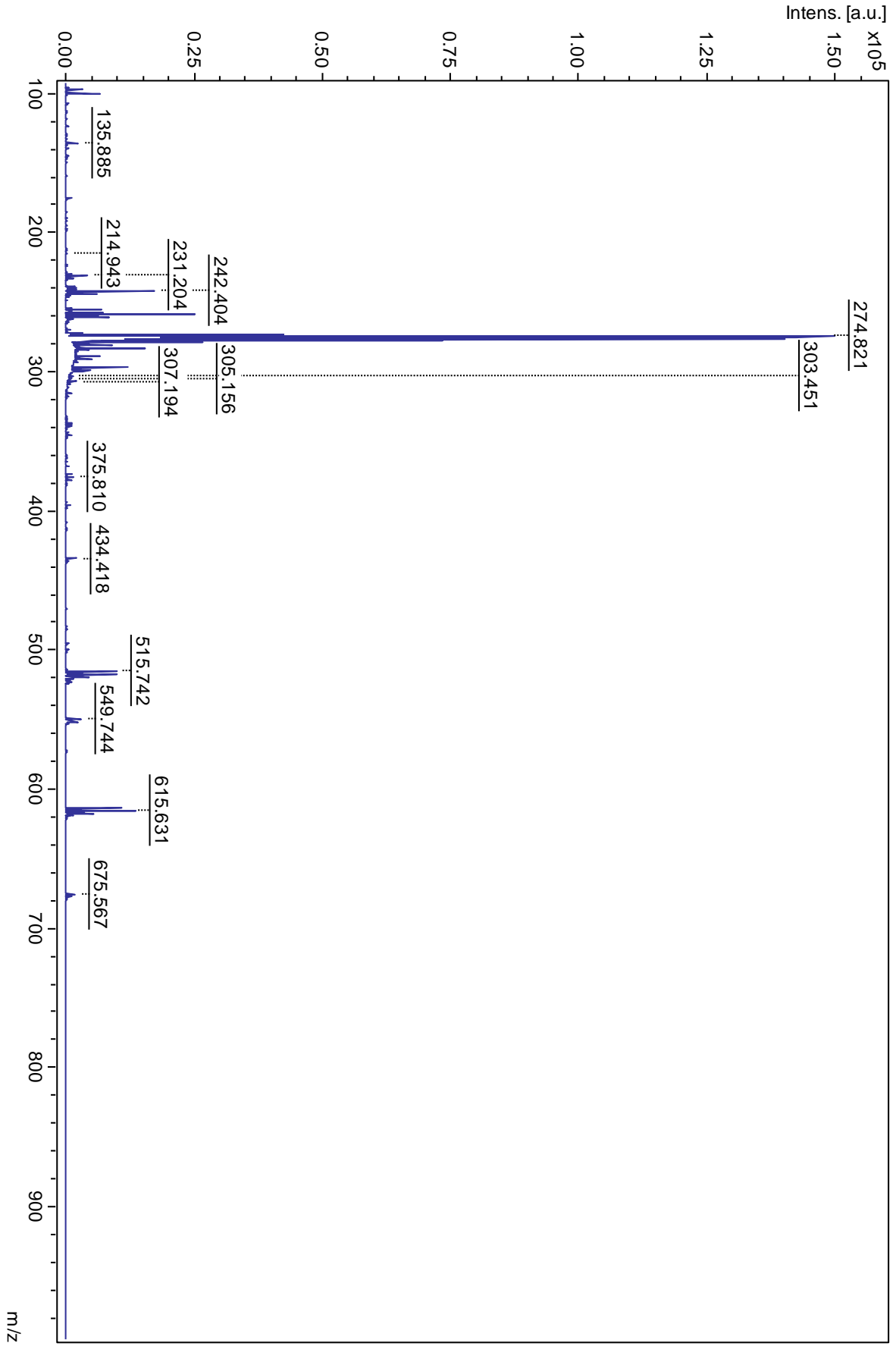


Figura Suplementar A11 - Espectro de Massas por ESI do composto ACW-02B

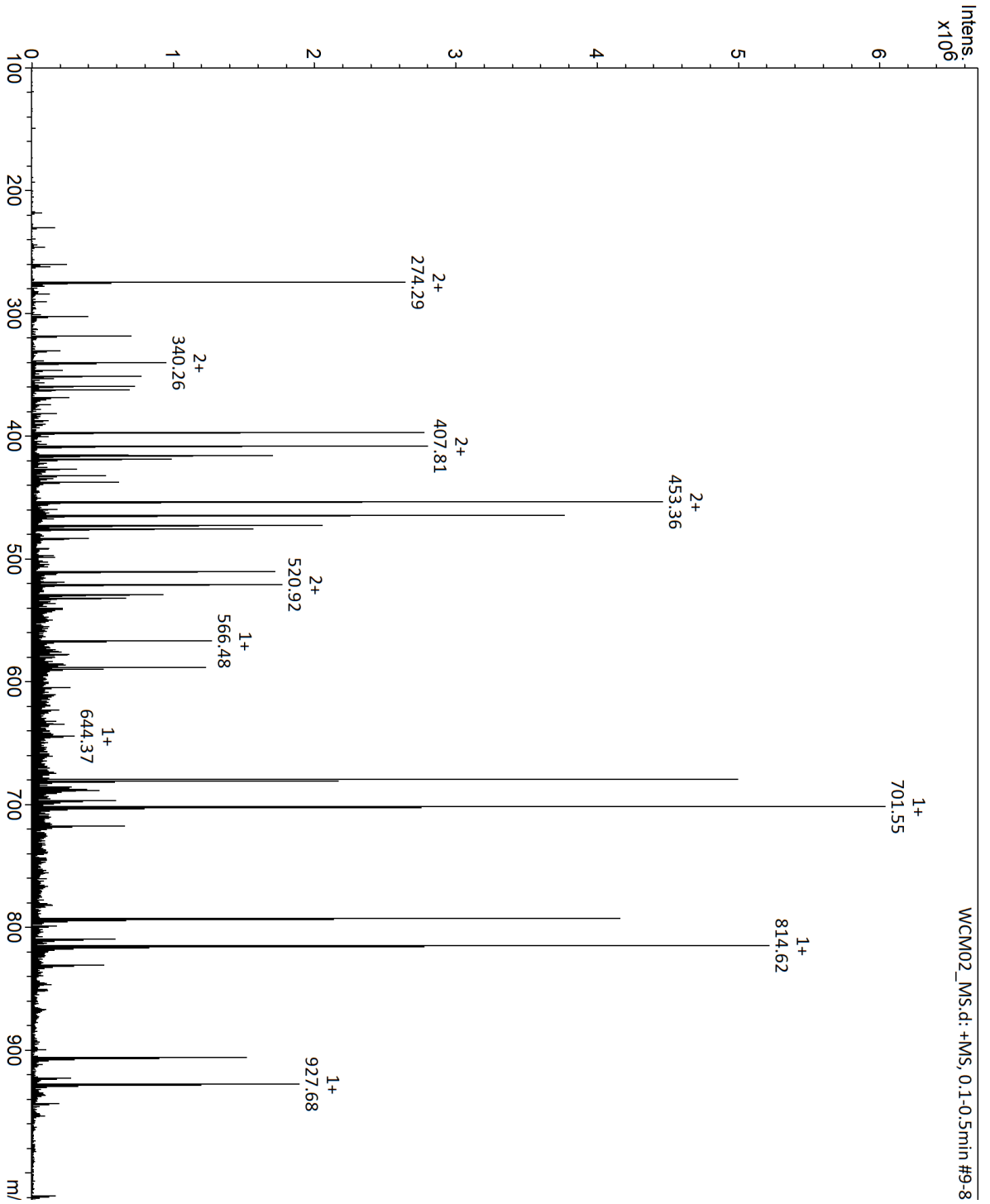


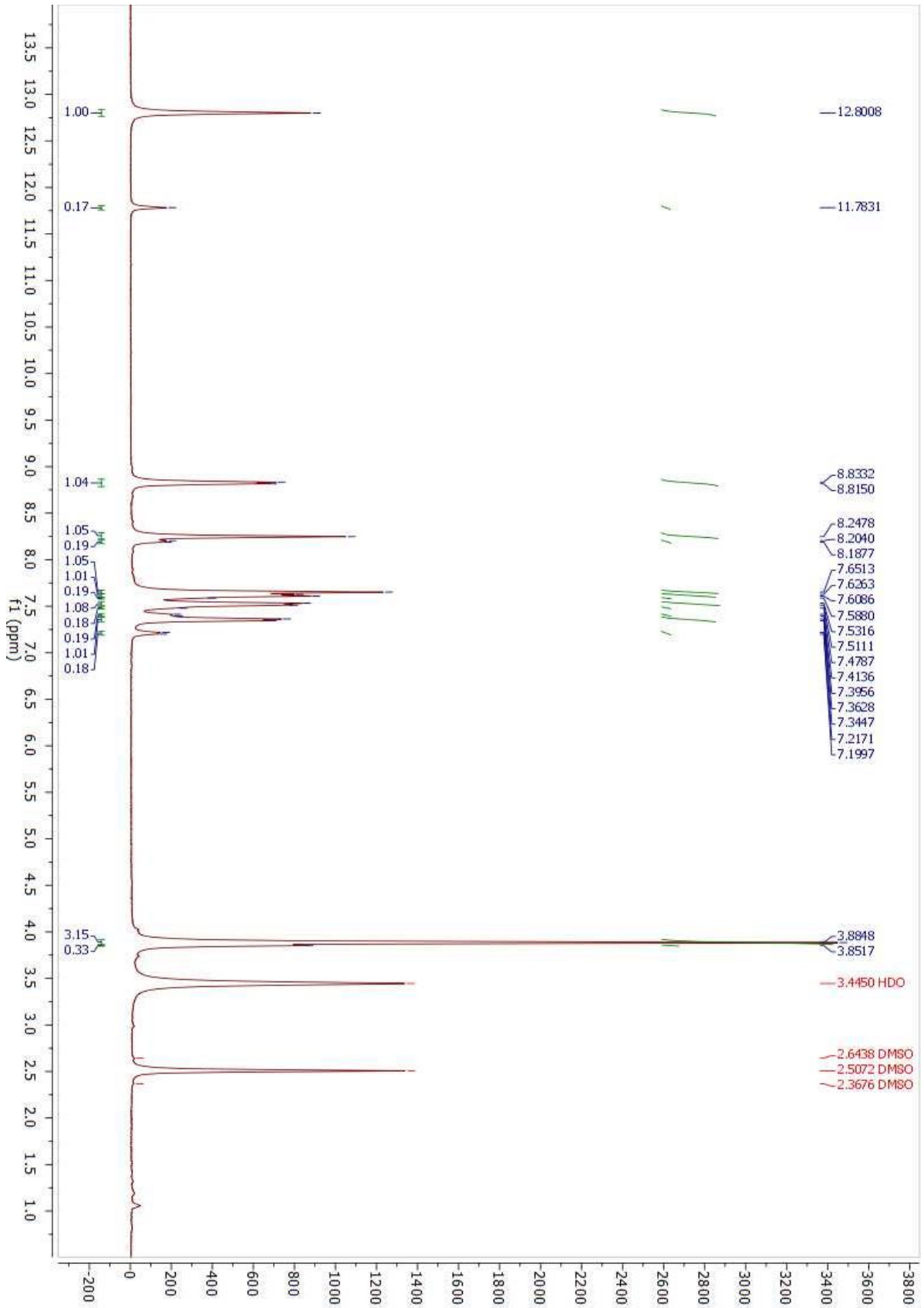
Figura Suplementar A12 - RMN de ^1H do composto ACW-04B

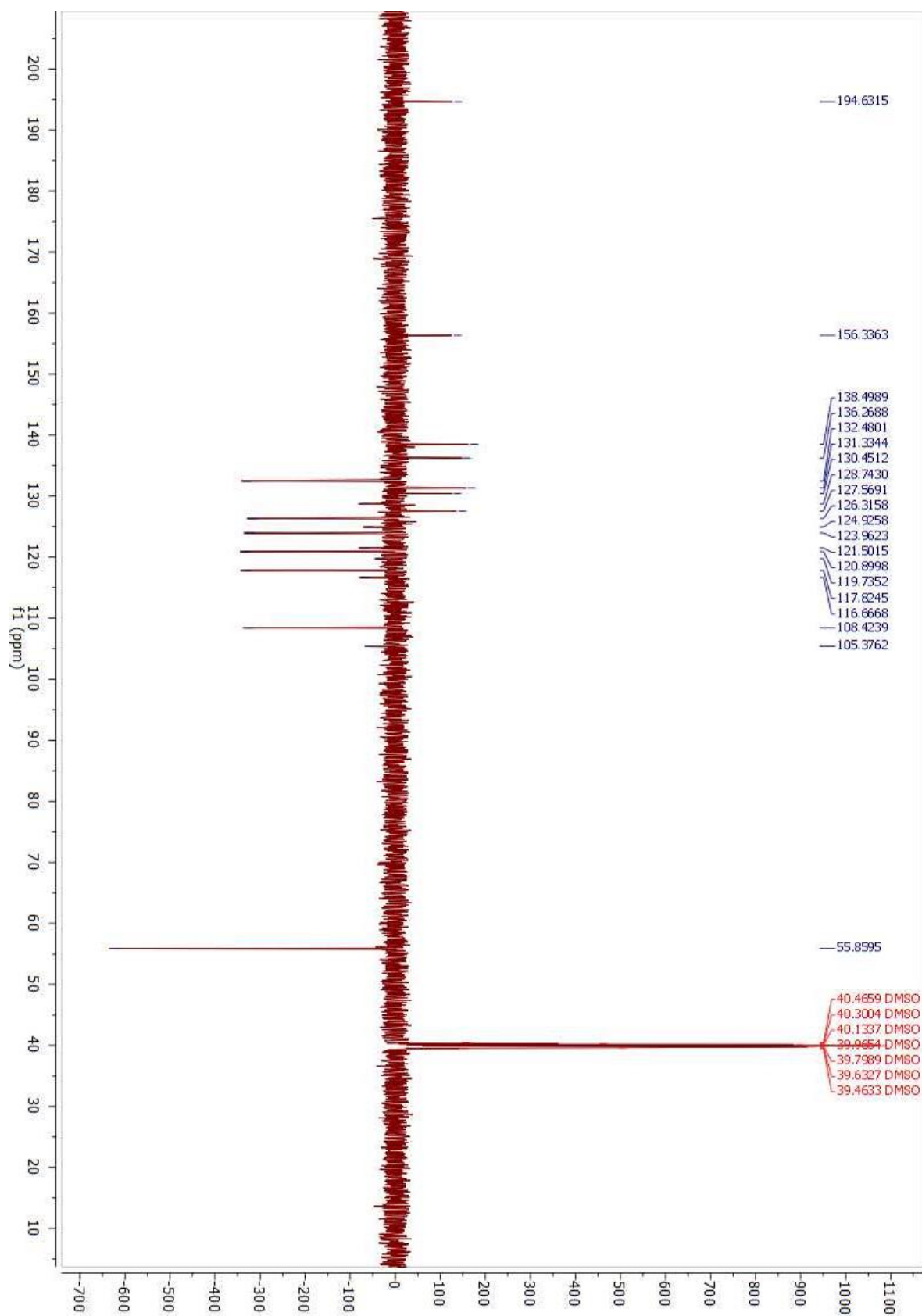
Figura Suplementar A13 - RMN de ^{13}C do composto ACW-04B

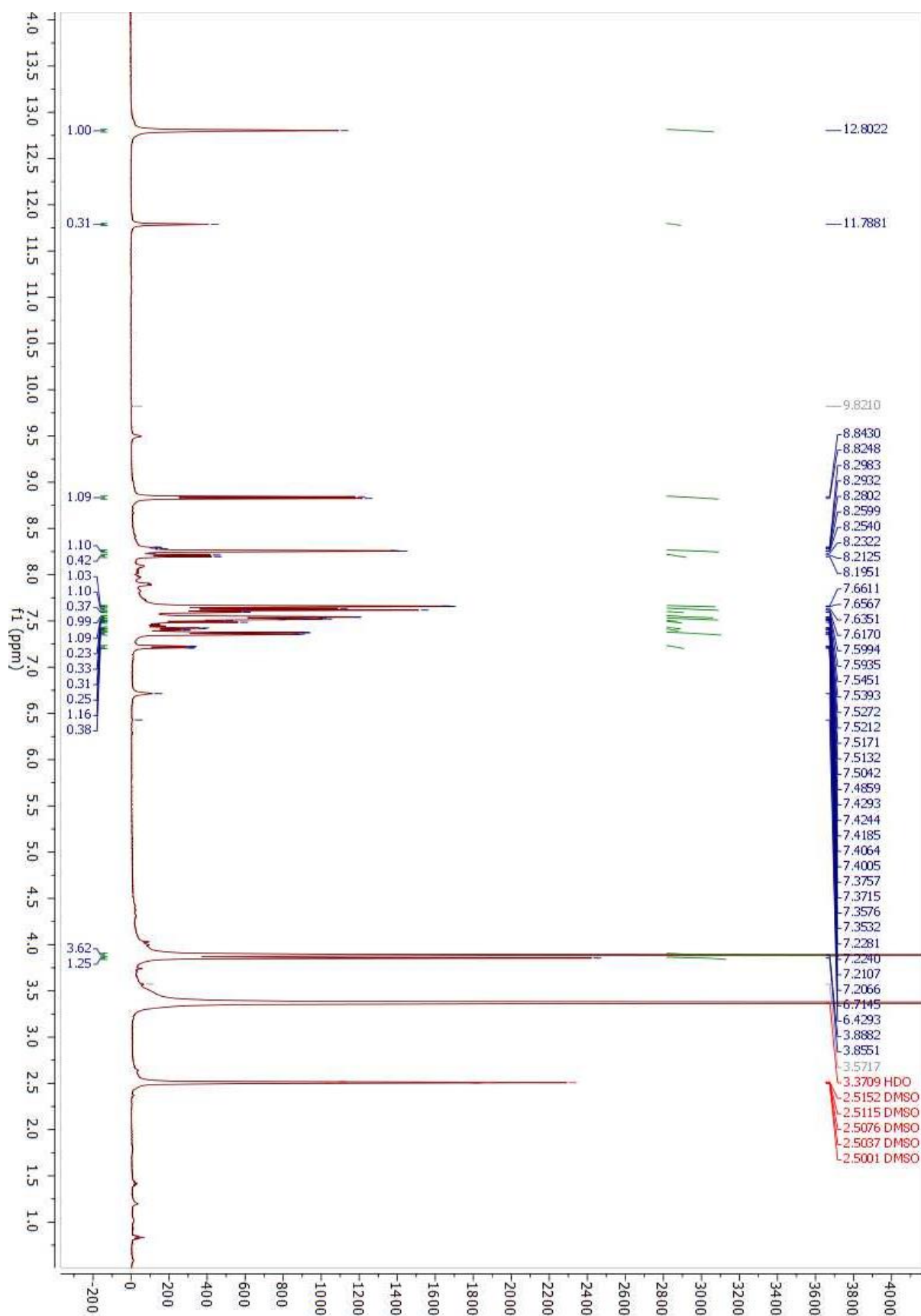
Figura Suplementar A14 - RMN de ^1H do composto ACW-06B

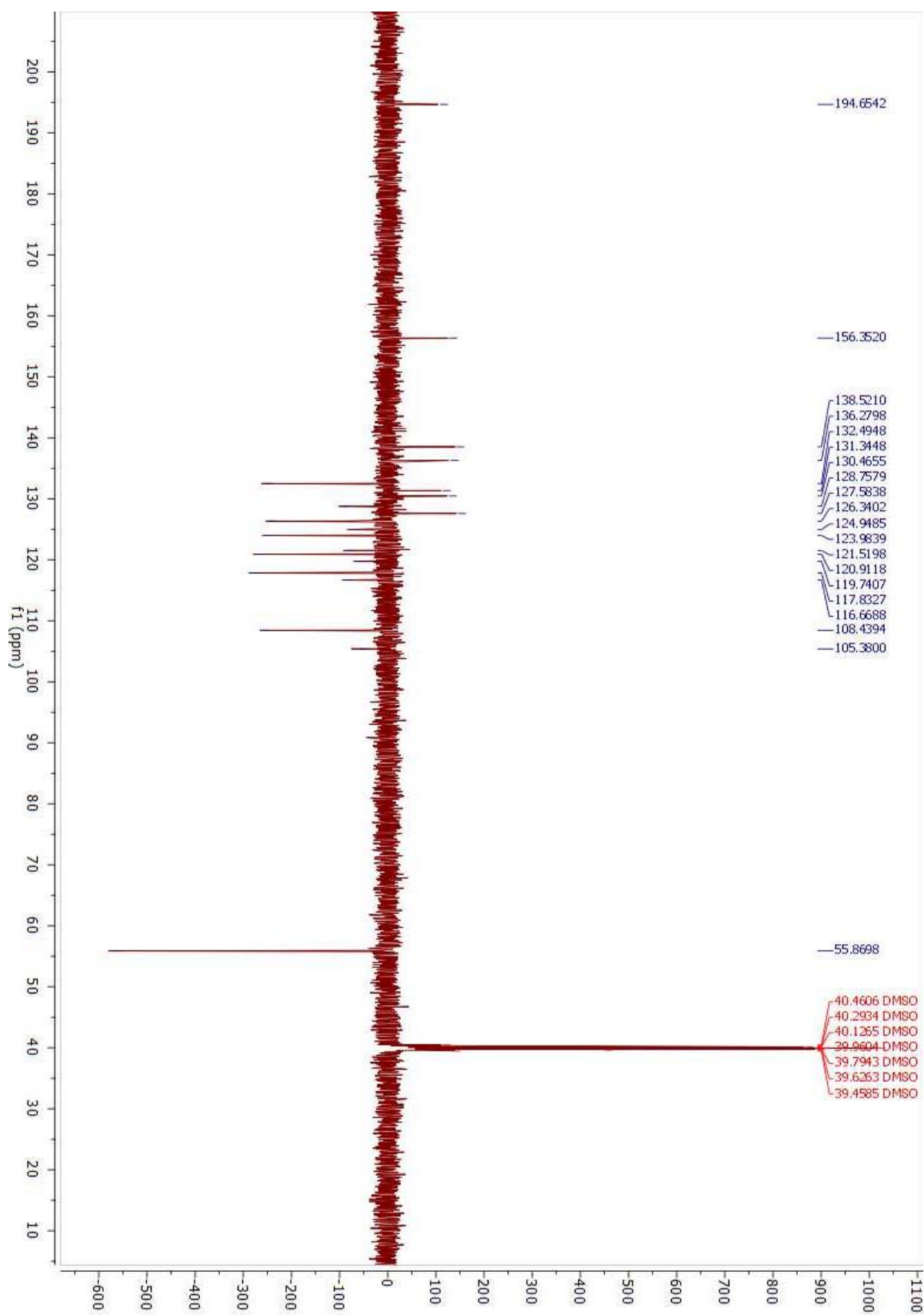
Figura Suplementar A15 - RMN de ^{13}C do composto ACW-06B

Figura Suplementar B1 - Tabela ANOVA

ANOVA; Var.:DV_1; R-sqr=,56667; Adj.,30667 (Design) 3 factors at two levels; MS Pure Error=2,88 DV: DV_1					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)SOLV		1	629,4641	218,5639	0,042996
(2)TEMP	563,122	1	563,1221	195,5285	0,045450
(3)CAT	666,306	1	666,3059	231,3562	0,041794
Lack of Fit	1733,979	4	433,4947	150,5190	0,061047
Pure Error	2,880	1	2,8800		
Total SS	4008,155	8			

Figura Suplementar B2 - Estimativas dos Efeitos

Effect Estimates; Var.:DV_1; R-sqr=,56667; Adj.,30667 (Design) 3 factors at two levels; MS Pure Error=2,88 DV: DV_1										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	47,0752	0,574456	81,9474	0,007768	39,7760	54,37437	47,07521	0,574456	39,7760	54,37437
(1)SOLV	-16,9854	1,148913	-14,7839	0,042996	-31,5837	-2,38710	-8,49271	0,574456	-15,7919	-1,19355
(2)TEMP	-16,0654	1,148913	-13,9832	0,045450	-30,6637	-1,46710	-8,03271	0,574456	-15,3319	-0,73355
(3)CAT	17,4754	1,148913	15,2104	0,041794	2,8771	32,07373	8,73771	0,574456	1,4385	16,03687

Figura Suplementar B3 - Ceficiente de Regressão

Regr. Coefficients; Var.:DV_1; R-sqr=,56667; Adj.,30667 (Design) 3 factors at two levels; MS Pure Error=2,88 DV: DV_1						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(1)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	47,07521	0,574456	81,9474	0,007768	39,7760	54,37437
(1)SOLV	-8,49271	0,574456	-14,7839	0,042996	-15,7919	-1,19355
(2)TEMP	-8,03271	0,574456	-13,9832	0,045450	-15,3319	-0,73355
(3)CAT	8,73771	0,574456	15,2104	0,041794	1,4385	16,03687

Figura Suplementar C1 - Docking molecular do ACW-01A com TopoII α /DNA

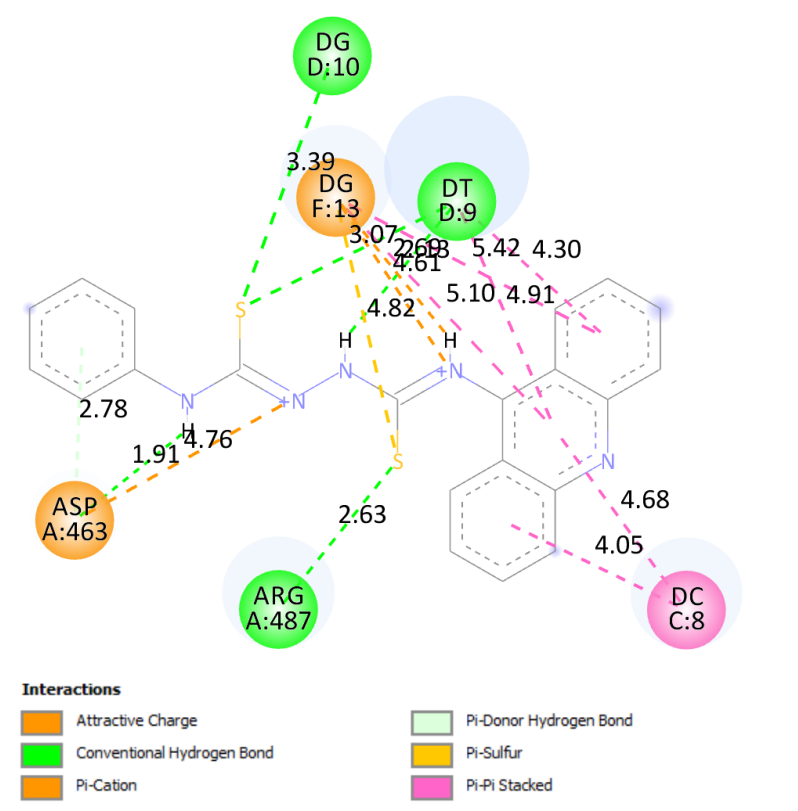


Figura Suplementar C2 - Docking molecular do ACW-02A com TopoII α /DNA

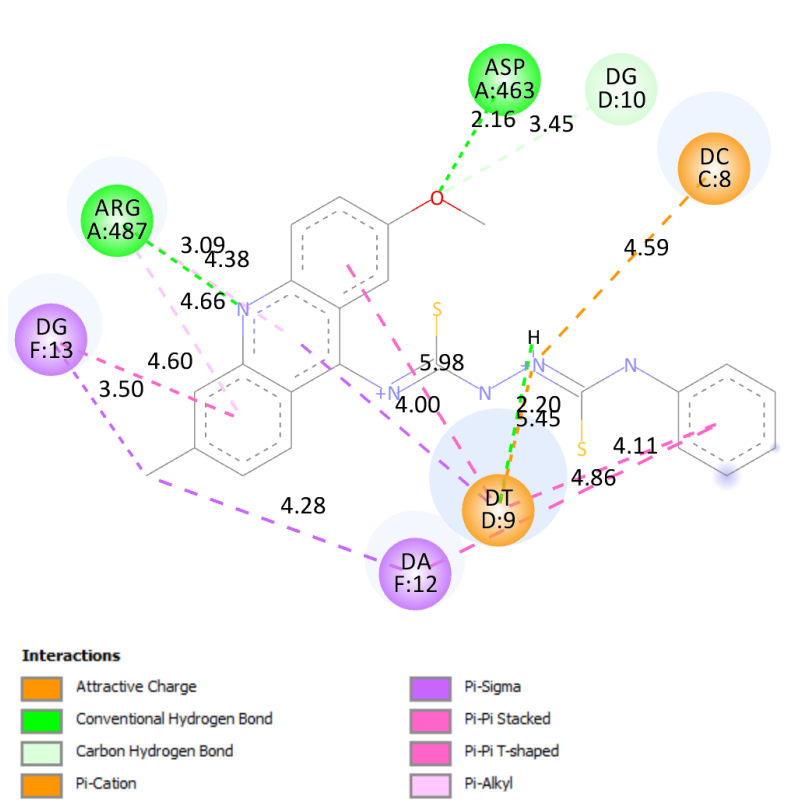


Figura Suplementar C3 - Docking molecular do ACW-03A com TopoII α /DNA

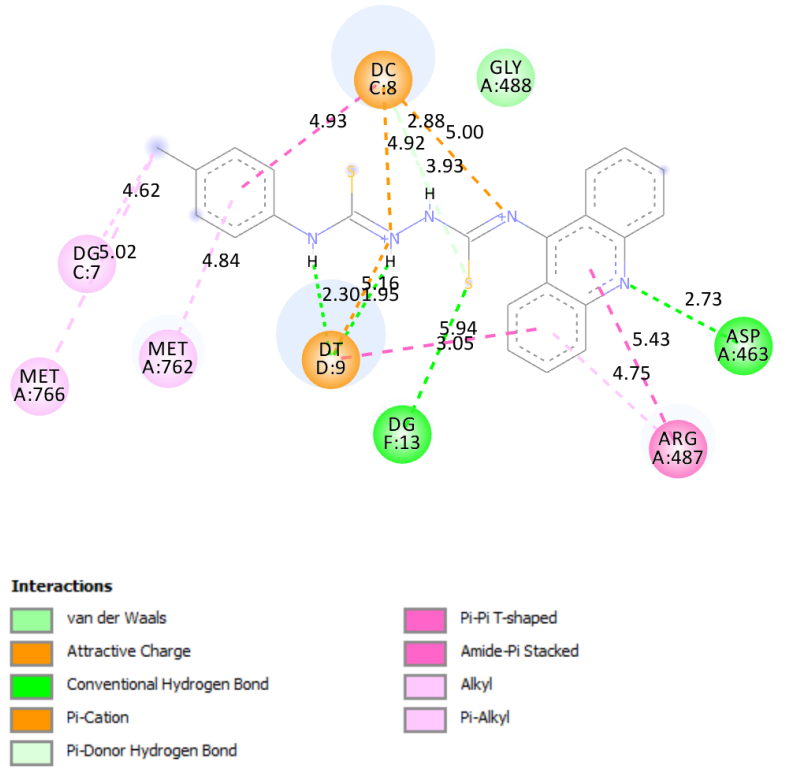


Figura Suplementar C4 - Docking molecular do ACW-04A com TopoII α /DNA

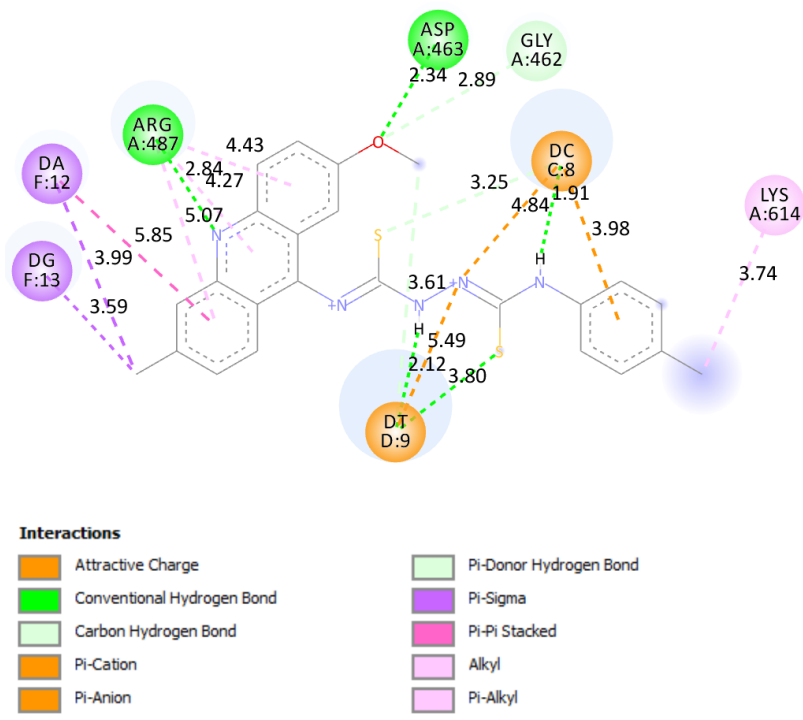


Figura Suplementar C5 - Docking molecular do ACW-05A com TopoII α /DNA

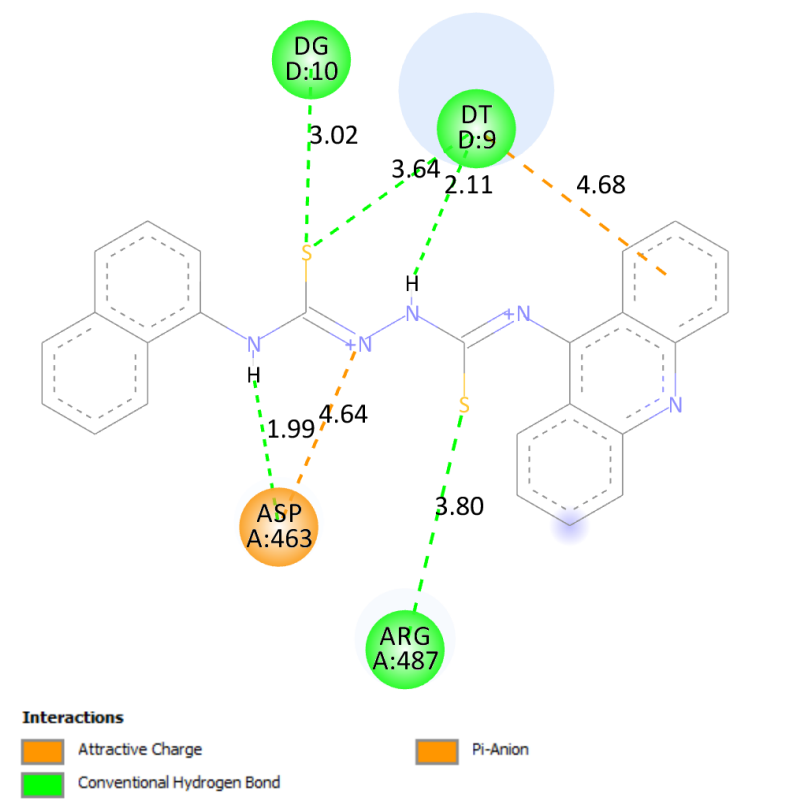


Figura Suplementar C6 - Docking molecular do ACW-01A com TopoII α /DNA

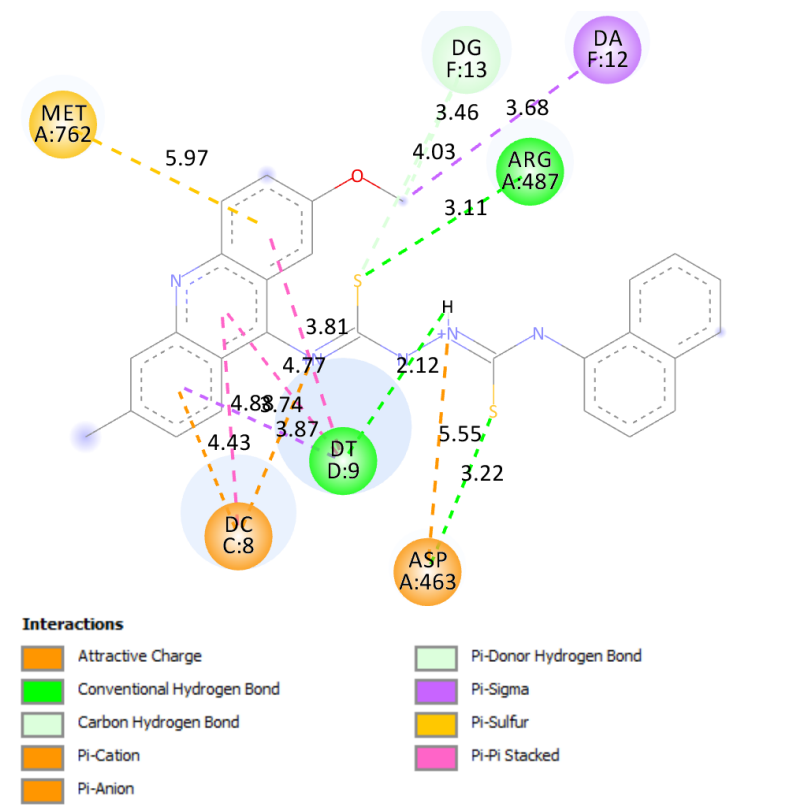


Figura Suplementar C7 - Docking molecular do ACW-01A com B-DNA

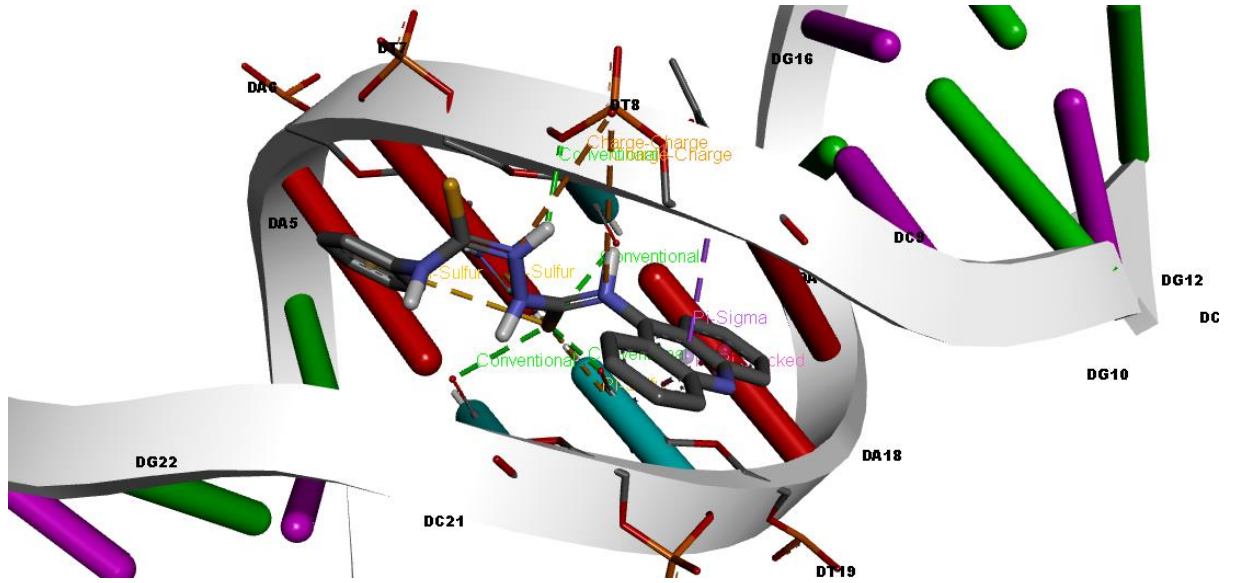


Figura Suplementar C8 - Docking molecular do ACW-02A com B-DNA

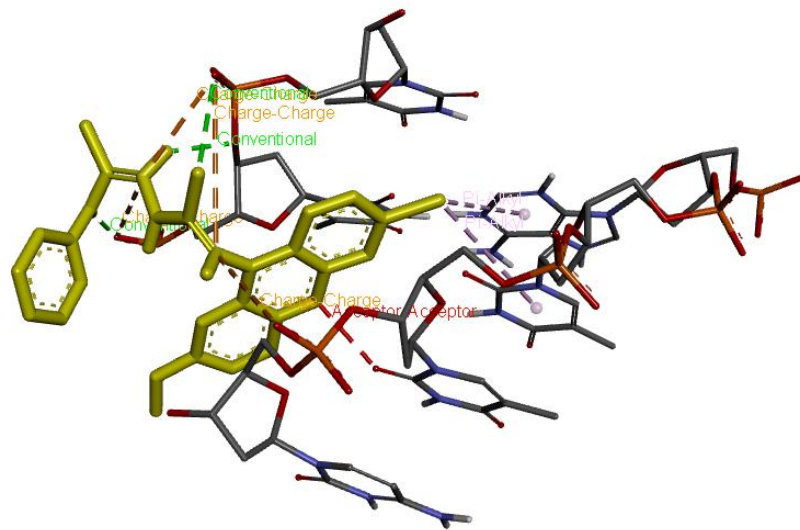


Figura Suplementar C9 - Docking molecular do ACW-03A com B-DNA

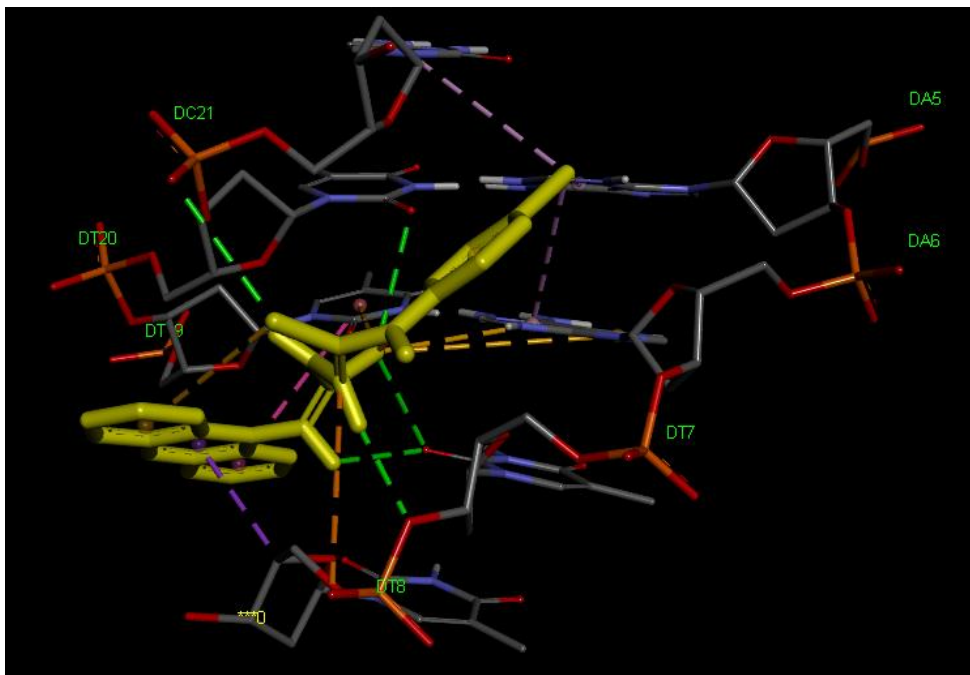


Figura Suplementar C10 - Docking molecular do ACW-04A com B-DNA

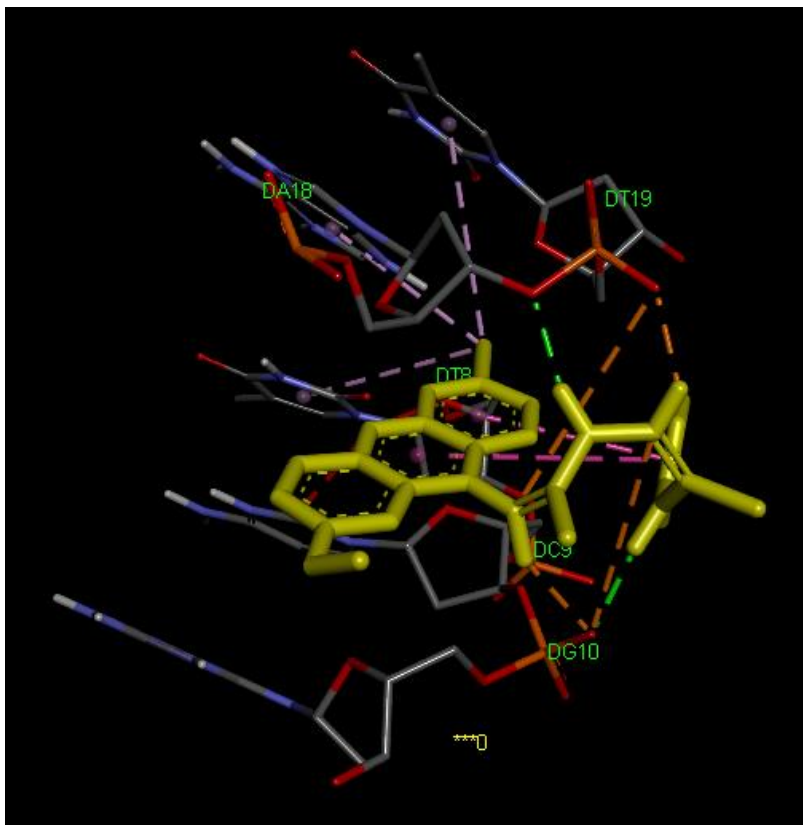


Figura Suplementar C11 - Docking molecular do ACW-05A com B-DNA

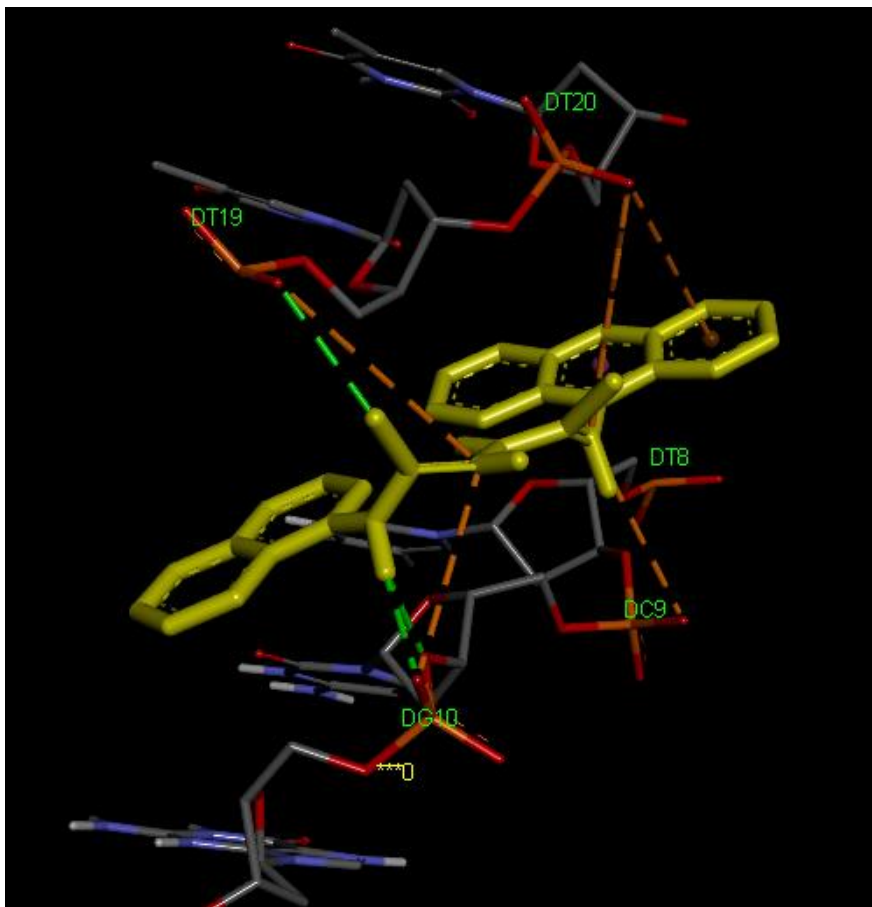


Figura Suplementar C12 - Docking molecular do ACW-06A com B-DNA

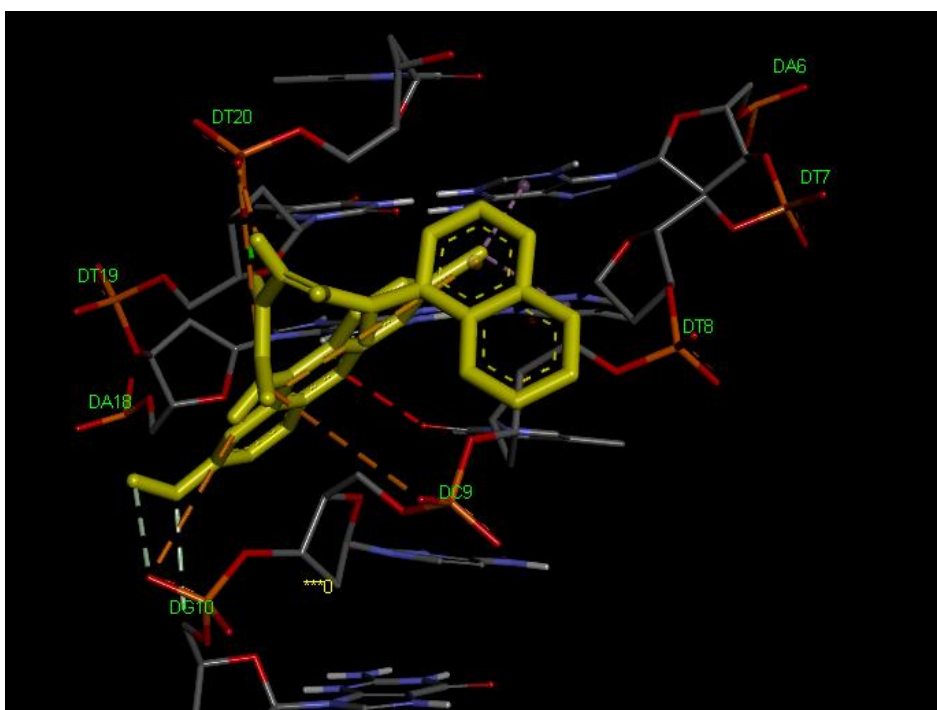


Figura Suplementar C13 - Docking molecular do ACW-01B com TopoII α /DNA

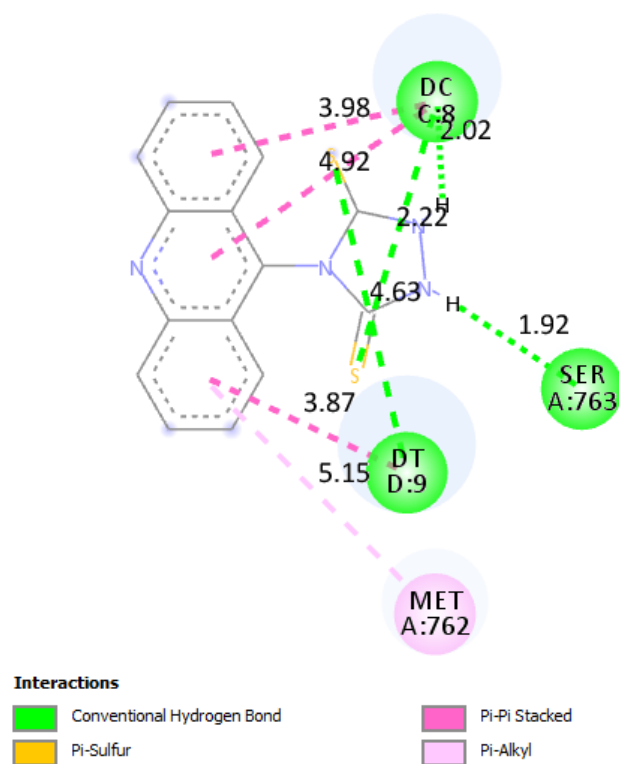


Figura Suplementar C14 - Docking molecular do ACW-02B com TopoII α /DNA

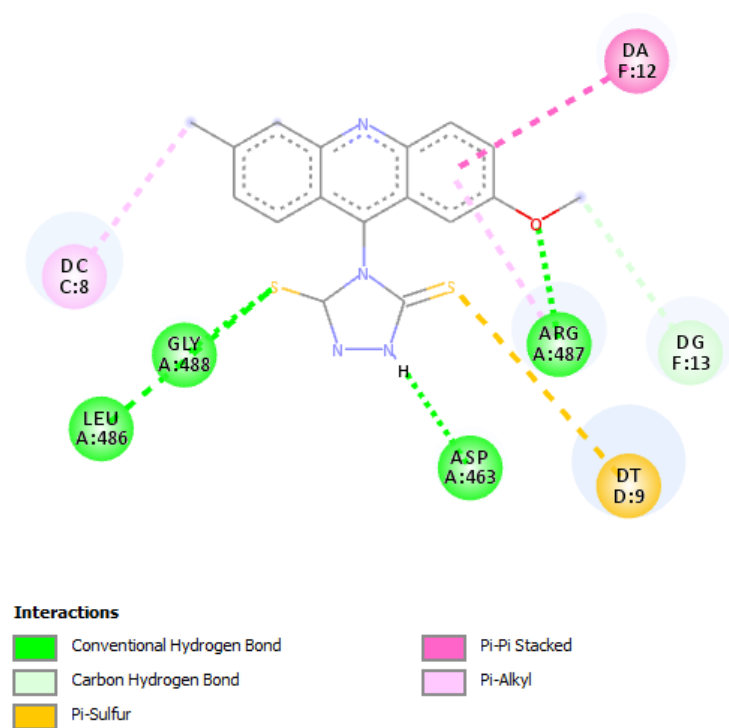


Figura Suplementar C15 - Docking molecular do Amsacrina com TopoII α /DNA

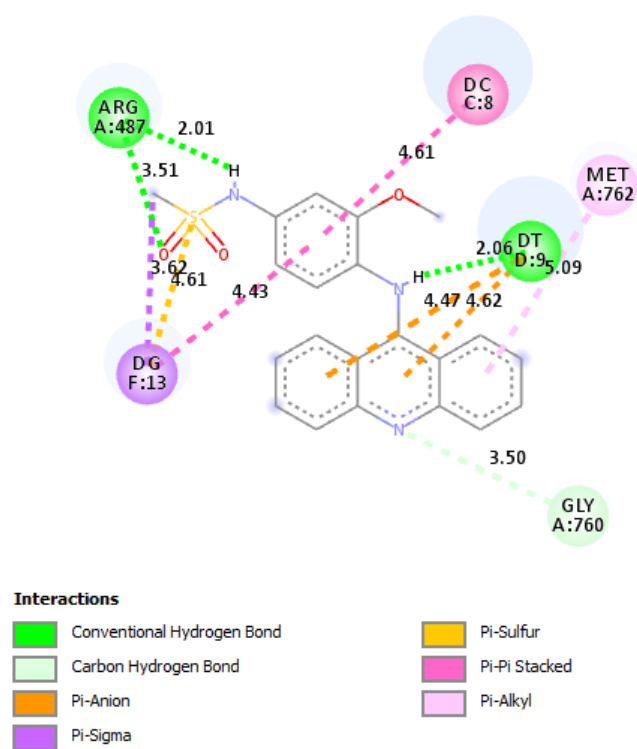


Figura Suplementar C16 - Docking molecular do ACW-01B com DNA

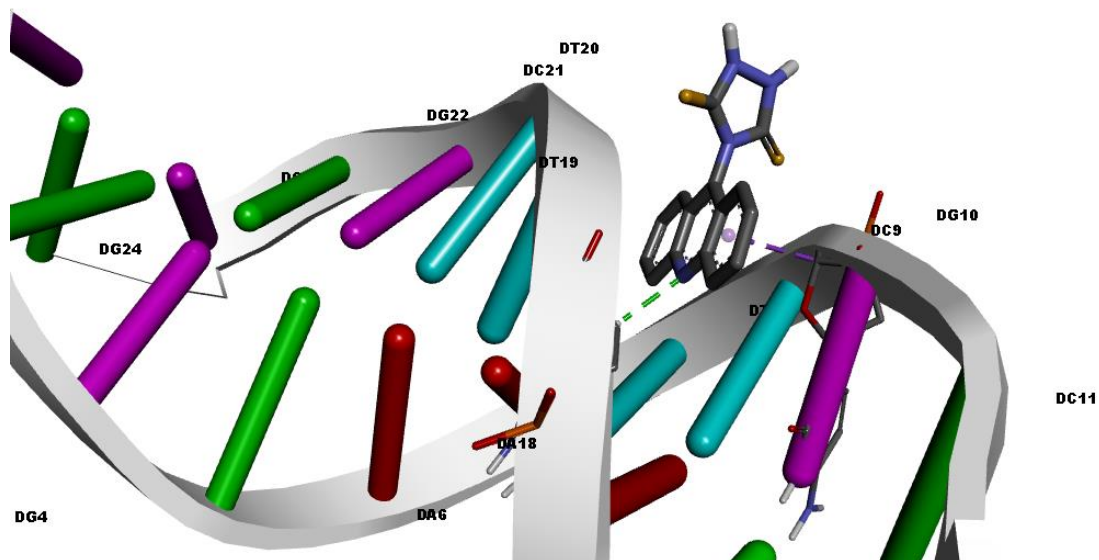


Figura Suplementar C17 - Docking molecular do ACW-02B com TopoII α /DNA

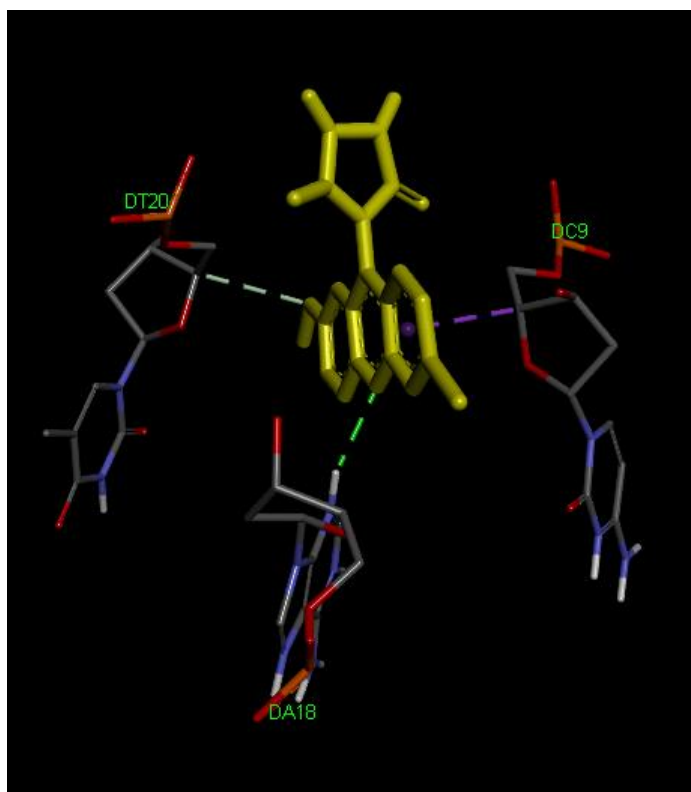


Figura Suplementar C18 - Docking molecular do ACW-01B com BSA

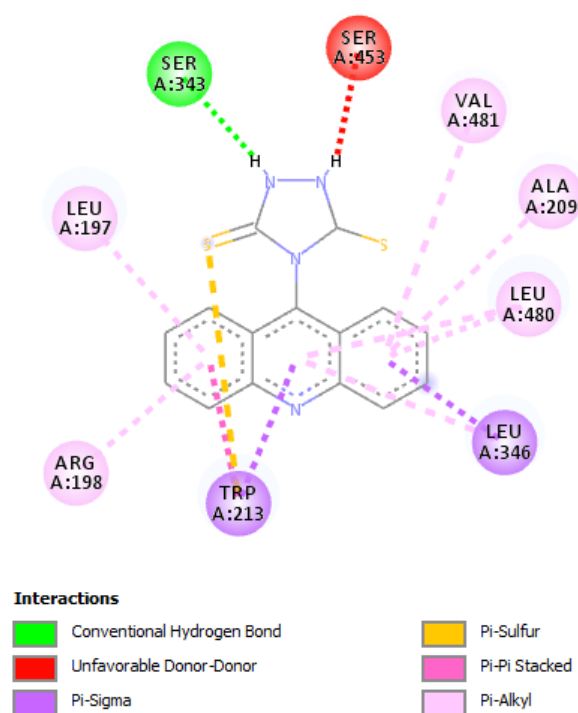


Figura Suplementar C19 - Docking molecular do ACW-02B com BSA

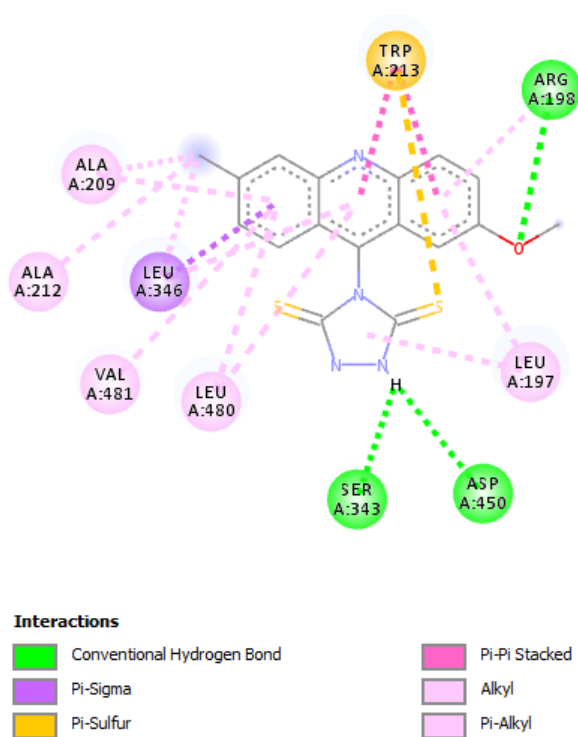


Figura Suplementar C20 - Docking molecular do ACW-01B com Bcl-2

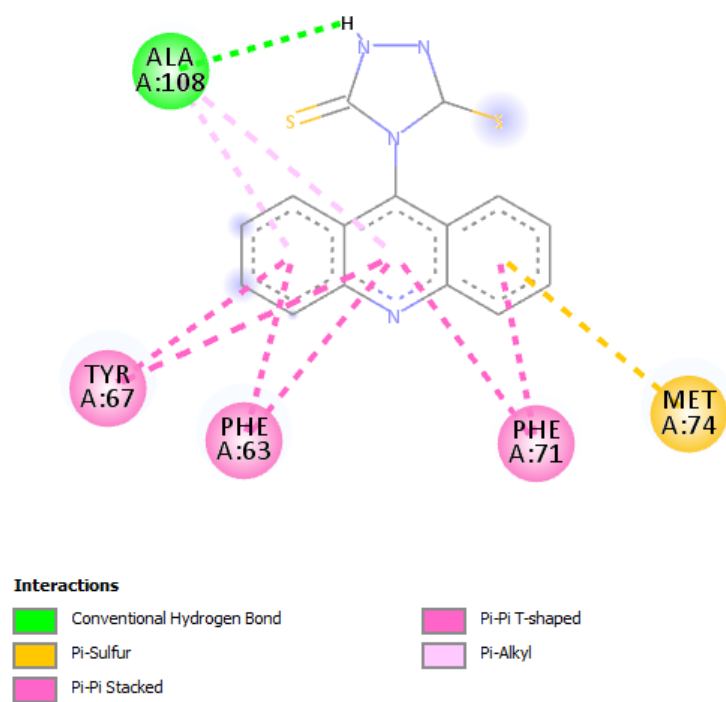


Figura Suplementar C21 - Docking molecular do ACW-02B com Bcl-2

