



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JOILLY NILCE SANTANA GOMES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACODINÂMICO E FARMACOCINÉTICO DE
DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTITUMORAL**

CAMPINA GRANDE

2022

JOILLY NILCE SANTANA GOMES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACODINÂMICO E FARMACOCINÉTICO DE
DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTITUMORAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

Coorientador: Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa.

CAMPINA GRANDE

2022

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.

G633a Gomes, Joilly Nilce Santana.
Avaliação do perfil farmacodinâmico e farmacocinético de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com potencial ação antitumoral [manuscrito] / Joilly Nilce Santana Gomes. - 2022.
131 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura , Departamento de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa , UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte"
1. Docking molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Derivados acridínicos. 4. Atividade antitumoral. I. Título
21. ed. CDD 615.7

JOILLY NILCE SANTANA GOMES

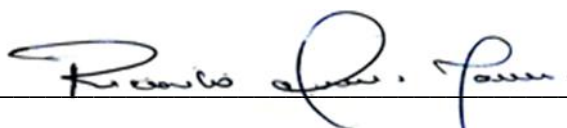
**AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACODINÂMICO E FARMACOCINÉTICO DE
DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTITUMORAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 29/11/2022

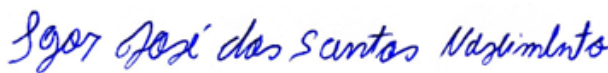
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa (Coorientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEPB)



Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

A Deus e a toda minha família, especialmente a minha mãe, Maria Aparecida, a meu pai, Joilson Gomes, e a minha irmã, Jamilly Santana, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo seu amor incessante, pelo seu cuidado incomensurável, por sua benevolência e por sua infinita misericórdia que me conduz. Como já dizia Santa Teresinha: “O bom Deus não poderia inspirar sonhos irrealizáveis”.

A Nossa Senhora, que incansavelmente intercede por mim a Ele, além de me ensinar muito através da sua vida sobre doação e entrega.

Aos meus pais, por todo esforço, incentivo, dedicação, cuidado e amor. Por terem sempre me apoiado nas minhas decisões. Sem hesitar, essa conquista é mais deles do que minha.

À minha irmã, por toda compreensão, amizade e carinho, sendo prova do amor de Deus por mim.

A toda minha família, em especial a minha avó e madrinha, Maria das Neves, e meu namorado que são grandes presentes na minha vida e, sempre acreditaram na minha capacidade quando muitas vezes me subestimei.

Ao Professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura, pela orientação, confiança, sensibilidade, paciência, compreensão, inspiração e, sobretudo por todos os ensinamentos, de forma especial, por incentivar a capacidade de conexão dos conhecimentos.

Aos amigos e colegas da turma do mestrado em Ciências Farmacêuticas 2020.1 e do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos – UEPB, por todo suporte, auxílio, incentivo, e por tantos conhecimentos a mim transmitidos.

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo incentivo a pesquisa.

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP), ao Centro de Computação de Alto Desempenho (NPAD) da UFRN e ao Instituto Metrópole Digital (IMD), pela disponibilização de recursos computacionais nos ensaios de dinâmica molecular.

Por fim, a todos os colaboradores que contribuíram de forma direta ou indiretamente para que esse sonho se tornasse realidade, especialmente aos professores Dr. Euzébio Guimarães, Dr. Igor José dos Santos e a Dra. Sinara Mônica. E a Jéssika Viana que foi um anjo nesse percurso, minha eterna gratidão.

"É necessário estudar, mas não é o suficiente. Que se pode conseguir de quem se esfalfa para alimentar o seu egoísmo ou de quem não persegue outro objetivo senão o de garantir a tranquilidade para daqui alguns anos? É preciso estudar para ganhar o mundo e conquistá-lo para Deus. Então elevaremos o nível do nosso esforço procurando que o trabalho realizado se converta em encontro com o Senhor e sirva de base para os outros, aos que seguirão nosso caminho. Deste modo, o estudo será oração."

São Josemaría Escrivá

RESUMO

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública no mundo. Embora existam diversos antineoplásicos utilizados na clínica, eles apresentam limitações de seletividade e, conseqüentemente toxicidade. Atualmente, a química computacional é imprescindível na pesquisa e no planejamento racional de fármacos, pois, reduzem os custos desnecessários e o tempo de pesquisa. Os derivados acridínicos são agentes quimioterápicos importantes que possuem um núcleo privilegiado. Através dessa premissa, essa pesquisa tem por objetivo avaliar possíveis mecanismos de ação de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos através de estudos *in silico* e *in vitro*, avaliando também parâmetros farmacocinéticos de ADMET. Os estudos *in silico* foram realizados nos alvos de DNA, Topoisomerase II α /DNA e albumina bovina utilizando plataformas como: AutoDock Tools, Gromacs, Discovery Studio, SwissADME e pK-CSM. Os estudos *in vitro* no ssDNA e na albumina bovina se deram através de espectroscopia de absorção em UV/visível e emissão de fluorescência. Já para testar a capacidade de inibição da topoisomerase II α , os compostos foram avaliados no ensaio de relaxamento de DNA plasmidial. Nos estudos *in vitro* para o ssDNA, ocorreu um hiperromismo de 50% para o GLDL 06 e 33% para o GLDL 07, concordando com os dados *in silico*, nos quais, o GLDL 06 apresentou melhor ΔG e K_i , além de ser mais estável no alvo do que o GLDL 07. Além disso, ambos os compostos obtiveram valores típicos de intercaladores de DNA. Para os ensaios de inibição da topoisomerase/DNA, o composto GLDL 07 exibiu inibição de topoisomerase em 92% e o GLDL 06 inibiu a enzima em 54%, esses resultados corroboram com os dados obtidos computacionalmente. Nos estudos *in vitro* para a albumina bovina, o composto GLDL 07 apresentou discretamente uma maior interação comparando com o GLDL 06, esses resultados são reproduzidos no *docking* e na dinâmica molecular. E por fim, ao analisar os resultados farmacocinéticos *in silico* concluiu-se que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos violaram no máximo uma das regras de Lipinski, porém, não violaram nenhuma regra de Veber e são compostos *Drug Like*. Além disso, esses compostos apresentam uma maior dose tolerada no organismo humano do que a amsacrina e o etoposídeo. Logo, através dos resultados apresentados durante o trabalho pode-se concluir que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 são moléculas promissoras para o tratamento de neoplasias e, desse modo, é imprescindível mais estudos e aprimoramento dessas moléculas.

Palavras-chave: *Docking* molecular; dinâmica molecular; *In vitro*; farmacocinética; derivados acridínicos; atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is considered the main public health issue worldwide. Although there are several antineoplastic agents used clinically, they show selectivity limitations and, consequently, high toxicity. Currently, computational chemistry is essential in research and rational drug design, as it reduces unnecessary costs and research time. Acridine derivatives are important chemotherapeutic agents that contain a privileged nucleus. Based on this premise, this research aims to evaluate possible mechanisms of action of thiosemicarbazone-acridine derivatives through *in silico* and *in vitro* studies, along with the evaluation of ADMET pharmacokinetic parameters. *In silico* studies were performed on DNA targets, Topoisomerase II α /DNA, and bovine albumin using platforms such as AutoDock Tools, Gromacs, Discovery Studio, SwissADME, and pK-CSM. The *in vitro* studies on ssDNA and bovine albumin were performed using UV/visible absorption and fluorescence emission spectroscopy. To determine the ability to inhibit topoisomerase II α , the compounds were evaluated in the plasmid DNA relaxation assay. *In vitro* studies for ssDNA revealed a hyperchromism of 50% for GLDL 06 and 33% for GLDL 07, in agreement with the *in silico* data, in which GLDL 06 presented better ΔG and K_i , in addition to being more stable on the target than GLDL 07. Furthermore, both compounds obtained typical DNA intercalator values. For topoisomerase/DNA inhibition assays, compound GLDL 07 exhibited topoisomerase inhibition of 92% and GLDL 06 inhibited the enzyme by 54%, these results corroborate the data obtained computationally. During *in vitro* studies with bovine albumin, the compound GLDL 07 showed a slightly greater interaction compared to GLDL 06, these results are reproduced in docking and molecular dynamics. Finally, when analyzing the *in silico* pharmacokinetic results, it was concluded that the thiosemicarbazone-acridine derivatives violated at most one of Lipinski's rules. However, they did not violate any of Veber's rules and are Drug Like compounds. In addition, these compounds have a higher tolerated dose in the human body than amsacrine and etoposide. Therefore, through the obtained results, it can be concluded that the compounds GLDL 06 and GLDL 07 are promising molecules for the treatment of neoplasms and, therefore, further studies and improvement of these molecules are essential.

Keywords: Molecular docking; molecular dynamics; *In vitro*; pharmacokinetics; acridine derivatives; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proliferação anormal de células.....	17
Figura 2 – Estrutura do DNA.....	18
Figura 3 – Indução de clivagem transitória na cadeia de DNA.....	19
Figura 4 – Estrutura cristalográfica das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano	22
Figura 5 – Núcleo acridínico e amsacrina.....	27
Figura 6 – Semelhanças e diferenças da amsacrina com o GLDL 06 e GLDL 07....	30
Figura 7 – Derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e controles positivos.....	36
Figura 8 – Interações do <i>docking</i> molecular do PDB e do redocking.....	40
Figura 9 – Sobreposição do ligante co-cristalizado com os compostos analisados no mesmo <i>grid box</i>	40
Figura 10 – Sítio de ligação do DNA (PDB ID 1BNA/1G3X) com os compostos estudados.....	43
Figura 11 – Imagens em 2D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)	46
Figura 12 – Imagens em 2D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)	47
Figura 13 – Imagens em 3D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1BNA).....	50
Figura 14 – Ligantes sobrepostos no alvo PDB ID 5GWK.....	54
Figura 15 – Imagens em 2D das interações dos compostos no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK).....	56
Figura 16 – Ligantes sobrepostos no alvo PDB ID 6QS9.....	59
Figura 17 – Imagens em 2D das interações dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)	61
Figura 18 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para o DNA em diferentes sistemas.....	64
Figura 19 – RMSF da simulação de dinâmica molecular do DNA em diferentes sistemas.....	65
Figura 20 – RMSD da simulação de dinâmica molecular do ligante em diferentes sistemas.....	67
Figura 21 – Ligações de hidrogênio existentes entre os ligantes e o DNA em diferentes sistemas.....	67
Figura 22 – Comportamento dos compostos no sítio de ligação (PDB ID 1G3X). A) GLDL 06. B) GLDL 07. C) amsacrina. D) etoposídeo E) ligante co-cristalizado.....	68
Figura 23 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para os complexos estudados. A) RMSD da topoisomerase em diferentes sistemas. B) RMSD do DNA em diferentes sistemas.....	71
Figura 24 – RMSF da simulação de dinâmica molecular para topoisomerase em diferentes sistemas.....	73

Figura 25 –	Figura 25 – RMSF da simulação de dinâmica molecular para o DNA em diferentes sistemas.....	73
Figura 26–	RMSD dos ligantes em diferentes sistemas.....	75
Figura 27–	Ligações de hidrogênio observadas durante 10 ns da simulação para os complexos estudados. A) Ligações de hidrogênio entre a topoisomerase e os ligantes em diferentes sistemas. B) Ligações de hidrogênio entre o DNA e os ligantes em diferentes sistemas.....	76
Figura 28 –	Comportamento dos compostos no sítio ativo (PDB ID 5GWK) após 10 ns de simulação. A) Sistema GLDL 06. B) Sistema GLDL 07. C) Sistema amsacrina. D) Sistema etoposídeo.....	77
Figura 29 –	RMSD da simulação de dinâmica molecular para a BSA em diferentes sistemas.....	80
Figura 30 –	RMSF da simulação de dinâmica molecular para a BSA em diferentes sistemas.....	81
Figura 31 –	RMSD dos ligantes em diferentes sistemas.....	82
Figura 32 –	Ligações de hidrogênio existentes entre os ligantes e a BSA em diferentes sistemas.....	83
Figura 33 –	Comportamento dos compostos no sítio ativo (PDB ID 6QS9). A) GLDL 06. B) GLDL 07. C) amsacrina. D) etoposídeo.....	84
Figura 34–	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 no DNA (PDB ID 1G3X).....	86
Figura 35–	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 no DNA (PDB ID 1G3X).....	86
Figura 36 –	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 na Topoisomerase/DNA (PDB ID 5GWK).....	87
Figura 37 –	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 na Topoisomerase/DNA (PDB ID 5GWK).....	88
Figura 38 –	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 na albumina bovina (PDB ID 6QS9).....	89
Figura 39 –	Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 na albumina bovina (PDB ID 6QS9).....	93
Figura 40 –	Espectro de absorção do GLDL 06 (1mM) em concentrações crescentes de DNA.....	93
Figura 41 –	Espectro de fluorescência comparando a extinção da fluorescência da BSA (10 µM) na presença de concentrações crescentes do GLDL 06.....	94
Figura 42 –	Espectro de fluorescência comparando a extinção da fluorescência da BSA (10 µM) na presença de concentrações crescentes do GLDL 06.....	96
Figura 43 –	Espectro de fluorescência comparando a extinção da fluorescência da BSA (10 µM) na presença de concentrações crescentes do GLDL 07.....	97
Figura 44 –	Ensaio de inibição da topoisomerase II α humana.....	99
Figura 45 –	Perfil de distribuição dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 e controles positivos (amsacrina e etoposídeo) pelo modelo <i>in silico</i> (Boiled-egg) via SwissADME.....	105
Figura 46 –	Predição dos sítios de metabolização do GLDL06 via <i>Xenosite</i>	108

Figura 47 – Predição dos sítios de metabolização do GLDL07 via <i>Xenosite</i>	109
Figura 48 – Predição dos sítios de metabolização da amsacrina via <i>Xenosite</i>	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de RMSD (<i>reference</i>) para os alvos analisados.....	39
Tabela 2 – Parâmetros do <i>grid box</i> para os respectivos alvos.....	41
Tabela 3 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (K_i) e eficiência de ligação (LE) dos compostos em DNA (PDB ID 1G3X) e DNA (PDB ID 1BNA)	42
Tabela 4 – Perfil de interação dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)	46
Tabela 5 – Perfil de interação dos compostos no DNA (PDB ID 1BNA)	50
Tabela 6 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (K_i) e eficiência de ligação (LE) dos compostos no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK)	52
Tabela 7 – Perfil de interação dos compostos no complexo Topo/DNA (PDB ID 5GWK)	55
Tabela 8 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (K_i) e eficiência de ligação (LE) dos compostos com albumina bovina (PDB ID 6QS9)	58
Tabela 9 – Perfil de interação dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)	60
Tabela 10 – Dados espectroscópicos de absorbância dos GLDLs na presença e ausência do ssDNA a 298K.....	92
Tabela 11 – Dados espectroscópicos de absorbância dos GLDLs na presença e ausência da BSA em 298K.....	95
Tabela 12 – Densidade óptica de inibição da Topoisomerase II α	99
Tabela 13 – Propriedades físico-químicas.....	100
Tabela 14 – Estudos preditivos farmacocinéticos de absorção pela plataforma SWISSADME.....	101
Tabela 15 – Dados espectroscópicos de absorbância dos GLDLs na presença e ausência da BSA em 298K.....	102
Tabela 16 – Estudos preditivos farmacocinéticos de distribuição pela plataforma pK-CSM	103
Tabela 17 – Estudos preditivos farmacocinéticos de metabolismo pela plataforma SWISSADME	106
Tabela 18 – Estudos preditivos farmacocinéticos de metabolismo pela plataforma pK-CSM.....	107
Tabela 19 – Estudos preditivos farmacocinéticos de excreção pela plataforma pK-CSM.....	110
Tabela 20 – Estudos preditivos farmacocinéticos de toxicidade pela plataforma pK-CSM.....	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Câncer	17
3.1.1	<i>DNA</i>	18
3.1.2	<i>Topoisomerase</i>	19
3.1.3	<i>Albumina do soro bovino</i>	21
3.2	<i>Resistência a múltiplas drogas</i>	23
3.3	Estudos computacionais	24
3.3.1	<i>Docking molecular</i>	24
3.3.2	<i>Dinâmica molecular</i>	24
3.3.3	<i>Estudos preditivos de farmacocinética</i>	25
3.4	Compostos acridínicos	26
4	METODOLOGIA	29
4.1	Delineamento da pesquisa	29
4.2	Estudo de <i>docking</i> molecular	33
4.2.1	<i>Obtenção e preparação dos alvos</i>	33
4.2.2	<i>Preparação dos ligantes</i>	33
4.2.3	<i>Estudos de docking molecular para validação (redocking)</i>	33
4.2.4	<i>Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes</i>	34
4.3	Estudo de dinâmica molecular	34
4.4	Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos	35
4.5	Análise da interação <i>in vitro</i> ao ssDNA pelos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos	36
4.6	Análise da interação <i>in vitro</i> a BSA pelos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos	37
4.7	Ensaio de inibição da Topoisomerase IIα humana	37
4.8	Estudo de ADMET <i>in silico</i>	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Validação da metodologia do <i>docking</i> molecular (redocking)	39

5.2	Estudo de <i>docking</i> molecular.....	41
5.2.1	<i>Interações dos compostos com DNA</i>	42
5.2.2	<i>Interações dos compostos com o complexo Topo/DNA</i>	52
5.2.3	<i>Interações dos compostos com albumina bovina</i>	58
5.3	Estudo de dinâmica molecular.....	63
5.3.1	<i>Dinâmica molecular no Ácido Desoxirribonucleico (DNA)</i>	64
5.3.2	<i>Dinâmica molecular no complexo Topoisomerase II α/ DNA</i>	70
5.3.3	<i>Dinâmica molecular na albumina sérica bovina</i>	79
5.4	Comparativo das análises de <i>docking</i> e dinâmica molecular.....	85
5.4.1	<i>Docking e dinâmica molecular no DNA</i>	85
5.4.2	<i>Docking e dinâmica molecular no complexo Topo/DNA</i>	87
5.4.3	<i>Docking e dinâmica molecular na BSA</i>	89
5.5	Análise da interação <i>in vitro</i> ao ssDNA.....	91
5.6	Análise da interação <i>in vitro</i> à BSA.....	95
5.7	Ensaio de inibição da Topoisomerase II α humana.....	98
5.8	Estudos preditivos farmacocinéticos (ADMET).....	100
5.8.1	<i>Propriedades físico-químicas</i>	100
5.8.2	<i>Estudos preditivos de absorção</i>	101
5.8.3	<i>Estudos preditivos de distribuição</i>	103
5.8.4	<i>Estudos preditivos de metabolismo</i>	106
5.8.5	<i>Estudos preditivos de excreção</i>	110
5.8.6	<i>Estudos preditivos de toxicidade</i>	111
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
	REFERÊNCIAS.....	114
	APÊNDICE A – Imagens 2D das interações do etoposídeo no DNA (PDB ID 1G3X).....	126
	APÊNDICE B – Imagens 2D das interações do etoposídeo no DNA (PDB ID 1G3X).....	127
	APÊNDICE C – Estrutura cristalográfica do DNA (PDB ID 1G3X) e resíduos interagindo com o ligante co-cristalizado.....	128
	APÊNDICE D – RMSD observado para o desvio completo de cada sistema estudado para DNA e ligantes	129
	APÊNDICE E – RMSD observado para o desvio completo de cada sistema estudado para topoisomerase, DNA e ligantes.....	130
	ANEXO A – Predição dos sítios de metabolização do Etoposídeo via <i>Xenosite</i>	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia caracterizada por uma alteração nos mecanismos que regem a proliferação e diferenciação celular. Esta doença pode ser causada por fatores intrínsecos (genes herdados) ou extrínsecos (exposição do corpo a produtos químicos, radiação, agentes infecciosos, entre outros) (AGI; OLIVEIRA; SILVA, 2022; AL-OMARY et al., 2012).

À medida que os países se modernizam e a população mundial continua envelhecendo, a morbimortalidade por câncer está aumentando, dentre eles, podemos destacar o câncer de pulmão, fígado, colorretal, estômago e mama que são as causas mais comuns de mortes por essa doença a cada ano (NAIR; SANDHU; SHARMA, 2018).

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as quatro principais causas de morte em indivíduos antes dos 70 anos de idade, sua incidência e mortalidade vêm aumentando no mundo, devido a vários fatores, entre eles, o envelhecimento, crescimento populacional e por fim, pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2019).

O INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) no ano de 2019, estimou para os anos de 2020-2022, aproximadamente 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de próstata e mama (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil).

Para o tratamento do câncer existem várias alternativas que são definidas após avaliação da gravidade da doença ou a condição do paciente. Essas alternativas podem ser escolhidas em conjunto ou isoladas, e entre elas podemos destacar: a intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e a terapia gênica. Sendo a quimioterapia um dos tratamentos mais utilizado devido à ampla disponibilidade de moléculas químicas. Todavia, na atualidade são poucos tipos de câncer tratados apenas com monoterapia, sendo a quimioterapia bem utilizada em associação, e por isso, é de suma importância o aprimoramento deste método, impulsionando a pesquisa e o desenvolvimento de novos quimioterápicos mais seletivos e menos tóxicos, em especial para tumores sólidos (GEYER et al., 2006; GOUVEIA, 2017; KLIGERMAN, 2000).

Embora existam diversos antineoplásicos, muitos deles já desenvolveram resistências múltiplas, sendo uma das principais dificuldades para o tratamento do câncer, além de altas toxicidades. Por isso, a importância do desenvolvimento de outros agentes quimioterápicos com

atividade antitumoral para impedir o crescimento celular resistentes e/ou destruir as células cancerígenas (BODDU et al., 2018; RAKESH et al., 2019).

Para o desenvolvimento de novas entidades químicas faz-se necessário o conhecimento da química medicinal, cuja é denominada como uma área interdisciplinar que compreende a invenção, descobrimento, desenho, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, interpretação da forma de interação do fármaco com o alvo a nível molecular, construção da relação estrutura-atividade e estudo do seu metabolismo (FRAGA; LIMA; BARREIRO, 2011; SILVA-JÚNIOR, 2022).

Nas últimas décadas, estão sendo executados um significativo número de tecnologias em projetos de pesquisa para desenvolvimento de fármacos. Estes estudos fornecem à comunidade científica uma vasta quantidade de dados e informações que podem ser transformadas em conhecimento químico e biológico. À exemplo podemos destacar a seletividade, afinidade e potência, e dessa forma, mostrar a importância das técnicas computacionais. Através de dados e mapeamento da estrutura 3D de alvos moleculares e ligantes, aplicadas ao estudo de sistemas biológicos, estas pesquisas podem guiar a identificação e otimização de novos candidatos a fármacos (GOMES, 2019).

Nesse sentido, algumas entidades químicas se destacam, como os derivados acridínicos, que são agentes quimioterápicos amplamente estudados como antimaláricos, antiprotozoário, antibactericida e antitumoral. Esses compostos se apresentam como uma das opções de quimioterápicos por possuírem um núcleo privilegiado e são caracterizados por um sistema policíclico planar, tomado por três ou quatro anéis e um ou dois grupos substituintes flexíveis (BALIWADA et al., 2022; MOURA, 2009).

Diante dessa problemática que envolve um dos maiores problemas de saúde pública, e de todas as dificuldades enfrentadas na terapêutica, se faz necessária à busca incansável por novos candidatos a fármacos com potencial atividade antitumoral que possam apresentar maior seletividade e conseqüentemente, menor toxicidade e efeitos colaterais. Bem como, compostos que possam superar os mecanismos de resistência e assim, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo o índice de recorrência do câncer, melhorando o prognóstico do paciente.

Dessa forma, esse trabalho propõe avaliar possíveis mecanismos de ação de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos através de estudos *in silico* e *in vitro*, avaliando também parâmetros farmacocinéticos de ADMET. Afim de aprimorar compostos promissores para o tratamento do câncer apresentando maior seletividade, menor toxicidade e capazes de inibir a resistência a múltiplas drogas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil farmacodinâmico de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos por meio de estudos *in silico* e *in vitro*. Além de analisar os parâmetros farmacocinéticos de ADMET.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho envolverão:

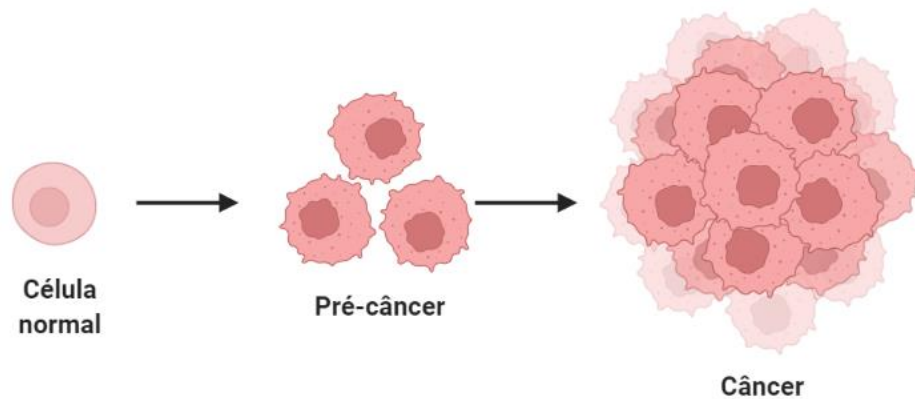
- a) realizar estudos de *docking* molecular, de compostos previamente planejados, sintetizados e elucidados, nos alvos de DNA, complexo Topoisomerase II α /DNA e albumina bovina;
- b) executar estudos de dinâmica molecular dos compostos em DNA, complexo Topoisomerase II α /DNA e albumina bovina;
- c) promover os estudos *in vitro* no DNA através de espectroscopia de absorção em UV/visível e emissão de fluorescência;
- d) executar os estudos *in vitro* em albumina bovina através da espectroscopia de absorção em UV/visível e emissão de fluorescência;
- e) realizar estudos *in vitro* do complexo Topoisomerase II α /DNA;
- f) obter os dados farmacocinéticos *in silico* da absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) e observar os melhores compostos em relação a estes parâmetros.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

O câncer é uma doença multifatorial compreendida como uma desordem celular, em que, ocorre o crescimento e proliferação anormal de células (Figura 1), com o potencial de invadir e se espalhar para outras partes do corpo originando a metástase. Essa desordem celular é causada por variações genéticas e influenciadas por fatores ambientais (ALPHONSA, 2020; GUI; BIVONA, 2022; GURRAPU et al., 2020; KUNWAR et al., 2021; TAHA et al., 2019).

Figura 1 – Proliferação anormal de células



Fonte: BioRender com modificações (2022).

A neoplasia maligna é a segunda principal causa de mortalidade e representa um dos maiores problemas de saúde mundial, sendo uma das doenças com alta incidência de óbitos. Estimam-se para cada ano mais dez milhões de pessoas sejam acometidas por essa doença. Em 2018 foram relatadas uma média de 9,6 milhões de mortes no mundo e a probabilidade é que aumente mais de 13,1 milhões até 2030 (MANASA et al., 2020; YADAV et al., 2022).

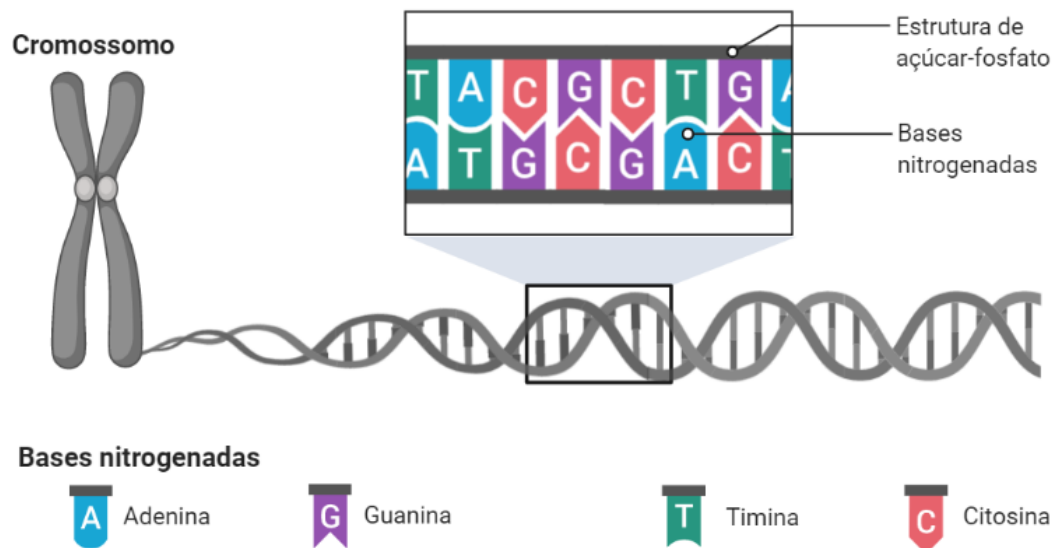
O tratamento farmacológico para o câncer ainda é agressivo devido à pouca seletividade dos fármacos gerando alta toxicidade. Todo ano, bilhões de dólares são empregados com produtos farmacêuticos para o desenvolvimento de fármacos sendo ainda um desafio no século XXI (ABULKHAIR et al., 2020).

Um dos potenciais alvos na farmacologia utilizados na terapia de neoplasias é o ácido desoxirribonucleico (DNA) como é descrito a seguir.

3.1.1 DNA

Esse pode ser definido como uma biomacromolécula organizada na forma de dupla hélice, envolvendo fitas antiparalelas complementares compostas por fosfatos de açúcares e bases nitrogenadas unidas entre si por ligações de hidrogênio (Figura 2). O enrolamento causado pela conformação assumida pelo DNA, é ocasionado pela tendência da cadeia açúcar-fosfato aniônica se manter em contato com a solução aquosa do meio intracelular, enquanto que as bases nitrogenadas, de natureza mais hidrofóbica, orientam-se para o interior, levando a formação de sulcos maiores e menores, que servem como alvos para reconhecimento de proteínas e ligação com pequenas moléculas (ALBINO, 2020).

Figura 2 – Estrutura do DNA



Fonte: BioRender com modificações (2022).

Estudos indicam que danos ao DNA ocorrem devido a fatores exógenos (por exemplo, exposição à luz UV, radiação ionizante e exposição química) e fatores endógenos (por exemplo, erros de replicação, metabolismo celular e estresse oxidativo), que acabará por levar a quebra da dupla fita do DNA (CHENG et al., 2022).

A maioria dos agentes quimioterápicos atualmente no mercado tem como alvo o DNA e são altamente recomendados como terapias para vários tipos de câncer. No entanto, eles têm diversas limitações, como alta toxicidade, eficácia limitada, não especificidade, baixa tolerância, pouca biodisponibilidade e desenvolvimento de resistência (MANASA et al., 2020).

Embora vários tratamentos direcionados estejam disponíveis para poucos tipos de câncer, até o momento, o DNA ainda é considerado o principal alvo na terapia do câncer devido

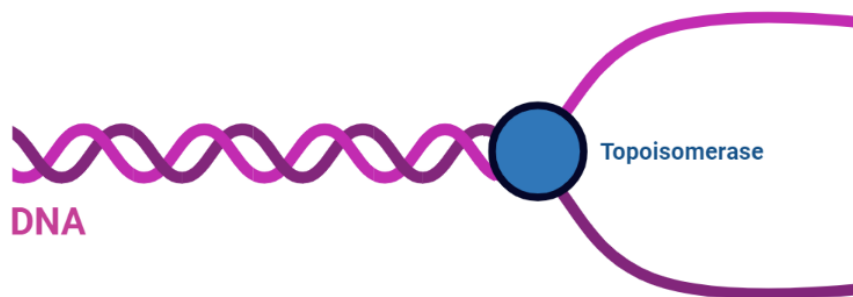
ao seu papel na replicação e transcrição. Portanto, existe a necessidade de desenvolver novos compostos direcionados ao DNA que induziriam a apoptose em células cancerígenas com alta especificidade (HUANG; ZHOU, 2021; MANASA et al., 2020).

Entre os diversos alvos pesquisados para aumentar a seletividade e diminuir a toxicidade de novos antineoplásicos, têm-se as topoisomerases. Elas são enzimas que possuem grande importância fisiológica, envolvidas na regulação do superespiralamento do DNA resolvendo problemas topológicos associados com replicação, transcrição, recombinação e reparo.

3.1.2 *Topoisomerase*

As topoisomerases são classificadas em duas grandes classes: a primeira é a topoisomerase I que pode induzir mudanças topológicas clivando uma fita de DNA e a segunda é a topoisomerase II que pode induzir tais mudanças clivando fitas duplas de DNA (Figura 3) (MAGAR et al., 2021).

Figura 3 – Indução de clivagem transitória na cadeia de DNA



Fonte: BioRender com modificações (2022).

Além disso, nas células humanas, são identificados duas isoformas de topoisomerase II: as isoformas topo II α e β . A isoforma α apresenta massa molecular de 170 kDa e a isoforma β exibe a massa molecular de 180 kDa e são codificadas por genes separados. Austin et al. (1995) relata que os genes para as isoformas α e β da topoisomerase II foram mapeados no cromossomo 17q21-22 e 3p24, respectivamente, confirmando que topoisomerase II α e a topoisomerase II β são isoformas geneticamente distintas. Elas diferem em suas propriedades antigênicas, bioquímicas e farmacológicas, embora suas sequências de aminoácidos mostrem um grau muito alto de similaridade estrutural (GROMOVA et al., 1998; ZANDVLIET et al., 1996).

Embora ambas as isoformas compartilhem 70% de similaridade de sequência, a topoisomerase II α apresenta-se indispensável para sobrevivência das células em proliferação.

Seus níveis aumentam significativamente durante o período de crescimento celular, enquanto, a topoisomerase II β é igualmente expressa entre todas as células, isto é, em células em proliferação e pós-mitóticas. Através dessa premissa, cresce o interesse dos pesquisadores pela topoisomerase II α , como um alvo seletivo para o desenvolvimento de fármacos antitumorais mais seguros (KUNWAR et al., 2021; MAGAR et al., 2021).

Em relação ao perfil dos inibidores da Topoisomerase I e/ou Topoisomerase II, Gomes e colaboradores (2022), observaram que a maioria dos compostos com potencial atividade inibitória em relação a Topo I apresenta estruturas médias a grandes, além de uma porção rígida fundamental para a característica intercalativa, e uma região flexível, que permite a interação com aminoácidos no alvo, em que é possível destacar ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos Arg364, Asn722 e Glu356.

O etoposídeo é um dos medicamentos anticancerígenos mais prescritos no mundo e atua como inibidores de Topoisomerase II. É possível observar que os compostos inibidores seletivos de Topo II α apresentam propriedades estruturais de médio e grande porte, bem como, planicidade dos anéis aromáticos, que é atenuada devido aos anéis flexíveis, mas também podem apresentar elementos que restringem a conformação. Além disso, apresentam halogênios como substituintes favoráveis à sua ação. A maioria dos compostos inibidores seletivos de Topoisomerase II realiza ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas com os resíduos Asp463, Arg487, Lys448 e Lys614 (GOMES et al., 2022).

A maioria dos compostos que exibem dupla atividade inibitória em relação a Topo I e II possuem cadeias relativamente longas, com notável presença de anéis aromáticos. Além de uma porção plana e rígida sugestiva de afinidade para Topo I, e uma região flexível característica de drogas seletivas para Topo II. Após uma visão geral dos resíduos e tipos de interações que prevalecem entre os compostos selecionados, foi possível observar que as moléculas duais apresentam semelhanças nos tipos de interações e aminoácidos quando comparadas aos compostos seletivos de Topo I e II. Em Topo I, os compostos duais interagem principalmente com os resíduos de Arg364, Met428, Leu429, Leu721, Asn722, Tyr268, Tyr426, Pro431, Ile427, Glu356, Ala351 e Phe752. Para Topo II, os compostos duais retratam interações principalmente com os resíduos Arg487, Arg503, Asp479, Asp541, Ala521, Ala816, Ala817, Met781, Met782, Val760, Val785, Gly617, Leu616, Ile822, Tyr805 e Lys456 (GOMES et al., 2022).

Outro ponto importante de pesquisar sobre a terapia do câncer com ênfase na eficácia do tratamento diz respeito a farmacocinética desses antineoplásicos. Estudos apontam que a albumina sérica é importante nesse processo, pois, uma vez que o fármaco entra na corrente

circulatória se complexa com a albumina sérica facilitando a distribuição desse medicamento no sangue e favorecendo a biodisponibilidade (SOLANKI et al., 2021).

3.1.3 Albumina do soro bovino

A albumina sérica está presente na corrente sanguínea humana na concentração de aproximadamente 3,5-5,2 g/dL, e é uma proteína plasmática responsável por inúmeras funções biológicas, como: regulação da pressão osmótica, manutenção do pH sanguíneo, além de armazenar e distribuir uma vasta quantidade de ligantes exógenos e endógenos devido à sua abundância no plasma (ANITHA et al., 2022; RANI et al., 2022).

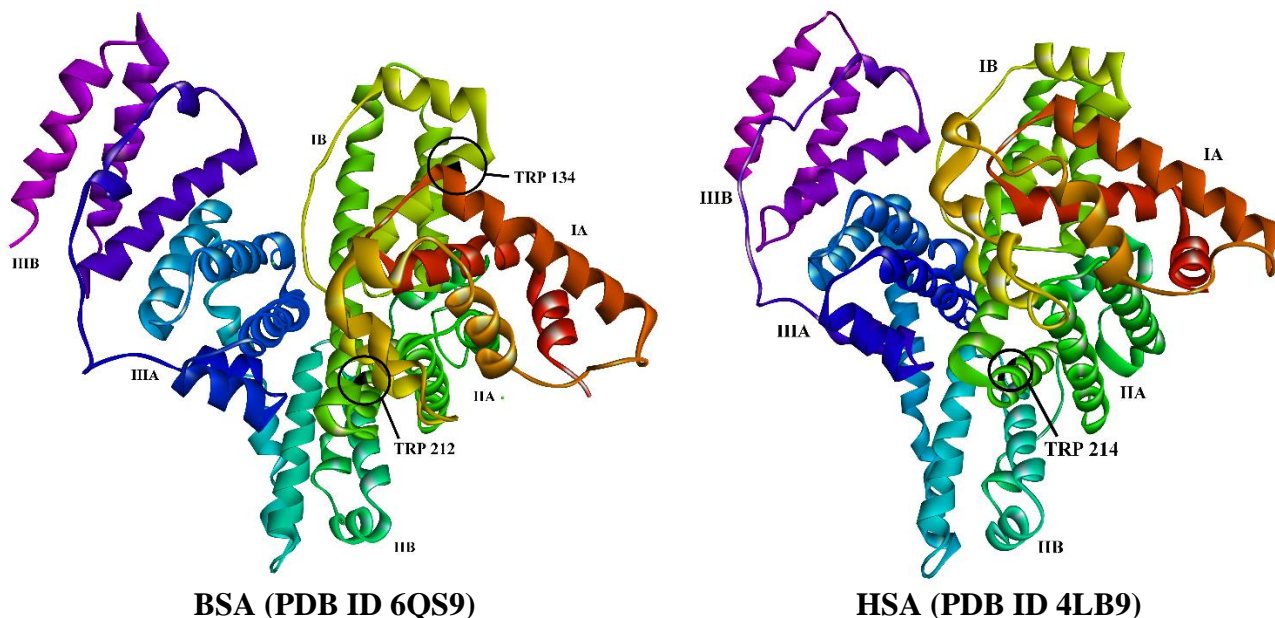
Muitos compostos químicos se ligam com albumina sérica antes de chegar aos seus locais de ação. E, a afinidade entre o fármaco e a proteína é responsável pela concentração desse medicamento no plasma, podendo causar efeito terapêutico ou tóxico. A ligação destes compostos às albuminas séricas altera não apenas a eficácia das substâncias e sua conformação, mas também a atividade dessas albuminas (PETERS, 1995; SHU, et al., 2015; WANI et al., 2021).

Das albuminas disponíveis no mercado, a do soro bovino (BSA) tem sido bastante utilizada em estudos biomiméticos, devido à sua disponibilidade, estabilidade, baixo custo e semelhança estrutural com a albumina humana (HSA). Nesse sentido, a proteína bovina possui uma homologia estrutural de 80% e similaridade da estrutura terciária de 76% com a albumina humana (HSA) e tem sido utilizada em vários estudos como carreadora de diversos compostos, com a finalidade de melhorar suas propriedades de solubilidade, estabilidade e controlar sua distribuição pelo organismo (NAIK et al., 2010; SHEN et al., 2013; WANI et al., 2021).

A albumina do soro bovino é constituída por 582 aminoácidos, e é composta por três domínios α -helicoidais I, II e III, cada domínio consiste em dois subdomínios A e B. Apresenta 20 grupos de tirosina e dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 (primeiro domínio) e Trp-212 (segundo domínio), localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente. Em contrapartida, a albumina do soro humano apresenta 585 aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina e apenas um fragmento de triptofano (Trp-214), que está localizado na posição 214 e no subdomínio IIA do arcabouço proteico (Figura 4). A fluorescência intrínseca apresentada na albumina do soro bovino é justamente devido a presença do triptofano. Alterações do sinal fluorescente podem proporcionar um método conveniente para compreender as alterações estruturais decorrentes da ligação entre fármacos e a albumina (ANITHA et al., 2022;

NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013; PETERS, 1995; QI et al., 2021; SHEN et al., 2013; SINGLA et al., 2016).

Figura 4 – Estrutura cristalográfica das albuminas do soro bovino (BSA) e humano (HSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

Nos últimos anos, houve um aumento nos estudos realizados para determinar o envolvimento de BSA e HSA na resposta terapêutica de drogas anticancerígenas. Após a ligação com albumina sérica, a meia-vida de um fármaco pode ser melhorada aumentando a estabilidade e diminuindo a toxicidade, acarretando melhores resultados terapêuticos. Em contrapartida, se a afinidade de ligação do fármaco à albumina for fraca, o fármaco será metabolizado e excretado do corpo muito rapidamente, de modo que seu efeito terapêutico também será fraco. Por outro lado, a afinidade de ligação muito elevada implica um longo tempo de retenção do fármaco no corpo, o que pode levar a alta toxicidade e efeitos colaterais indesejados ou a benefícios terapêuticos estendidos. Em outras palavras, a ligação à albumina sérica pode afetar a solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco (RIBEIRO et al., 2021; ALVES et al., 2021).

É de suma importância também pontuar que a albumina se acumula de forma significativa em tumores sólidos, acarretado por problemas nos capilares combinado com um sistema linfático ausente ou deficiente. Dessa forma, tem-se utilizado a albumina como veículo para os fármacos penetrarem com maior facilidade em células de tumores sólidos, resultando em uma maior eficácia de tratamento e, conseqüentemente, diminuindo os efeitos secundários.

Portanto, o conhecimento aprofundado da interação entre a albumina e o fármaco é extremamente importante nas áreas da química medicinal e terapias do câncer. Além disso, é essencial para o entendimento da farmacocinética dos fármacos, uma vez que as proteínas plasmáticas são as principais proteínas transportadoras do organismo (ANITHA et al., 2022; GOUVEIA, et al., 2018; KRATZ, 2008; SINGLA, et al., 2016).

3.2 Resistência a múltiplas drogas

A resistência à múltiplas drogas (MDR) é o mecanismo ao qual as linhagens celulares tumorais desenvolvem em oposição aos fármacos antitumorais. Esse mecanismo é uma das causas da ineficácia terapêutica, aumento no índice de recorrência e o mau prognóstico dos cânceres (KE; SHEN, 2017; MISRA et al., 2014).

A capacidade de resposta das células é mediada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos. Assim, a MDR é classificada em duas grandes categorias: a) resistência intrínseca ou primária que ocorre antes do tratamento com quimioterápicos e as drogas são ineficazes antes do início do tratamento, ou seja, é derivada de fatores genéticos e não estão relacionados ao uso contínuo do fármaco e b) resistência adquirida ou extrínseca, que como o próprio nome sugere é desenvolvido após o uso contínuo dos agentes antitumorais, até então, sensíveis ao tratamento (HOLOHAN et al., 2013).

Para erradicação total de células cancerígenas e, conseqüentemente um tratamento farmacológico eficiente em tumores sólidos, os fármacos anticancerígenos devem permear as paredes dos vasos sanguíneos e atravessar o tecido tumoral, ou seja, distribuir-se por todo o tumor. No entanto, a distribuição dos antineoplásicos no tecido tumoral é heterogênea, de modo que, na maioria dos casos, apenas uma pequena porção de células cancerígenas no microambiente tumoral é submetida a uma concentração letal do agente quimioterápico. Portanto, o microambiente tumoral pode promover MDR bloqueando a penetração de fármacos citotóxicos na massa tumoral (TARGHAZEH et al., 2022).

Além da concentração dos agentes quimioterápicos que chegam nas células cancerígenas, outros fatores contribuem para a resistência das células tumorais como por exemplo: organização e composição da matriz, aumento da pressão do fluido intersticial e gradientes de variações metabólicas (RAHMANIAN et al., 2021).

Através dessa premissa, observamos o desafio que as moléculas precisam superar como: barreiras biológicas e físicas, e assim alcançar uma boa biodisponibilidade e seletividade

adequada às células tumorais. Portanto, eis uma das motivações para o planejamento e desenvolvimento de nossos antineoplásicos.

3.3 Estudos computacionais

Apesar dos expressivos avanços na medicina, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo mundo. Onde parte do sucesso dos tratamentos antitumorais se deve a heterogeneidade dos tumores. O domínio da biologia do câncer proporcionou o conhecimento de potenciais alvos terapêuticos que propuseram várias estratégias para o seu tratamento (ARPUDHAMARY et al., 2019).

O avanço tecnológico e o aprimoramento de conceitos químicos e biológicos contribuíram para o planejamento mais eficaz de novos candidatos a fármacos. Nesse contexto, surge a química medicinal responsável por planejar, desenvolver, otimizar e buscar compostos com potencial atividade terapêutica através do conhecimento de diversas ciências como química orgânica, bioinformática, bioquímica, medicina, entre outras (COCCO et al., 2020).

Atualmente, a química computacional é uma das ferramentas imprescindíveis na pesquisa e no planejamento racional de fármacos. A fim de facilitar o mapeamento de novos candidatos, reduzindo os custos desnecessários e o tempo de pesquisa (COCCO et al., 2020; ISMAIL; UZAIRU, 2019).

Entre essas ferramentas computacionais, chamamos atenção para o *docking* molecular e para a dinâmica molecular.

3.3.1 Docking molecular

O *docking* molecular é amplamente utilizado para observar as interações ocorridas entre o ligante e o alvo e prever a melhor posição e orientação de um ligante em comparação a outra molécula, formando um complexo estável. Podendo ser empregado para analisar compostos em diversos alvos moleculares distintos compreendendo uma gama de doenças (SHAFI et al., 2020).

3.3.2 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma extensão da mecânica molecular, em que, o comportamento dinâmico de um sistema molecular é simulado através da integração numérica das equações de movimento, ou simplesmente, é uma técnica computacional utilizada para

simulação dinâmica entre ligantes e macromoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas (ALPHONSA, 2020; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; PINA et al., 2022).

Simulações de DM têm sido comumente empregadas para averiguar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos, e interações no processo de planejamento de fármacos assistido por computador. Esta técnica incorpora flexibilidade de ambos, ligante e receptor, aperfeiçoando suas interações e reforçando a complementaridade entre eles (BRELA et al., 2022; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; SALO-AHEN et al., 2020).

Na dinâmica, o campo de força usa como modelo de moléculas a ideia de átomos unidos por ligações químicas. A utilização de parâmetros como potenciais harmônicos linear e angular, aliado às interações entre átomos não ligados, o método constrói uma expressão de energia potencial que depende somente das posições atômicas. Isto implica que toda a dinâmica dos átomos é tratada através da mecânica clássica utilizando as leis de Newton. Com base nessas aproximações, o problema se reduz em descrevermos os diversos tipos de interações presentes na molécula por funções matemáticas clássicas, cujos parâmetros descrevem tais tipos de interações (PAULA, 2019, f. 7).

Além das análises de interação e afinidade fármaco-alvo (farmacodinâmica), os estudos *in silico* também permitem a análise de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos com potenciais atividades farmacológicas (COCCO et al., 2020).

3.3.3 Estudos preditivos de farmacocinética

Os mecanismos farmacocinéticos, são apontados como uma das principais causas de fracassos no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Diante dessa premissa, é importante ressaltar que existem metodologias avançadas de modelagem *in silico* que avaliam as propriedades farmacocinéticas de ADME, e são extremamente válidas durante o planejamento, otimizando o processo de pesquisa de novos compostos químicos, identificando os principais problemas farmacocinético que comprometem as fases seguintes do desenvolvimento (HONORIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013).

Estudo computacional de ADME-Tox é um método útil e de baixo custo para previsão precisa de parâmetros farmacocinéticos e suas possíveis interações com células, enzimas e membranas biológicas (HOLANDA et al., 2020). Nesse sentido, plataformas ADME-Tox online (SwissADME e PkCSM) foram utilizadas para caracterizar o perfil farmacocinético *in silico* dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos GLDL 06 (R= -CH₃) e GLDL 07 (R= -OH) em comparação com os medicamentos de referência amsacrina e etoposídeo. Os resultados foram interpretados com auxílio de informações disponibilizadas nessas mesmas plataformas.

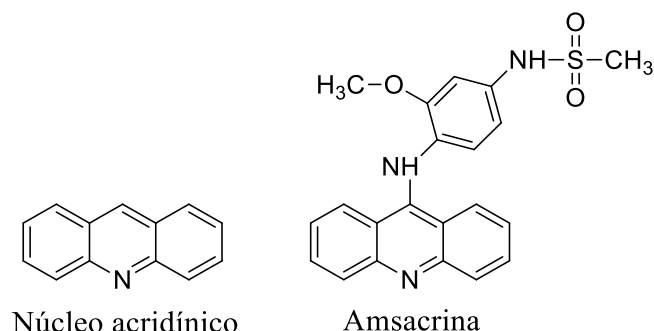
A regra de Lipinski foi desenvolvida em estudo realizado com mais de 2000 fármacos, no qual foi observado que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral. A regra dos 5 de Lipinski, como também é chamada, propõe que para um fármaco expresse uma boa absorção ou permeação é necessário que apresente peso molecular menor ou igual 500 daltons, aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10, doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 e log P calculado (Clog P) menor ou igual a 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco (LIPINSKI et al., 2001; SANTOS et al., 2018). No entanto, Lipinski considera compostos que agem como substratos de transportadores biológicos como exceções à regra. Tais compostos são vitaminas, antibióticos, antifúngicos e glicosídeos cardíacos (LIPINSKI et al., 2001). Outra regra importante para biodisponibilidade oral é a de Veber, que atesta que o composto deve apresentar ligações rotacionais menor ou igual a 10 e a área de superfície polar topológica deve ser menor ou igual a 140 \AA^2 (VEBER et al., 2002).

Esses dados físico-químicos podem ser determinados através de *softwares*, como por exemplo: SwissADME e pk-CSM. Através desses dados é possível realizar a predição de atividades biológicas, bem como, simular a absorção oral do composto e seus efeitos tóxicos. Além disso, é possível observar se os compostos possuem grupos funcionais e/ou têm propriedades físicas parecidas com fármacos conhecidos, esses estudos de *drug-likeness* são importantes para o desenvolvimento e segurança dos medicamentos. (COCCO et al., 2020; ISMAIL; UZAIRU, 2019; THAMARAI et al., 2022).

3.4 Compostos acridínicos

Na química medicinal, os grupos heterocíclicos são largamente pesquisados para possíveis aplicações medicinais (SERT et al., 2020). Essa classe de compostos exercem um papel decisivo no desenvolvimento de estruturas potentes com atividade antitumoral (GURRAPU et al., 2020).

As acridinas ($C_{13}H_9N$) são estruturas privilegiadas de compostos heterocíclicos sendo uma porção essencial na química medicinal que exhibe um amplo aspecto de atividade biológica. Elas são caracterizadas como moléculas planares contidas em um sistema policíclico, com um heteroátomo de nitrogênio em sua estrutura, consideradas como promissoras agentes antitumorais (Figura 5) (ALBINO, 2017; LAFAYETTE et al., 2013).

Figura 5 – Núcleo acridínico e amsacrina

Fonte: adaptado de Albino (2017).

A acridina é importante na pesquisa, pois, apresenta diversas atividades farmacológicas como antimicrobiana, antiviral, antimalárica, antitripanossômica, leishmanicida, antiparkinsoniana, além de antineoplásica (CZARNECKA et al., 2020; GOMES, 2019; PITTA, 2012; RUPAR et al., 2020; SILVA, 2018).

Dentre os derivados acridínicos já conhecidos com atividade antitumoral em destaque por sua aplicação terapêutica temos a amsacrina, esse fármaco apresenta uma porção sulfonamida, que na química medicinal é geralmente usada como um bioisómero eficaz do grupo carboxílico. Esse grupamento sulfonamida pode formar uma rede de ligações de hidrogênio que são as mesmas do grupo carboxílico. Portanto, a porção sulfonamida tem despertado grande interesse na química medicinal, pois, sendo o bioisómero do grupo carboxílico, pode evitar algumas desvantagens do grupo carboxílico, como instabilidade metabólica, toxicidade, bem como difusão passiva limitada através das membranas biológicas (YICHAO et al., 2021).

A Amsacrina (*m*-AMSA), é um intercalador das bases do DNA e inibidor de Topoisomerase II. Esse fármaco é utilizado no tratamento de leucemias agudas e linfomas, embora seu metabolismo possa estar associado à produção de radicais livres, o que causa sérios danos tanto nas células cancerígenas quanto para os tecidos normais (ALMEIDA et al., 2015; FILHO et al., 2019).

Além disso, sua eficiência na intercalação de bases de DNA é atribuída principalmente à sua planaridade, e sua capacidade de inibir as enzimas topoisomerase, telomerase e o complexo proteossoma das células, justificando seu potencial contra células tumorais. Já as tiossemicarbazonas também são amplamente exploradas na química medicinal devido às suas propriedades eletrônicas e reatividade. Muitas atividades biológicas foram relatadas para este grupo, como antibacteriana, antimalárica, antiviral, anticancerígena entre outras. Sua atividade antiproliferativa é frequentemente associada à capacidade de ligar e clivar o DNA, induzir a apoptose e inibir enzimas celulares (SOUSA et al., 2022).

Uma estratégia que tem sido usada para a síntese de novos derivados de acridina envolve a combinação do anel acridínico com uma porção diferente e de ação independente em um composto híbrido covalentemente ligado (ALMEIDA et al., 2015).

Como descritos em estudos publicados por nosso grupo de pesquisa, Sousa sintetizou novos derivados acridínicos através da condensação de derivados tiossemicarbazônicos a dois núcleos acridínicos: I – 9-cloroacridina e II – 6,9-dicloro-2-metoxiacridina confirmado por meio de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (SOUSA, 2019; SOUSA et al., 2022).

Outros estudos estão sendo realizados também com outros derivados tiossemicarbazônicos, entretanto, esses dados ainda não foram publicados.

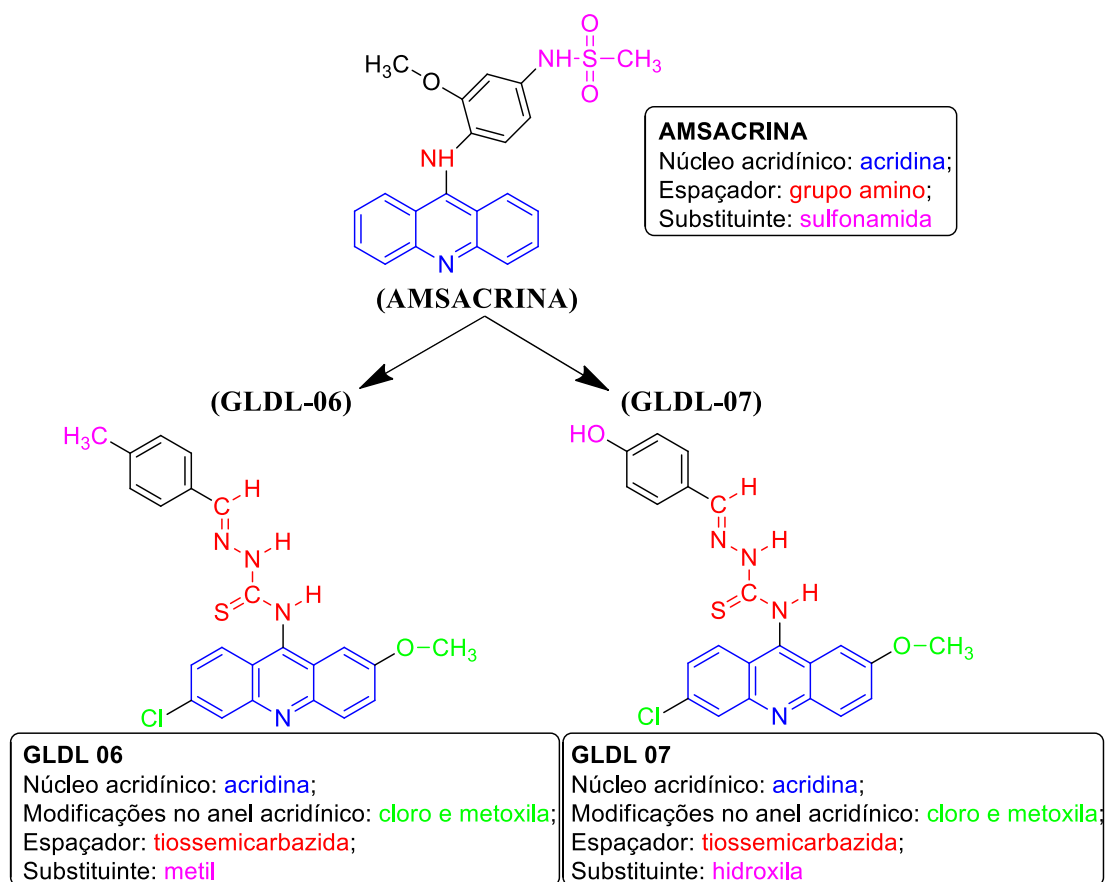
4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento da pesquisa

A amsacrina foi utilizada como modelo para o desenvolvimento dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos. A técnica utilizada é conhecida por *fragment based drug discovery* (FBDD), em que, o planejamento de novas moléculas é baseado em fragmento privilegiado de fármaco já descoberto. Portanto, foram realizados estudos preliminares com a obtenção de novos derivados acridínicos (série GLDL), bem como, a caracterização e elucidação estrutural (SOUSA, 2019). Em seguida, obteve-se a avaliação de toxicidade em linhagens de células tumorais e não tumorais. As sínteses e as avaliações *in vitro* foram realizadas por Sousa através da colaboração dos laboratórios de desenvolvimento e síntese de fármacos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (SOUSA et al., 2022).

Através desses resultados preliminares foi possível selecionar os dois compostos mais promissores da série (GLDL 06 e GLDL 07). Na figura a seguir é possível observar a estrutura química da amsacrina e dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (GLDL 06 e GLDL 07), em que, estão destacados suas principais semelhanças e diferenças.

Figura 6 – Semelhanças e diferenças da amsacrina com o GLDL 06 e GLDL 07



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

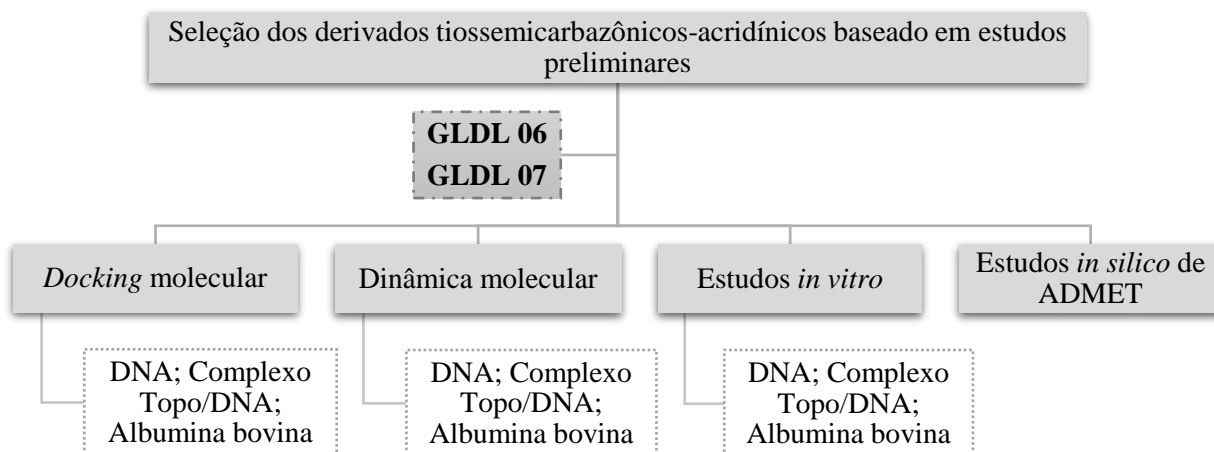
A amsacrina apresenta o núcleo acridínico e o grupo amino como espaçador. Já como substituinte a amsacrina exibe o grupamento sulfonamida. Em relação aos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (GLDL 06 e GLDL 07) apresentam semelhanças entre si como: a acridina, modificações no anel acridínico (cloro e metoxila) e como espaçador o grupamento tiossemicarbazida. O que difere o GLDL 06 do GLDL 07 é o substituinte. Em que, o GLDL 06 apresenta o metil e o GLDL 07, a hidroxila.

Para a continuidade da pesquisa com os compostos GLDL 06 e GLDL 07, foram realizados os estudos de *docking* molecular no DNA, complexo Topoisomerase II α /DNA e albumina bovina, e posteriormente, os estudos de dinâmica molecular no DNA, complexo Topoisomerase II α /DNA e albumina bovina. Em seguida, foram realizados estudos *in vitro* no ssDNA (DNA do esperma de salmão), complexo Topoisomerase II α /DNA e na albumina bovina. E por fim, foram obtidos os resultados preditivos das propriedades farmacocinéticas de administração, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET).

Através do fluxograma a seguir, é possível observar a estruturação sequencial do delineamento da pesquisa. Em que, é importante ressaltar que os estudos computacionais de

docking molecular e dinâmica molecular foram realizados para corroborar com os estudos *in vitro* nos alvos moleculares analisados.

Fluxograma 1 – Estruturação sequencial do delineamento da pesquisa



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

4.2 Estudo de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular dos compostos com as enzimas foram realizados através do *software* AutoDock Tools (ADT) 1.5.6.

Baseando-se no estudo realizado por Wang et al. (2017), a estrutura cristalográfica da topoisomerase II α / DNA complexada com o inibidor etoposídeo foi obtida do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB ID: 5GWK), em que, apresenta uma resolução de 3.15 Å.

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 -23.700; -38.695 e -60.340 Å, dimensões de 96 × 96 × 96 Å nos eixos X, Y e Z, respectivamente. Considerando o espaçamento de 0.375 Å.

Baseando-se no estudo realizado por Malinina et al. (2002), a estrutura cristalográfica do DNA complexada com o inibidor 9-acridina-peptídeo foi obtida do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB ID: 1G3X), em que, apresenta uma resolução de 2.70 Å.

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 -58.632; -52.878 e -58.270 Å, dimensões de 40 × 40 × 40 Å nos eixos X, Y e Z, respectivamente. Considerando o espaçamento de 0.375 Å.

Baseando-se no estudo realizado por Drew et al. (1981), a estrutura cristalográfica do DNA sem estar complexada com inibidor foi obtida do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB ID: 1BNA), em que apresenta uma resolução de 1.90 Å.

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 -14.780; -20.976 e -8.807 Å, dimensões de 96 × 96 × 96 Å nos eixos X, Y e Z, respectivamente. Considerando o espaçamento de 0.375 Å.

Baseando-se no estudo realizado por Castagna et al. (2019), a estrutura cristalográfica da albumina bovina complexada com o cetoprofeno foi obtida do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB ID:6QS9), em que apresenta uma resolução de 2.80 Å.

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 -78.807, 4.473 e 36.530 Å, dimensões de 40 × 40 × 40 Å nos eixos X, Y e Z, respectivamente. Considerando o espaçamento de 0.375 Å.

Em seguida foram gerados os cálculos de interação utilizando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS et al., 1998) 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 (K_i). Além desses dois parâmetros também foi utilizado a eficiência de ligação (LE) que é expressar da seguinte forma:

$$\text{Eficiência de ligação (LE)} = \frac{\text{Valor de energia livre de ligação } (\Delta G)}{n^{\circ} \text{ de átomos da molécula, exceto os hidrogênios}}$$

O cálculo de eficiência de ligação foi realizado de acordo com a metodologia de Murray et al., 2014.

4.2.1 Obtenção e preparação dos alvos

As estruturas cristalográficas de todas as proteínas foram baixadas da plataforma *Brookhaven Protein Data Bank* (www.rcsb.com) (ALPHONSA, 2020). E, logo em seguida, iniciou o processo de preparação desses alvos biológicos. Esse processo foi realizado através do programa PyMOL Win, em que, ocorre a remoção das moléculas de solvente (por exemplo, a água) e pequenos cofatores como ferro (Fe), magnésio (Mg), cloro (Cl). Além disso, ocorreu à extração dos ligantes co-cristalizados nas enzimas que foram empregados no processo de validação da metodologia, bem como, serviu de parâmetro para as moléculas em estudo.

Além do PyMOL Win para esse processo de tratamento das enzimas ainda foi utilizado o *software* AutoDock Tools 1.5.6, em que, adicionou geometricamente à estrutura da enzima, átomos de hidrogênio polar. Já os átomos de hidrogênio não-polares foram mesclados com os respectivos átomos de carbono. As cargas atômicas parciais foram inseridas utilizando o método de Gasteiger Marsili (GASTEIGER; MARSILI, 1980; MORRIS et al., 1998).

4.2.2 Preparação dos ligantes

Os ligantes tiveram suas estruturas desenhadas no ChemDraw Ultra 12.0 e, em seguida, submetidos no programa Chem3D Pro 12.0 para análise conformacional através do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2) obtendo a conformação com menor energia. Por fim, as estruturas foram salvas no formato MOL2.

4.2.3 Estudos de docking molecular para validação (redocking)

Para a validação da metodologia foi realizada a redocagem através do *software* AutoDock Tools 1.5.6. Esse método consiste em submeter o ligante co-cristalizado na estrutura cristalográfica ao estudo de *docking* molecular e observar se a orientação espacial do ligante está preservada, ou seja, 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* (MOURA, 2019). Ou seja, a confiabilidade dos dados gerados através dos estudos de *docking* molecular modifica de acordo com a semelhança existente entre a solução de menor energia e o modo de ligação experimental.

Além, do AutoDock Tools 1.5.6 foi utilizado também o programa preditivo Discovery Studio 2.0, em que é possível observar a sobreposição entre o ligante cristalografado na enzima e a molécula após o estudo de *docking* molecular.

4.2.4 Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes

As imagens em 2D foram obtidas através do programa Discovery Studio 2017 R2 Client, o qual possibilitou a visualização das interações ocorridas entre o ligante e o alvo, assim como as distâncias das mesmas. E dessa maneira, foram analisados os tipos de interações ocorridas, quais os aminoácidos do sítio ativo da enzima que estão interagindo com a molécula e as ligações mais estáveis através da análise da distância de ligação molécula-alvo (SINGH; JANA, 2017).

4.3 Estudo de dinâmica molecular

Todas as simulações de Dinâmica Molecular (DM) foram realizadas utilizando o pacote GROMACS versão 5 (ABRAHAM et al., 2015) e campo de força Amber (HORNAK, 2006). Os ligantes tiveram sua topologia construída utilizando o servidor Acypype (<https://www.bio2byte.be/acypype/>) (SILVA; VRANKEN, 2012).

As propriedades do solvente foram mimetizadas utilizando água do modelo TIP3P com uma caixa cúbica grande o suficiente para permitir um espaço mínimo de 1,0 nm da proteína para as paredes da caixa. A carga do sistema foi neutralizada com a adição de íons na concentração fisiológica de 0,15 mM. A otimização geométrica do sistema solvatado foi realizada usando o algoritmo de descida mais íngreme, seguido de simulações de equilíbrio com nVT e nPT em conjunto, mantendo o inibidor e a proteína contidos. A temperatura foi mantida em 300K acoplando o sistema a um termostato V-rescale (0,1 ps), enquanto a pressão também foi mantida constante em 1 bar usando o algoritmo de acoplamento Parinello-Rahman.

As energias de interação de curto alcance de Coulomb e Lennard-Jones entre o composto e seus arredores foram monitoradas durante a etapa de simulação produtiva. A simulação da dinâmica molecular foi realizada para um tempo de execução de 10 ns. As interações de Coulomb e van der Waals dentro de um corte de curto alcance de 1,0 nm foram computadas a cada espaço de tempo. Particle Mesh Ewald foi empregado para minimizar os efeitos de truncamento das interações eletrostáticas, com um corte de longo alcance de 1,2 nm.

As ligações covalentes na proteína foram restringidas usando o algoritmo LINCS (HESS et al., 1997).

Após as simulações de DM, o movimento da proteína dentro da caixa foi corrigido. Para analisar as interações proteína-ligante e a dinâmica do ligante, utilizou-se o RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) e ligações de hidrogênio. O software VMD 1.9.2 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi usado para visualizar a simulação DM e o programa Grace foi usado para criar gráficos moleculares.

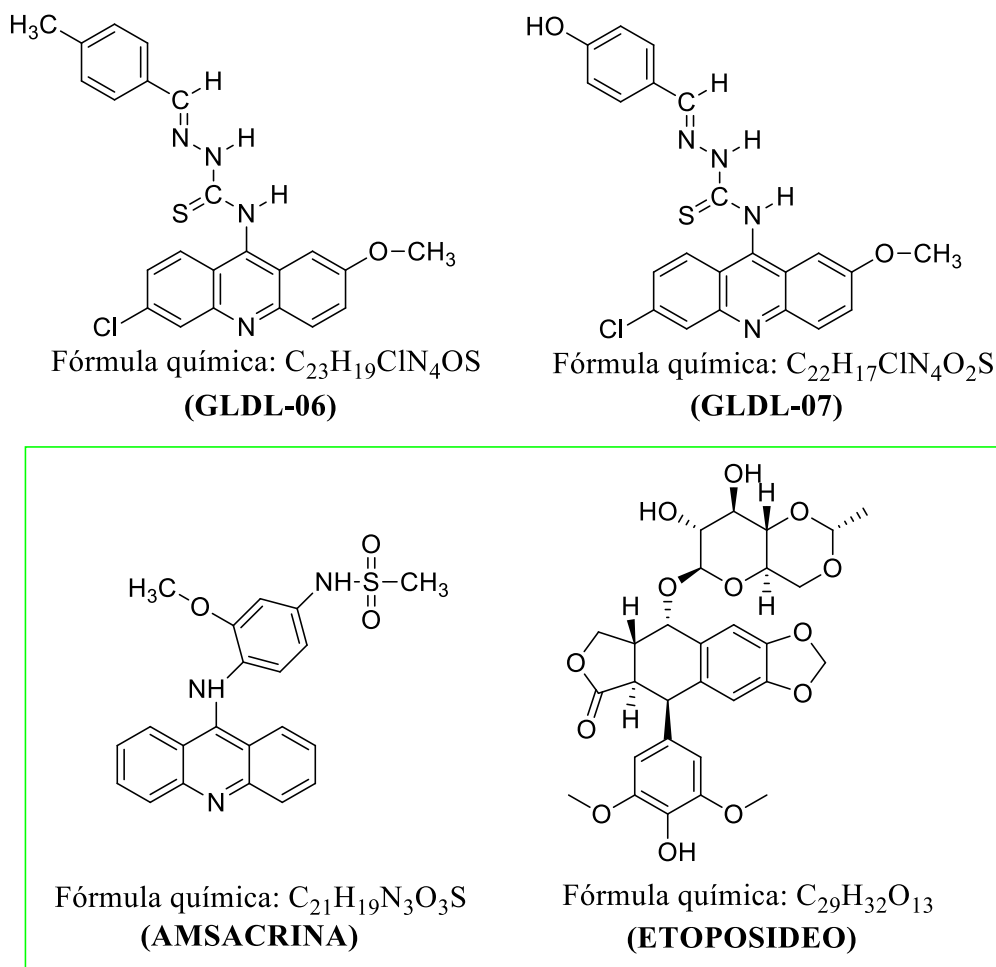
Esses estudos de dinâmica molecular foram realizados em colaboração com o Centro de Computação de Alto Desempenho (NPAD) da UFRN e Instituto Metrópole Digital (IMD), através da doutoranda Jéssika Viana, sob responsabilidade do Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa. E, em colabora o com o Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAL-SP), através do Prof. Dr. Igor José dos Santos Nascimento.

4.4 Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos

Os compostos da série GLDL foram previamente sintetizados, caracterizados e elucidados estruturalmente por meio de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de carbono (RMN de ^1H e ^{13}C), infravermelho (IV), ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (SOUSA et al., 2022), nos laboratórios de desenvolvimento e síntese de fármacos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A seguir, estão desenhados os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos que serão analisados e comparados no presente estudo, bem como, os compostos de referência para serem utilizados como parâmetro (Figura 7).

Figura 7 – Derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e controles positivos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: GLDL-06 (2*E*,*NE*)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9(10*H*)-ilideno)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazinacarbotoioamida;

GLDL-07 (E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-hidroxibenzilideno)hidrazinacarbotoioamida

Vale salientar que a metodologia de síntese, tais como, rota sintética, dados da síntese e toda parte de caracterização e elucidação estrutural já se encontra consolidada pelo nosso grupo de pesquisa de acordo com a publicação da dissertação de Sousa (2019).

4.5 Análise da interação *in vitro* ao ssDNA pelos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos

O DNA do esperma de salmão (ssDNA) foi solubilizado em tampão Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6) e a concentração foi determinada usando o coeficiente de extinção molar de $6.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 260 nm e expressa como equivalente micromolar de pares de base (WOLFE; SHIMER JR; MEEHAN, 1987). Os compostos DL06 e DL07 foram dissolvidos em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 mM e, então, diluído em tampão Tris-HCl (0.01

M, pH 7.6) na concentração de 5 micromolar. A interação entre biomolécula e compostos foi realizada pela manutenção da concentração dos derivados com variação da concentração do ssDNA (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM). O contato dos compostos com a solução do ssDNA foi monitorado em espectrofotômetro de UV-vis (*Thermo Scientific*), em placa de 96 poços e os espectros de absorvância registrados por varredura na faixa de comprimento de onda entre 200-600 nm, à 24 °C. As constantes de ligação dos compostos químicos com o ssDNA serão calculadas pela fórmula: $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ (McGHEE; VON HIPPEL, 1974). A diminuição, aumento, ou deslocamento do máximo de absorção foi analisada da interação entre DNA e compostos.

4.6 Análise da interação *in vitro* a BSA pelos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos

O estudo da interação entre os derivados com albumina sérica bovina (BSA) foi feito por meio das técnicas de espectroscopia UV-vis. As concentrações dos derivados DL06 e DL07 variaram em 2, 4, 6, 8, 10 e 20 μM , expostos à 10 μM de BSA. O contato dos compostos no ensaio de absorção com a solução da proteína foi monitorado em espectrofotômetro de UV-vis (*Thermo Scientific*), em placa de 96 poços e os espectros de absorvância registrados por varredura na faixa de comprimento de onda entre 200-600 nm. A análise dos dados foi feita segundo Almeida et al. (2015). As constantes de ligação dos compostos químicos com a BSA foram calculadas pela fórmula: $[\text{BSA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{BSA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ (McGHEE; VON HIPPEL, 1974). A diminuição, aumento, ou deslocamento do máximo de absorção foi analisada da interação entre BSA e compostos.

4.7 Ensaio de inibição da Topoisomerase II α Humana

Para testar a capacidade de inibição do topo II α , os compostos foram avaliados no ensaio de relaxamento de DNA plasmidial. Este teste consiste em avaliar a atividade da enzima topo II α na ausência e presença do composto seguido de análise por eletroforese, conforme descrito anteriormente por Almeida et al. (2016). Resumidamente, 100 ng pUC19 DNA plasmídeo (da Sigma) e 4.0 unidades de recombinante humana (P170) topoisomerase II (Sigma-Aldrich) em tampão de relaxamento sem ou com compostos testados foram incubados por 30 min a 37°C. As concentrações testadas foram de 100 μM dos compostos e a Amsacrina (*m*-AMSA) foi utilizada como controle positivo. As reações foram terminadas com 1% de SDS e digeridas com

proteínase K. Em seguida, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel corado com brometo de etídio e fotografados sob luz UV. A avaliação quantitativa (% de inibição enzimática por compostos em relação ao controle positivo *m*-AMSA) das bandas de gel correspondentes ao DNA superenrolado foi realizada por densitometria utilizando-se um software de processamento de imagem (Scion Image, versão Beta 4.0.2.) segundo Gouveia et al. (2018).

4.8 Estudo de ADMET *in silico*

Os estudos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foi realizado através de ferramentas gratuitas online, que avaliam as propriedades químicas dos compostos.

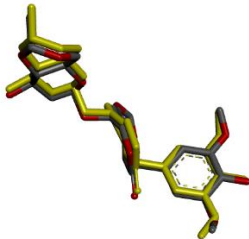
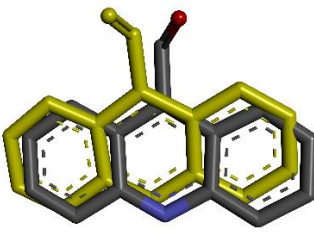

Para a realização desses estudos e obtenção desses dados foram utilizadas ferramentas online de acesso gratuito SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) (GURRAPU et al., 2020). E outra ferramenta que corroborou com essa análise foi a plataforma pk-CSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação da metodologia do *docking* molecular (redocking)

Segundo Yusuf et al. (2008), o valor referente ao desvio meio da raiz quadrada (RMSD) amplamente aceito e confiável para que se reproduza um modo de ligação conhecido é de $\leq 2,0$. Através dos estudos para a validação da metodologia do *docking* obteve-se os seguintes resultados descritos na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 – Valores de RMSD (*reference*) para os alvos analisados

	ALVOS		
	5GWK (Topoisomerase II α /DNA)	1G3X (DNA)	6QS9 (Albumina bovina)
	0,48 Å	2,53 Å	0,66 Å
RMSD _{ref}			

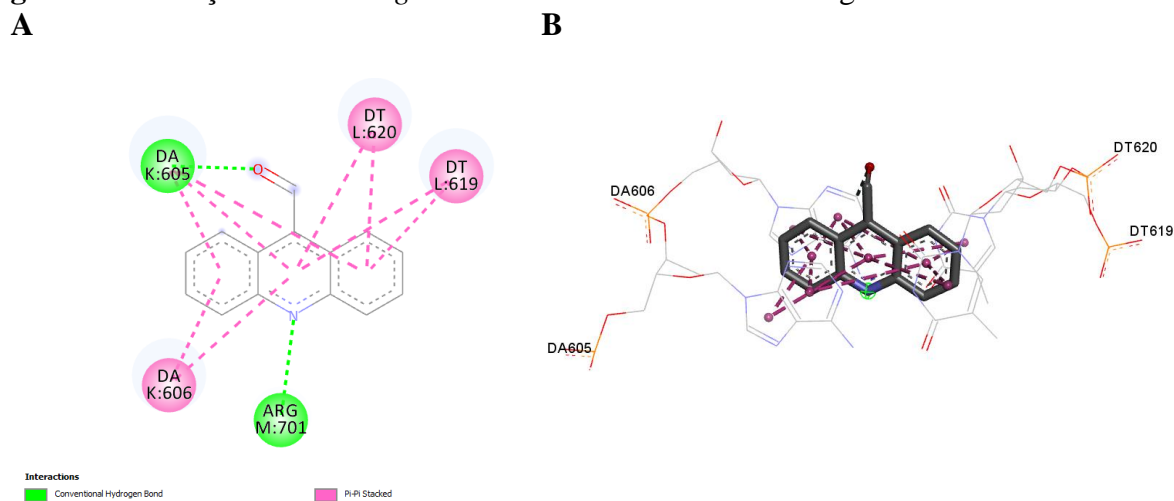
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: Os ligantes em amarelo são os co-cristalizados, já os ligantes em cinzas são os redocados.

Para o alvo PDB ID 1BNA (DNA) não foi realizado o redocking, pois, esse alvo não apresenta ligante co-cristalizado.

Como podemos observar na tabela acima o ligante do alvo PDB ID 1G3X (DNA) apresentou um valor de RMSD ref maior que 2,0 Å. Todavia, é de suma importância destacar que ocorreu boa sobreposição do ligante co-cristalizado no alvo e do mesmo ligante após ser redocado.

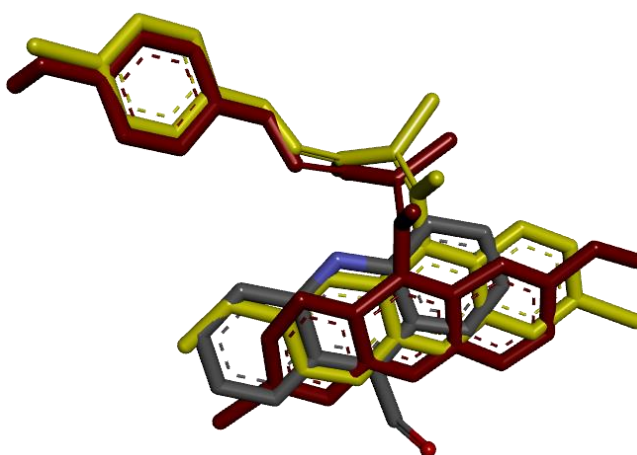
Além disso, o padrão das ligações foi semelhante, ou seja, tanto no *docking* do ligante PDB como no redocking podem ser visto ligações de hidrogênio convencional e empilhamento Pi-Pi com as bases nitrogenadas adenina (A) 605 e 606 e timina (T) 619 e 620 (Figura 8).

Figura 8 – Interações do *docking* molecular do PDB e do redocking

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A maior diferença é que na figura A observamos uma interação de hidrogênio convencional com Arginina M: 701 que não é observada na figura B. Isto porque na figura A foi realizado o redocking considerando a estrutura cristalografada completa do PDB, ou seja, DNA e N(ALFA)-(9-ACRIDINOIL)-TETRAARGININA-AMIDA. Já na figura B que são as interações realizadas do *docking* pronto do PDB só foi considerado o DNA.

Também é possível observar a sobreposição entre o ligante cristalografado na enzima e os compostos DL's após o estudo de *docking* molecular. Como mostra a figura a seguir (Figura 9):

Figura 9 – Sobreposição do ligante co-cristalizado com os compostos analisados no mesmo *grid box*

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota: Em amarelo (GLDL 06), vermelho (GLDL 07) e cinza (ligante co-cristalizado do alvo).

Logo, é possível observar que mesmo o RMSD do alvo 1G3X sendo acima de 2,0 Å, os compostos analisados se sobrepuseram semelhantemente ao ligante do alvo.

Através da validação da metodologia foi possível obter os parâmetros de *grid box* para cada alvo, como mostra a tabela a seguir:

Tabela 2 – Parâmetros do *grid box* para os respectivos alvos

	ALVOS			
	5GWK (Topoisomerase II α /DNA)	1G3X (DNA)	6QS9 (Albumina bovina)	1BNA (DNA)
GRID	X- dimensão: 96	X- dimensão: 40	X- dimensão: 40	X- dimensão: 96
BOX	Y- dimensão: 96	Y- dimensão: 40	Y- dimensão: 40	Y- dimensão: 96
	Z- dimensão: 96	Z- dimensão: 40	Z- dimensão: 40	Z- dimensão: 126
	X centro: 23.700	X centro: 58.632	X centro: -78.807	X centro: 14,780
	Y centro: -38.695	Y centro: 52.878	Y centro: 4.473	Y centro: 20,976
	Z centro: -60.340	Z centro: 58.270	Z centro: 36.530	Z centro: 8,807
	Espaçamento: 0,375 Å	Espaçamento: 0,375 Å	Espaçamento: 0,375 Å	Espaçamento: 0,375 Å

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota: O *docking* molecular para o alvo PDB ID 1BNA (DNA) foi realizado utilizando a metodologia de Moura, 2019 (dissertação).

Na tabela 2 estão descritas as coordenadas, ou seja, o espaço de busca (*grid box*). Portanto, as análises de *docking* molecular foram centralizadas no mesmo local que o ligante co-cristalizado que não necessariamente é o sítio de ligação do alvo. Exceto, o estudo no PDB ID 1BNA que não apresenta ligante co-cristalizado.

5.2 Estudo de *docking* molecular

Nos estudos de *docking* molecular foram analisadas a energia livre de ligação (ΔG), constante de afinidade (K_i) e eficiência de ligação (LE). Assim, quanto menor a energia livre de ligação e constante de afinidade maior será a probabilidade de interação do ligante com o alvo. O mesmo ocorre para a eficiência de ligação (LE), portanto, quanto menor o LE maior será a interação do ligante com a enzima.

5.2.1 Interações dos compostos com DNA

Um dos alvos importantes para atividade antitumoral é o ácido desoxirribonucleico (DNA), segundo a literatura a maioria dos agentes quimioterápicos atualmente no mercado tem como alvo o DNA e são altamente recomendados como terapias para vários tipos de câncer.

O *docking* molecular foi realizado com duas estruturas cristalográficas de DNA, em que, avaliam perfis de interações distintas: i) o alvo B-DNA dodecâmero (PDB ID: 1BNA) já é utilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de desenvolvimento e síntese de fármacos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) para avaliação do perfil de interação dos compostos aos sulcos do DNA, visto que, esse alvo não apresenta espaço entre as duplas hélices e bases nitrogenadas para moléculas interagirem por intercalação; ii) a estrutura do DNA dodecâmero (PDB ID: 1G3X), é utilizada como modelo de avaliação de perfil intercalador de DNA (ALBINO, 2020; ALVES et al., 2021).

Na tabela a seguir estão descritos todos os valores encontrados para os compostos GLDL e para os controles em dois alvos de DNA (PDB ID 1G3X e PDB ID 1BNA).

Tabela 3 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (K_i) e eficiência de ligação (LE) dos compostos em DNA (PDB ID 1G3X) e DNA (PDB ID 1BNA)

Compostos	PDB ID 1G3X			PDB ID 1BNA		
	ΔG^a	K_i^b	LE ^a	ΔG^a	K_i^b	LE ^a
GLDL 06	-11,79	2,29	-0,393	-11,95	1,75	-0,398
GLDL 07	-10,98	8,98	-0,366	-10,98	8,92	-0,366
AMSACRINA	-10,12	38,25	-0,361	-11,13	6,96	-0,397
ETOPOSÍDEO	-9,34	142,84	-0,222	-9,89	55,85	-0,235
LIGANTE	-7,58	2.790,0	-0,473	---	---	---

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: ^a ΔG e LE medido em Kcal mol⁻¹;

^b K_i em nM.

Através da tabela acima, é possível observar que para o DNA (PDB ID 1G3X), o composto que apresentou melhor interação e afinidade com as bases nitrogenadas do DNA foi o GLDL 06 (ΔG -11,79 Kcal mol⁻¹/ K_i 2,29 nM). Em relação aos compostos utilizados como controle positivo (amsacrina, etoposídeo e ligante co-cristalizado do alvo) observa-se que a amsacrina demonstrou um melhor valor de ΔG -10,12 Kcal mol⁻¹ e K_i 38,25 nM. Entretanto, os dois compostos da série GLDL apresentaram resultados mais promissores do que os controles positivos.

O DNA (PDB ID 1BNA) não apresenta ligante co-cristalizado por este motivo que não há resultados energia livre de ligação e constante de afinidade. O estudo mostra que o composto que apresentou melhor interação e afinidade com os sulcos do DNA foi o GLDL 06 (ΔG -11,95 Kcal mol⁻¹/ Ki 1,75 nM). Para os fármacos já utilizados na clínica foi possível observar similaridade nos resultados quando comparados com o DNA (PDB ID 1G3X), ou seja, para o alvo PDB ID 1BNA, a amsacrina também apresentou melhor energia livre de ligação e constante de afinidade (ΔG -11,13 Kcal mol⁻¹/ Ki 6,96 nM) quando comparado com o etoposídeo (ΔG -9,89 Kcal mol⁻¹/ Ki 55,85 nM). Podendo sugerir que o composto GLDL 06 apresentou resultados mais promissores do que todos os outros compostos analisados. A amsacrina exibiu uma melhor energia livre de ligação e constante de afinidade quando comparada com o composto GLDL 07. Todavia, o composto GLDL 07 realizou melhor interação e afinidade do que o etoposídeo no alvo molecular.

A diferença de energia livre de ligação e constante de afinidade obtida através do *docking* molecular para os dois alvos do DNA se dá porque o PDB ID 1BNA não apresenta espaço entre as duplas hélices e bases nitrogenadas para que determinado composto se ligue e realize interação por intercalação de bases. Logo, os compostos irão interagir por ligações com os sulcos menores do DNA. Diferentemente do que ocorre com o PDB ID 1G3X, que existe um espaço e assim, os anéis acridínicos dos compostos se intercalam com as bases nitrogenadas do DNA realizando empilhamento Pi-Pi (Figura 10).

Figura 10 – Sítio de ligação do DNA (PDB ID 1BNA/1G3X) com os compostos estudados

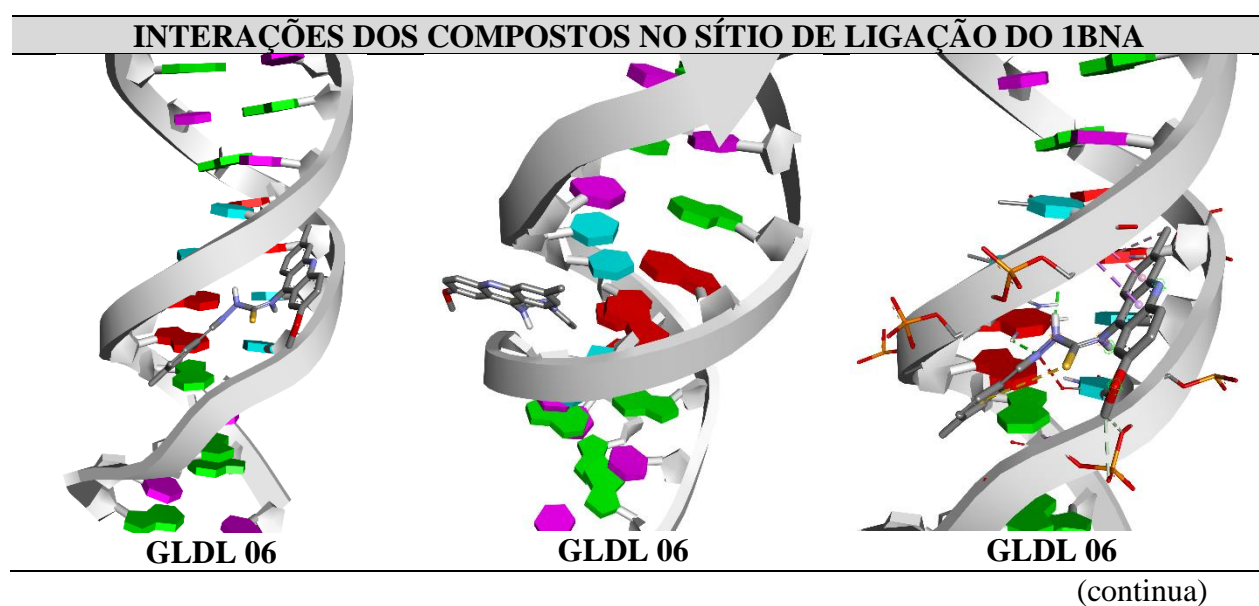
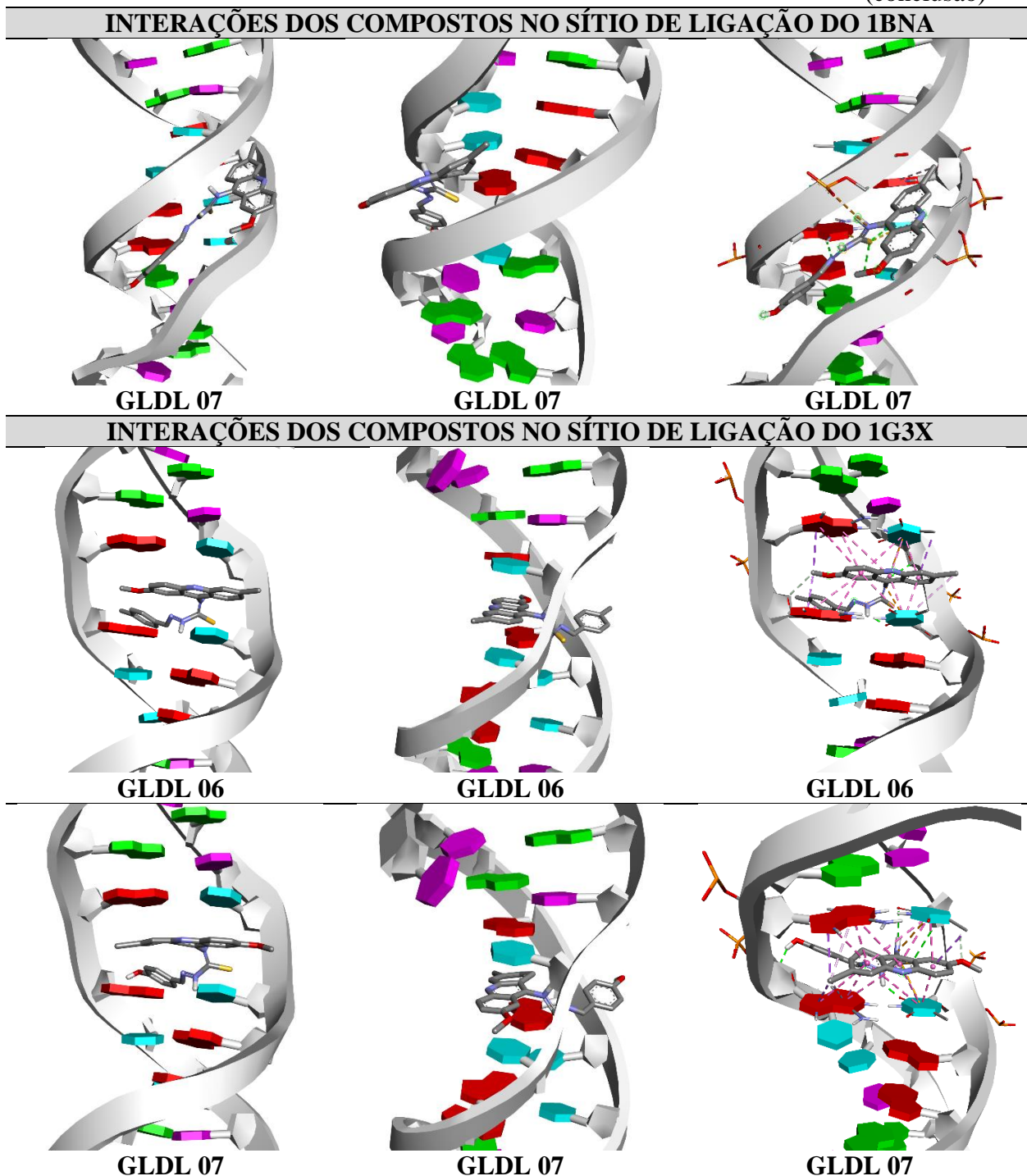


Figura 10 – Sítio de ligação do DNA (PDB ID 1BNA/1G3X) com os compostos estudados

(conclusão)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Na figura acima mostra que para o alvo 1BNA, os compostos realizaram interações através dos sulcos, justamente porque essa estrutura cristalográfica não apresenta espaço suficiente entre as bases nitrogenadas para que o composto se acomode e realize ligações.

Já para o alvo 1G3X, as porções das moléculas que interagem no sítio de ligação do DNA (farmacóforo) são justamente, os anéis acridínicos, e o restante da molécula não apresenta uma quantidade grande de ligações. Através dessa premissa observamos que esses compostos apresentam um perfil mais de intercalador de bases nitrogenadas do que interagem com os sulcos já que essas interações hidrofóbicas que ocorrem são justamente com os anéis acridínicos (Figura 10).

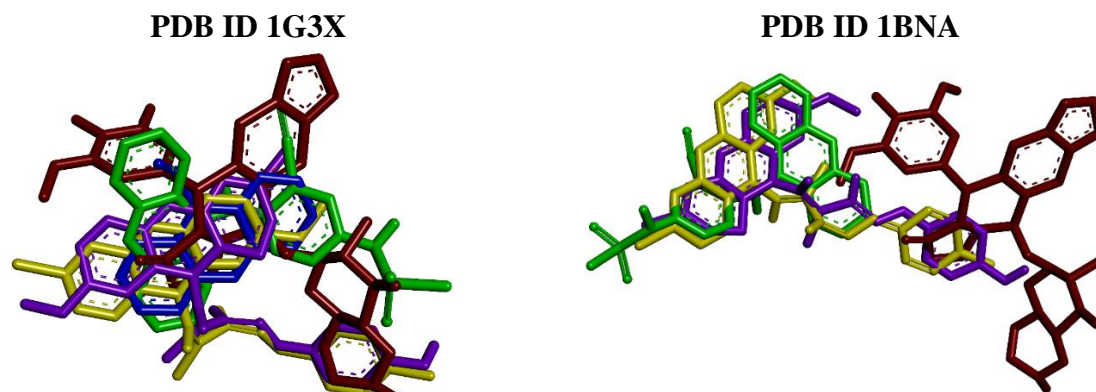
Além disso, ao analisar as estruturas químicas dos compostos concluiu que desprezando a quantidade de átomos de hidrogênio, o composto GLDL 06 e GLDL 07 apresentaram 30 átomos isoladamente, a amsacrina apresentou 28 átomos, etoposídeo apresentou 42 átomos e o ligante co-cristalizado do alvo apresentou 16 átomos. A quantidade de átomos dos compostos é importante para obtenção da eficiência de ligação (LE) que utiliza dessas informações para a realização do cálculo.

Contudo, podemos inferir que a eficiência de ligação dos compostos para o alvo do DNA (PDB ID 1G3X) obedeceu a proporção da energia livre de ligação, com exceção do ligante co-cristalizado no alvo, em que, apesar de ter apresentado o resultado menos satisfatório de energia livre de ligação e constante de afinidade, foi o composto que apresentou a melhor eficiência de ligação. Esse fato pode ser explicado através do tamanho desse ligante co-cristalizado. Para obter a eficiência de ligação é necessário dividir a energia livre de ligação pela quantidade de átomos da molécula, exceto os hidrogênios. Devido ao ligante ser bem menor (16 átomos) comparado com os compostos da série GLDL (30 átomos), quando realiza o cálculo de LE do ligante co-cristalizado resulta em dado mais satisfatório.

Entretanto, a eficiência de ligação dos compostos para o alvo do DNA (PDB ID 1BNA) obedeceu a proporção da energia livre de ligação. Dessa forma, é possível constatar que o tamanho estrutural dos compostos não influenciou na quantidade de interações desses compostos no alvo, e conseqüentemente, a sua energia livre de ligação e constante de afinidade.

Por tanto, a eficiência de ligação foi similar aos resultados de energia livre de ligação e constante de afinidade no que diz respeito aos compostos mais promissores.

Na figura a seguir, é possível observar a sobreposição dos compostos nos respectivos alvos de DNA e analisar a posição e localização as quais os compostos se ligam nos alvos moleculares.

Figura 11 – Ligantes sobrepostos no alvo PDB ID 1G3X e PDB ID 1BNA

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota: Azul: ligante co-cristalizado; Verde: amsacrina; Vermelho: etoposídeo; Amarelo: GLDL06; Roxo: GLDL07

A figura 11 mostra que para o PDB ID 1G3X, o ligante co-cristalizado, amsacrina, etoposídeo, GLDL 06 e GLDL 07 se sobrepuseram de forma semelhante. Entretanto, para o PDB ID 1BNA todos os compostos analisados se sobrepuseram de forma semelhante, com exceção do etoposídeo que se ligou no alvo numa posição diferente da amsacrina e dos compostos GLDL 06 e GLDL 07.

Outra forma de se estudar como os compostos se ligam nos alvos é através da análise dos tipos de ligações realizadas, das distâncias dessas ligações e com quais resíduos ocorrem essa interação (Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4 – Perfil de interação dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)

Compostos	DNA (PDB ID 1G3X)	
	Tipos de ligações	Resíduos (distância)
GLDL 06	Van der Waals	-
	Ligação de hidrogênio convencional	ARG M: 701 (4,12 Å e 4,26 Å), DT L: 619 (5,47 Å), DT L: 620 (3,66 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DA K: 606 (3,03 Å)
	Interação desfavorável positivo-positivo	ARG M: 701 (4,95 Å e 4,69 Å)
	Pi-Cátion	DT L: 619 (5,18 Å), DT L: 620 (4,29 Å)
	Pi-Sigma	DA K: 605 (4,00 Å), DT L: 620 (3,19 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DA K: 606 (7,06 Å), DA K: 605 (7,13 Å e 9,12 Å), DT L: 619 (6,14 Å; 4,63 Å e 3,45 Å), DT L: 620 (4,13 Å e 5,49 Å)
Pi-Alquil	ARG M: 702 (4,30 Å), DT L: 619 (4,62 Å)	
GLDL 07	Van der Waals	-
	Ligação de hidrogênio convencional	ARG M: 701 (2,36 Å e 1,68 Å), DA K: 606 (2,82 Å), DT L: 619 (1,73 Å), DT L: 620 (2,55 Å e 3,35 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DT L: 620 (3,26 Å)
	Interação desfavorável positivo-positivo	ARG M: 701 (3,26 Å e 2,74 Å)
	Pi-Cátion	DT L: 619 (4,40 Å), DT L: 620 (4,28 Å)

(continua)

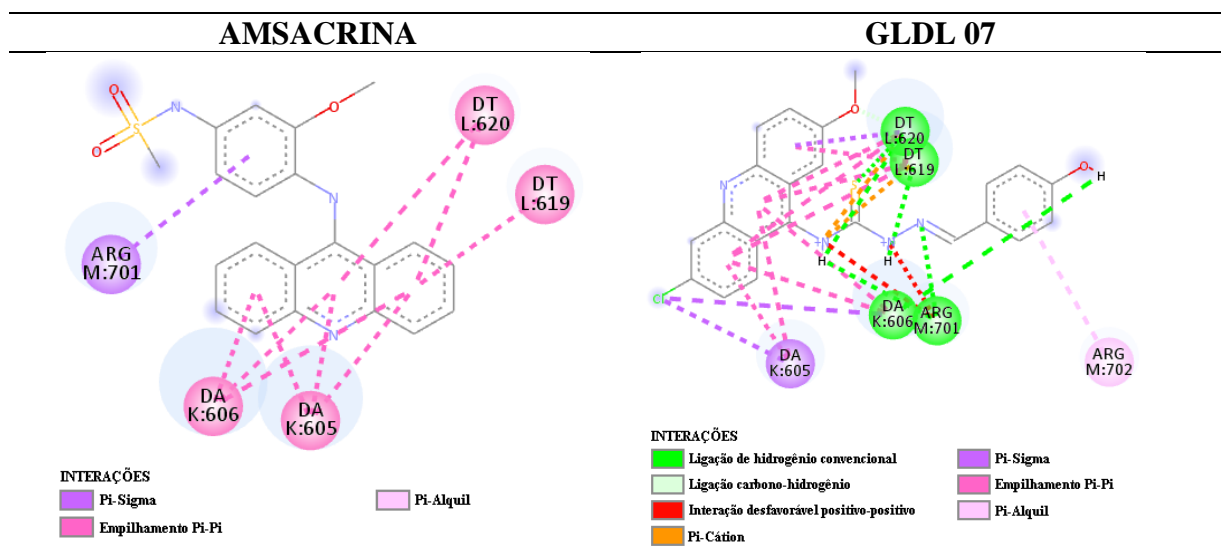
Tabela 4 – Perfil de interação dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)

(conclusão)

DNA (PDB ID 1G3X)		
Compostos	Tipos de ligações	Resíduos (distância)
GLDL 07	Pi-Sigma	DA K: 605 (3,71 Å), DA K: 606 (3,73 Å), DT L: 620 (3,66 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DA K: 605 (4,76 Å e 4,71 Å), DA K: 606 (4,43 Å e 5,15 Å), DT L: 619 (5,62 Å; 4,14 Å e 3,58 Å), DT L: 620 (3,92 Å e 5,37 Å)
AMSACRINA	Pi-Alquil	ARG M: 702 (5,16 Å)
	Pi-Sigma	ARG M: 701 (3,78 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DT L: 620 (5,70 Å e 4,23 Å), DT L: 619 (4,10 Å), DA K: 605 (3,87 Å; 4,73 Å e 4,68 Å), DA K: 606 (3,74 Å; 5,18 Å e 4,63 Å)
ETOPOSÍDEO	Pi-Alquil	-
	Ligação de hidrogênio convencional	ARG M: 701 (2,38 Å e 4,27 Å), ARG M: 702 (2,54 Å), DA K: 606 (2,91 Å), DA K: 605 (2,41 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	ARG M: 701 (2,79 Å), DA K: 606 (3,16 Å)
	Ligação de hidrogênio Pi-doador	-
	Pi-Sigma	DT L: 619 (3,66 Å), DA K: 606 (2,96 Å)
	Pi-Elétrons Livres	DT L: 620 (2,60 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DA K: 605 (4,40 Å e 3,76 Å), DA K: 606 (6,40 Å e 5,56 Å)
	Pi-Pi em forma de T	-
	Pi-Alquil	DT L: 619 (4,00 Å), DA K: 606 (6,04 Å), DA K: 605 (5,12 Å)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

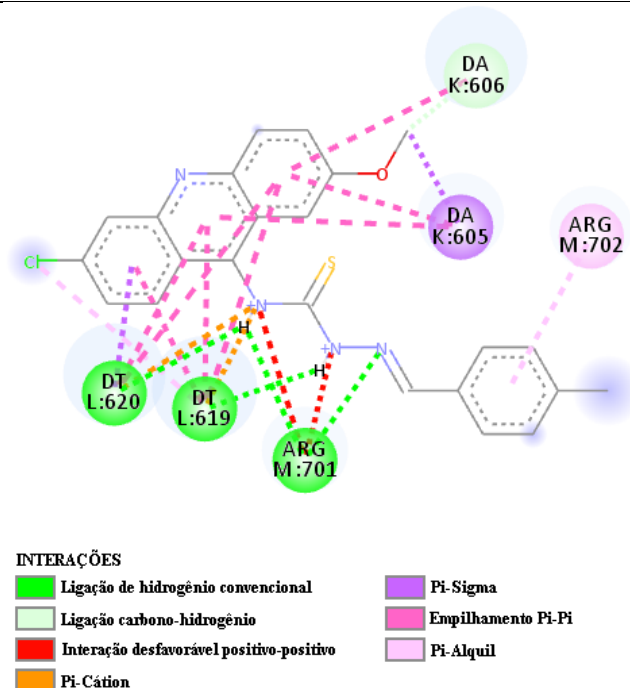
Para uma melhor visualização destes resultados, a seguir estão as imagens das interações 2D e 3D realizadas pelos compostos analisados no DNA (PDB ID 1G3X).

Figura 12 – Imagens em 2D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)

(continua)

Figura 12 – Imagens em 2D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1G3X)

(conclusão)

GLDL 06

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através da tabela 4 e da figura 12, é possível observar que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 apresentaram perfil de interações semelhantes, ou seja, os dois compostos ao interagirem com o DNA (PDB ID 1G3X) realizaram ligações com resíduos similares sendo divergentes apenas nas distâncias dessas interações.

Através dessa premissa, destaca-se a ligação de hidrogênio convencional com arginina 701, desoxitimidina 619 e desoxitimidina 620, interação desfavorável positivo-positivo com arginina 701, interações pi-cátion com desoxitimidina 619, desoxitimidina 620, interações pi-sigma com desoxiadenosina 605 e desoxitimidina 620, interações do tipo empilhamento pi-pi com desoxiadenosina 605, desoxiadenosina 606, desoxitimidina 619 e desoxitimidina 620. E por fim, ligações pi-alquil com o aminoácido arginina 702.

O terceiro melhor resultado nos estudos de *docking* molecular para o DNA (PDB ID 1G3X) foi da amsacrina. Entretanto, a amsacrina não apresenta muita similaridade no perfil de interação com o DNA quando comparada com os compostos da série GLDL. A ligação similar que a amsacrina realiza é apenas de empilhamento pi-pi com desoxiadenosina 605, desoxiadenosina 606, desoxitimidina 619 e desoxitimidina 620.

Já o etoposídeo só apresenta três ligações similares com o GLDL 06 e GLDL 07, sendo uma ligação de hidrogênio convencional com arginina 701 e ligações do tipo empilhamento pi-

pi com desoxiadenosina 605 e desoxiadenosina 606. Vale salientar que apesar do etoposídeo ter realizado interações com o alvo, o mesmo não é um intercalador de DNA, todavia, é um inibidor de topoisomerase.

Podemos observar que o único tipo de interação com seus respectivos resíduos realizado igualmente nos quatro compostos citados acima foi o empilhamento pi-pi.

Curiosamente apesar do composto GLDL 06 ter apresentado um melhor valor de ΔG e K_i comparado com o GLDL 07, a maioria das interações realizadas pelo GLDL 06 com o DNA apresentaram uma maior distância de ligação, com exceção da interação pi-sigma com desoxitimidina 620 (3,19 Å), empilhamento pi-pi com desoxitimidina 3,45 Å e pi-alquil com arginina (4,30 Å).

É importante esclarecer que o alvo envolvido nesse estudo é o DNA e, conseqüentemente é formado por bases nitrogenadas. A presença do aminoácido arginina interagindo com as moléculas é devido ao fato de que esse alvo (PDB ID 1G3X) apresenta resíduos possivelmente importantes para a ligação molécula-alvo. Por isso, que esses resíduos não foram excluídos na etapa de tratamento do DNA (apêndice C).

Como já mostrado na figura 6, a amsacrina apresenta como espaçador o grupo amino, já os compostos GLDL apresentam como espaçador o grupo tiossemicarbazida. Desse modo, ao visualizar os resultados de *docking* molecular observamos que o grupo amino da amsacrina não realiza nenhuma interação com o DNA diferentemente do grupo tiossemicarbazida presente nos compostos GLDL 06 e GLDL 07. Possivelmente, essas variações de interações podem corroborar para explicar uma melhor energia livre de ligação e afinidade dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos quando comparados com a amsacrina. Através dessa observação é possível inferir que a técnica de bioisosterismo, em que, ocorreu a modificação molecular do grupo amino (amsacrina) pelo grupo tiossemicarbazida (GLDL) foi favorável para a afinidade desses compostos com o alvo farmacológico.

Outro ponto importante dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 que podem contribuir no entendimento das energias livres de ligação e constantes de afinidades obtidas é o fato de que esses compostos apresentam modificações no anel acridínico quando comparados com a amsacrina. Ou seja, tanto o GLDL 06 como o GLDL 07 apresentam cloro (Cl) e metoxila (OCH₃) que favorecem interações com o DNA (Figura 6).

Ao comparar apenas os compostos GLDL 06 e GLDL 07 através desses estudos *in silico* observamos que o substituinte metil (CH₃) do GLDL 06 não realizou nenhuma interação com o DNA, entretanto, o substituinte hidroxila (OH) do GLDL 07 realizou ligação de hidrogênio convencional com o DNA. Porém, esse fato não interferiu no resultado de *docking* molecular,

visto que, o composto GLDL 06 apresentou um melhor valor de ΔG e K_i comparado com o GLDL 07 (Figura 12).

Já para o DNA (PDB ID 1BNA), o perfil de interação dos compostos está descrito na tabela a seguir:

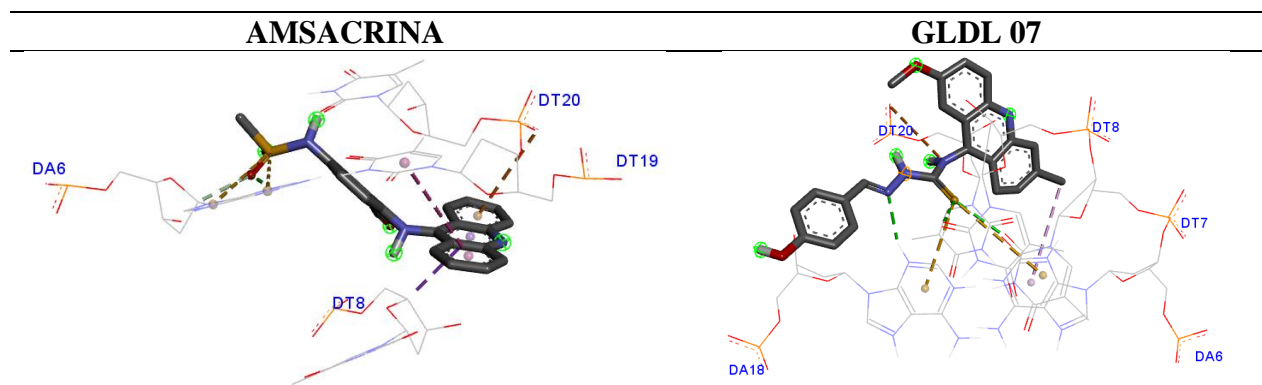
Tabela 5 – Perfil de interação dos compostos no DNA (PDB ID 1BNA)

Compostos	DNA (1BNA)	
	Tipos de ligações	Resíduos (distância)
GLDL 06	Ligação de hidrogênio convencional	DT 19 (2,11 Å), DA 18 (2,11 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DC 9 (3,11 Å), DT 8 (3,29 Å)
	Interação desfavorável acceptor-acceptor	DT 8 (3,00 Å)
	Pi- Sigma	DT 20 (3,03 Å)
	Pi-Pi em forma de T	DT 20 (5,40 Å)
	Pi-Alquil	DA 6 (4,74 Å)
GLDL 07	Ligação de hidrogênio convencional	DA 18 (2,46 Å), DT 8 (2,81 Å), DT 7 (2,78 Å)
	Carga Atrativa	DT 20 (5,30 Å)
	Pi-Enxofre	DT 7 (5,28 Å) DA 18 (4,30 Å)
	Pi-Alquil	DA 6 (5,36 Å)
AMSACRINA	Ligação de hidrogênio convencional	DA 6 (2,01 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DA 6 (2,76 Å)
	Pi-Enxofre	DA 6 (5,74 Å e 5,26 Å)
	Pi-Sigma	DT 8 (3,70 Å)
	Pi-Ânion	DT 20 (4,64 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DT 19 (5,76 Å)
ETOPOSÍDEO	Ligação de hidrogênio convencional	DA 18 (2,18 Å), DG 16 (1,83 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DG 10 (3,24 Å e 3,78 Å), DA 18 (3,08 Å), DA 17 (3,56 Å), DC 11 (3,79 Å)
	Pi-Ânion	DG 10(3,84 Å)

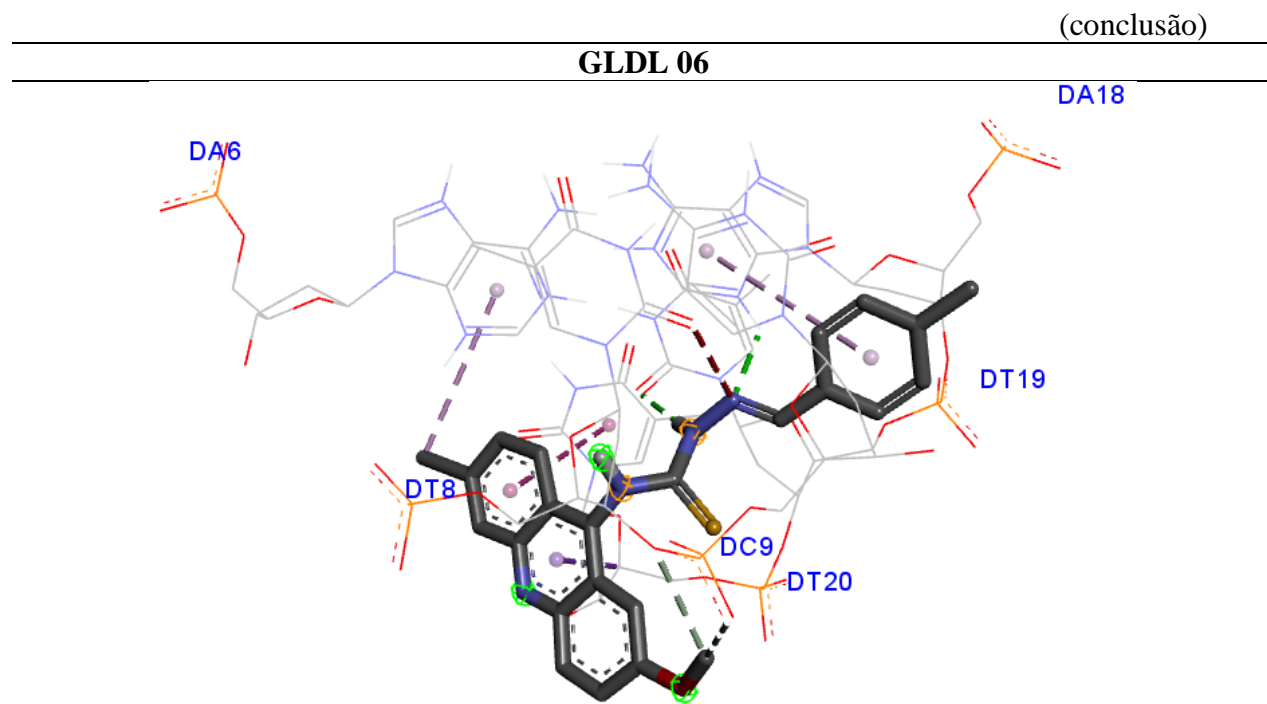
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021

Para uma melhor visualização destes resultados, a seguir estão as imagens das interações 2D e 3D realizadas pelos compostos analisados no DNA (PDB ID 1BNA).

Figura 13 – Imagens em 3D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1BNA)



(continua)

Figura 13 – Imagens em 3D das interações dos compostos no DNA (PDB ID 1BNA)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através das informações citadas acima, é possível observar que todos os compostos realizaram ligações de hidrogênio convencional, sendo que, o GLDL 06, GLDL 07 e o etoposídeo apresentaram interações semelhantes com desoxiadenosina 18, variando apenas a distância dessas ligações de hidrogênio convencional. Além disso, observou-se que o GLDL 06, a amsacrina e o etoposídeo também interagiram com o DNA através de ligação carbono-hidrogênio, entretanto, com resíduos distintos.

Como já foi visto anteriormente, o composto que obteve um resultado mais promissor para o DNA (PDB ID 1BNA) foi o GLDL 06 com ΔG $-11.95 \text{ Kcal mol}^{-1}$, K_i 1.75 nM e LE $-0,398 \text{ Kcal mol}^{-1}$, seguido da amsacrina que apresentou ΔG $-11.13 \text{ Kcal mol}^{-1}$, K_i 6.96 nM e LE $-0,397 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Analisando o *docking* molecular desses dois compostos pode-se verificar seis tipos de interações para cada uma das moléculas. Contudo, o GLDL 06 apresenta oito interações com aminoácidos distintos, já a amsacrina apresenta sete interações com aminoácidos distintos.

5.2.2 Interações dos compostos com o complexo Topo/DNA

O complexo topoisomerase/DNA é um alvo para o tratamento de câncer bastante importante. Segundo a literatura, a topoisomerase II α apresentam-se indispensável para sobrevivência das células em proliferação.

Na tabela a seguir estão descritos todos os valores encontrados para a série GLDL e para os controles no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK).

Tabela 6 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (K_i) e eficiência de ligação (LE) dos compostos no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK)

Compostos	ΔG^a	PDB ID 5GWK	
		K_i^b	LE ^a
GLDL 06	-9,99	47,91	-0,333
GLDL 07	-10,34	26,4	-0,344
AMSACRINA	-10,71	14,22	-0,382
ETOPOSÍDEO	-11,61	3,11	-0,276
LIGANTE	-11,61	3,11	-0,276

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: ^a ΔG e LE medido em Kcal mol⁻¹;

^b K_i em nM.

O complexo 5GWK apresenta como ligante co-cristalizado no alvo, o etoposídeo, por este motivo que o resultado de ΔG e K_i do ligante e do etoposídeo é o mesmo, ou seja, o ligante é o próprio etoposídeo para esse alvo farmacológico.

Através da tabela 6, é possível observar que para o complexo topo/DNA, o resultado mais promissor foi do composto GLDL 07 que apresentou melhor interação e afinidade (ΔG - 10,34 Kcal mol⁻¹/ K_i 26,4 nM) quando comparado com o GLDL 06 (ΔG -9,99 Kcal mol⁻¹/ K_i 47,91 nM). Entretanto, ambos os compostos da série GLDL apresentaram uma menor afinidade e interação do que os fármacos já utilizados na clínica.

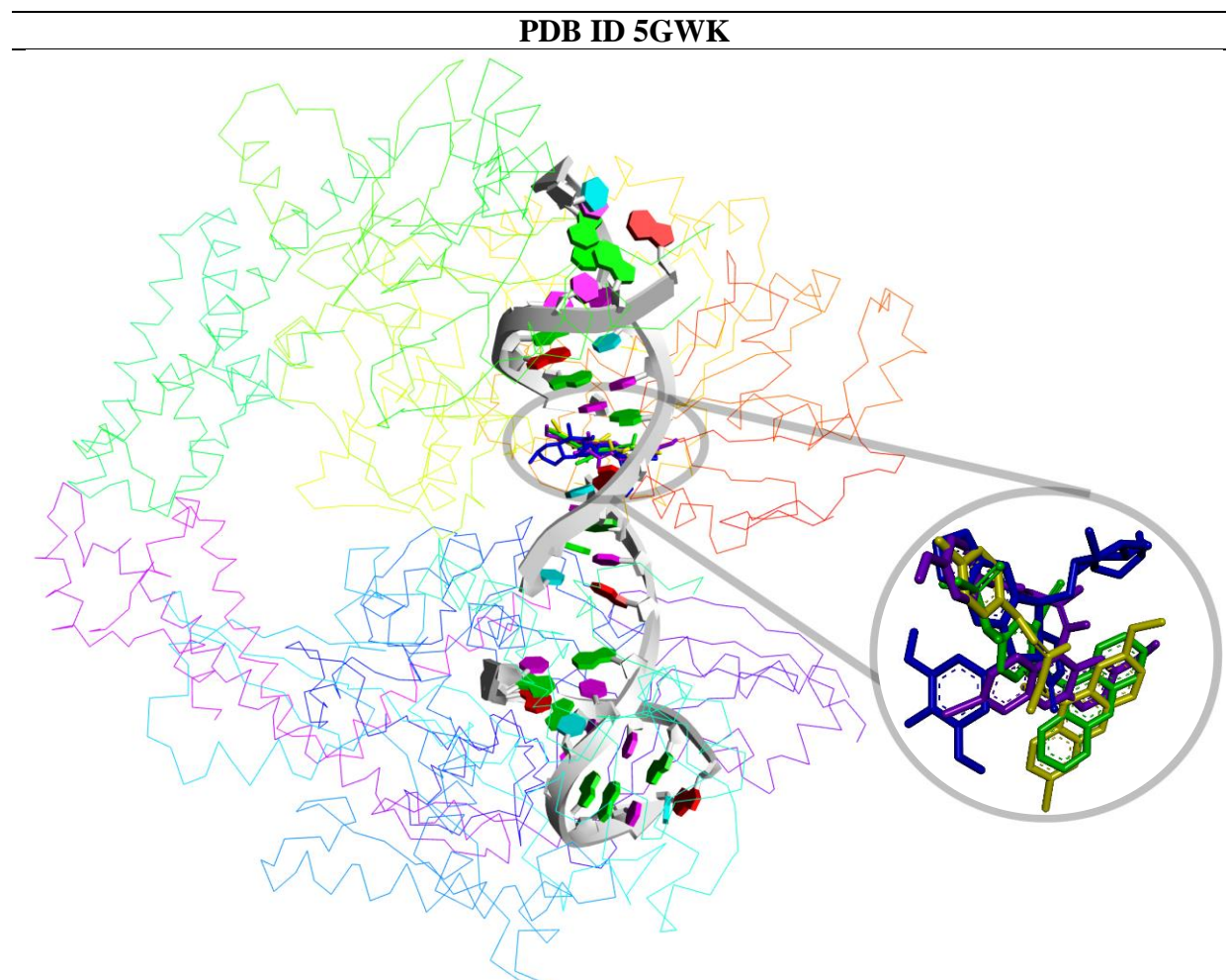
O cálculo de eficiência de ligação foi realizado de acordo com a metodologia de Murray et al., 2014. Expressar da seguinte forma:

$$\text{Eficiência de ligação (LE)} = \frac{\text{Valor de energia livre de ligação } (\Delta G)}{n^{\circ} \text{ de átomos da molécula, exceto os hidrogênios}}$$

Em que, ao analisar as fórmulas químicas dos compostos concluiu que desprezando a quantidade de átomos de hidrogênio, o composto GLDL 06 e GLDL 07 apresentaram 30 átomos isoladamente, a amsacrina apresentou 28 átomos e o etoposídeo apresentou 42 átomos.

É factível analisar que o etoposídeo apresentou melhor interação com o complexo topo/DNA (ΔG -11,61 Kcal mol⁻¹/ Ki 3,11 nM) do que a amsacrina (ΔG -10,71 Kcal mol⁻¹/ Ki 14,22 nM). Contudo, esse resultado é explicado possivelmente devido ao tamanho estrutural do etoposídeo que proporciona uma maior quantidade de interações com o alvo. Em contrapartida, ao analisar a eficiência de ligações observamos que a amsacrina apresentou um resultado mais satisfatório (-0,382 Kcal mol⁻¹) do que o etoposídeo (-0,276 Kcal mol⁻¹). Ou seja, a amsacrina apresenta uma maior energia livre de ligação para átomos isolados do que o etoposídeo, porém, devido o etoposídeo apresentar uma estrutura maior para esse estudo apresentou uma melhor energia livre de ligação como um todo. O mesmo ocorre quando se compara o etoposídeo com o GLDL 07, ou seja, o etoposídeo apresentou um resultado mais promissor de energia livre de ligação do que o GLDL 07. Entretanto, quando se analisa a eficiência de ligação é possível observar que o melhor resultado foi do GLDL 07 com -0,344 Kcal mol⁻¹ do que o etoposídeo com -0,276 Kcal mol⁻¹. Essa premissa é também explicada pelo fato de que o etoposídeo apresenta uma estrutura maior quando comparado com o GLDL 07. Logo, conclui-se que o GLDL 07 apresenta uma maior energia livre de ligação para átomos isolados do que o etoposídeo.

Na figura a seguir, é possível observar a sobreposição dos compostos no complexo topoisomerase II α /DNA e analisar a posição e localização as quais os compostos se ligam nos alvos moleculares.

Figura 14 – Ligantes sobrepostos no alvo PDB ID 5GWK

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: Azul: ligante co-cristalizado (etoposídeo); Verde: amsacrina; Amarelo: GLDL06; Roxo: GLDL07

A figura 14 mostra que o GLDL 06 (amarelo) e a amsacrina (verde) se ligaram no complexo topoisomerase/DNA de forma semelhante, dessa forma, se sobrepueram. Já o composto GLDL 07 (roxo) se ancorou no alvo em posição distinta quando comparado com o GLDL 06 e a amsacrina. Porém, essas variações foram insignificantes, visto que, as quatro moléculas se ligaram no mesmo sítio de ligação (*grid box*) e as sobreposições ficaram bem próximas.

Outra forma de se estudar como os compostos se ligam nos alvos é através da análise dos tipos de ligações realizadas, das distâncias dessas ligações e com quais resíduos ocorrem essa interação (Tabela 7).

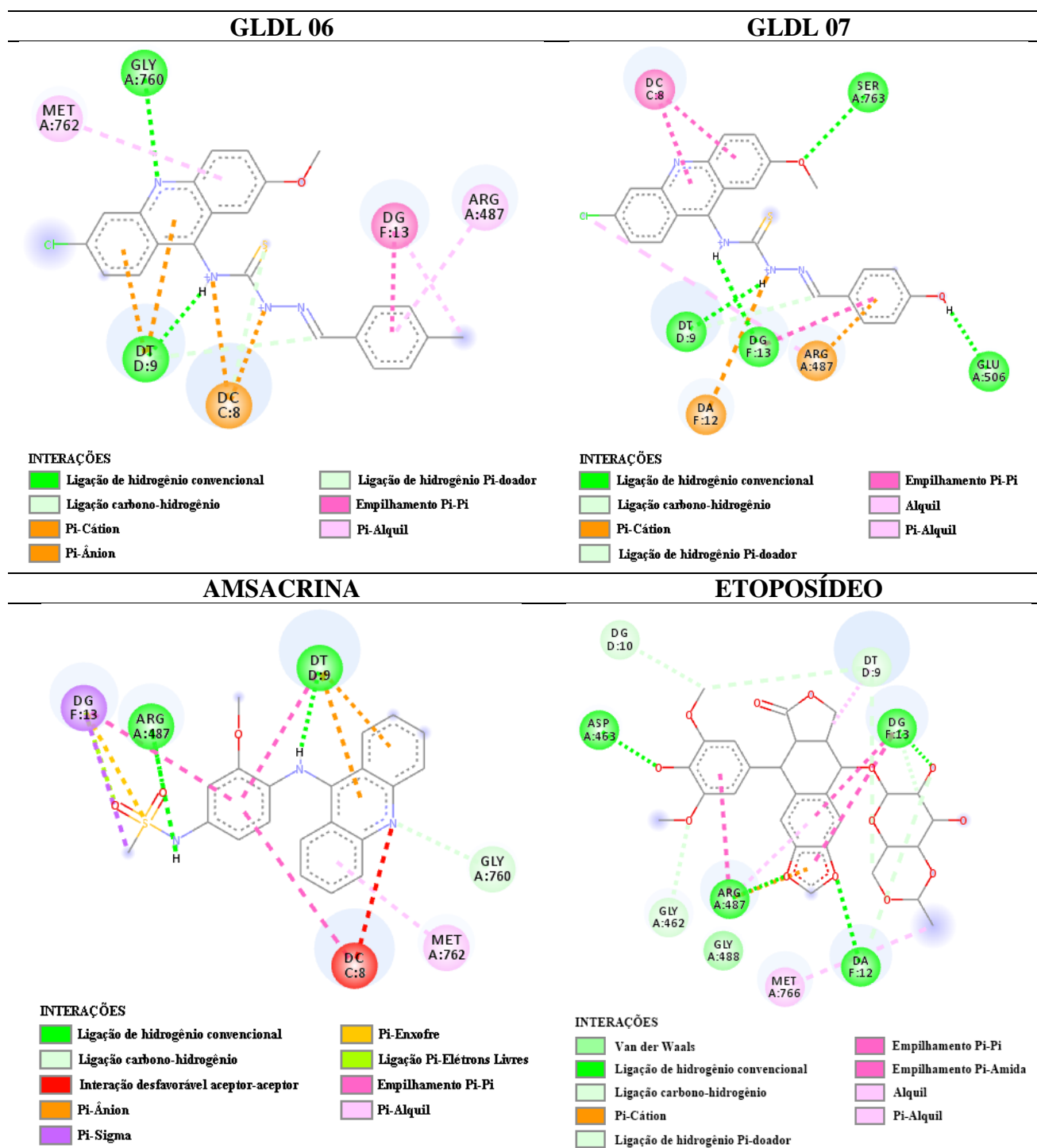
Tabela 7 – Perfil de interação dos compostos no complexo Topo/DNA (PDB ID 5GWK)

Complexo topo/DNA (PDB ID 5GWK)		
Compostos	Tipos de ligações	Resíduos (distância)
GLDL 06	Ligação de hidrogênio convencional	GLY A: 760 (3,03 Å), DT D: 9 (2,20 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DT D: 9 (3,78 Å)
	Pi-Cátion	DC C C: 8 (4,35 Å e 3,87 Å)
	Pi-Ânion	DT D: 9 (4,35 Å e 4,29 Å)
	Ligação de hidrogênio Pi-doador	DC C: 8 (3,55 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DG F: 13 (5,02 Å)
	Pi-Alquil	DG F: 13 (4,51 Å), ARG A: 487 (4,91 Å)
GLDL 07	Ligação de hidrogênio convencional	SER A: 763 (3,05 Å), GLU A: 506 (1,84 Å), DG F: 13 (2,23 Å), DT D: 9 (2,26 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DT D: 9 (3,60 Å)
	Pi-Cátion	DA F: 12 (4,09 Å), ARG A: 487 (4,98 Å)
	Ligação de hidrogênio Pi-doador	-
	Empilhamento Pi-Pi	DG F: 13 (4,69 Å), DC C: 8 (4,30 Å e 3,87 Å)
	Alquil	ARG A: 487 (4,53 Å)
	Pi-Alquil	-
AMSACRINA	Ligação de hidrogênio convencional	ARG A: 487 (3,48 Å e 2,23 Å), DT D: 9 (1,86 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	GLY A: 760 (3,46 Å)
	Interação desfavorável acceptor-acceptor	DC C: 8 (2,97 Å)
	Pi-Ânion	DT D: 9 (4,56 Å e 4,50 Å)
	Pi-Sigma	DG F: 13 (3,88 Å)
	Pi-Enxofre	DG F: 13 (4,51 Å)
	Ligação Pi-Elétrons Livres	DG F: 13 (2,91 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DC C: 8 (4,98 Å), DT D: 9 (5,47 Å), DG F: 13 (8,23 Å)
	Pi-Alquil	MET A: 762 (5,10 Å)
ETOPOSÍDEO	Van der Waals	GLY A: 488
	Ligação de hidrogênio convencional	ASP A: 463 (3,68 Å), ARG A: 487 (2,44 Å), DA F: 12 (3,01 Å), DG F: 13 (2,29 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	DG D: 10 (3,01 Å), DT D: 9 (3,17 Å e 3,80 Å), GLY A: 462 (3,02 Å), DG F: 13 (2,83 Å)
	Pi-Cátion	ARG A: 487 (4,80 Å)
	Ligação de hidrogênio Pi-doador	DA F: 12 (4,18 Å)
	Empilhamento Pi-Pi	DG F: 13 (4,57 Å; 4,45 Å)
	Empilhamento Pi-Amida	ARG A: 487 (4,50 Å)
	Alquil	MET A: 766 (4,96 Å)
	Pi-Alquil	ARG A: 487 (5,19 Å), DT D: 9 (3,93 Å)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Para uma melhor visualização destes resultados, a seguir estão as imagens das interações 2D e 3D realizadas pelos compostos analisados no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK).

Figura 15 – Imagens em 2D das interações dos compostos no complexo topoisomerase II α /DNA (PDB ID 5GWK)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através da tabela 7 e da figura 15, é possível observar que todos os compostos estudados realizaram ligações de hidrogênio convencional, no entanto, vale destacar que o GLDL 06, GLDL 07 e a amsacrina apresentaram ligação de hidrogênio convencional com desoxitimidina 9, em que, a menor distância dessa ligação foi realizada pela amsacrina (1,86 Å) seguida do

GLDL 06 (2,20 Å) e GLDL 07 (2,26 Å). É importante ressaltar que, como já descrito anteriormente, a amsacrina apresentou um resultado mais satisfatório de eficiência de ligação (-0,382 Kcal mol⁻¹), do que o GLDL 06 (-0,333 Kcal mol⁻¹) e o GLDL 07 (-0,344 Kcal mol⁻¹). Logo, possivelmente essa ligação pode ser importante para a afinidade do composto com o alvo, visto que, a menor distância de interação foi da amsacrina, bem como, resultado mais satisfatório de energia livre de ligação, constante de afinidade e eficiência de ligação quando comparado com GLDL 06 e GLDL 07 que apresentaram distâncias de ligações com este resíduo bem próximos, sendo reproduzidos também na eficiência de ligação, ou seja, também apresentaram eficiência de ligação bem similares.

Outra interação que os quatro compostos estudados realizam é a ligação carbono-hidrogênio com o desoxitimidina 9, porém, apresentam diferentes distâncias de interação como descritas na tabela acima. Em que, o etoposídeo realiza duas ligações com este resíduo apresentando distâncias de 3,17 Å e 3,80 Å, a amsacrina realiza essa interação com distância de 3,46 Å, seguidos dos compostos GLDL 07 (3,60 Å) e GLDL 06 (3,78 Å). Quando se compara a amsacrina com a série GLDL observa que novamente, a amsacrina realiza interação com uma menor distância de ligação comparado com o GLDL 06 e GLDL 07.

Além disso, os compostos ainda realizam interações do tipo Pi-cátion, Pi-ânion, ligação de hidrogênio Pi-doador, empilhamento π - π , Pi-alquil, entre outros.

Como já mostrado na figura 6, a amsacrina apresenta como espaçador o grupo amino, já os compostos GLDL apresentam como espaçador o grupo tiossemicarbazida. Desse modo, ao visualizar os resultados de *docking* molecular observamos que o grupo amino da amsacrina realiza ligação de hidrogênio com a timina D:9, bem como, o grupo tiossemicarbazida presente nos compostos GLDL 06 e GLDL 07 também interagem por ligação de hidrogênio com a timina D:9. Contudo, o grupo tiossemicarbazida do composto GLDL 07 ainda realiza ligação de hidrogênio com guanina F:13. Destacando assim, a importância de executar a técnica de bioisosterismo no planejamento desses novos compostos.

Outro ponto importante que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 apresentam é o fato de que os mesmos exibem modificações no anel acridínico quando comparados com a amsacrina. Ou seja, tanto o GLDL 06 como o GLDL 07 apresentam cloro (Cl) e metoxila (OCH₃), porém, no *docking* molecular não foram visualizados interações desses grupos do GLDL 06 com o completo Topoisomerase/DNA, diferentemente do GLDL 07 que tanto o cloro como a metoxila interagiram com a Topoisomerase nos resíduos de arginina A:487 e serina A:763, respectivamente (Figura 6).

Ao comparar apenas os compostos GLDL 06 e GLDL 07 através desses estudos *in silico* observamos que o substituinte metil (CH₃) do GLDL 06 realizou interação Pi-alquil com guanina F:13 do DNA, entretanto, o substituinte hidroxila (OH) do GLDL 07 realizou ligação de hidrogênio convencional com glutamato A:506 da Topoisomerase. Devido essas modificações nos grupos substituintes das moléculas terem gerado interações distintas, como Pi-alquil no caso do GLDL 06 e ligação de hidrogênio convencional no caso do GLDL 07 pode-se sugerir que foram modificações importantes nos grupos substituintes, visto que, o composto com o substituinte hidroxila (GLDL 07) apresentou melhor energia livre de ligação e constante de afinidade quando comparado com o composto GLDL 06 (Figura 6).

Como já citado anteriormente, a farmacocinética é um fator importante e imprescindível de analisar durante o planejamento de novas entidades químicas. Quando se fala de fármacos antitumorais é de suma importância também reforçar que a albumina sérica é um importante veículo para os fármacos penetrarem com maior facilidade em células de tumores sólidos acarretando melhores resultados terapêuticos.

5.2.3 Interações dos compostos com albumina bovina

Outro alvo bastante utilizado para os estudos de compostos promissores com atividade antitumoral é a albumina. Segundo a literatura, os tumores sólidos apresentam uma característica importante que é o acúmulo de albumina devido a problemas nos capilares combinado com um sistema linfático ausente ou deficiente.

Na tabela a seguir estão descritos todos os valores encontrados para a série GLDL e para os controles após a ancoragem molecular na albumina bovina (PDB ID 6QS9).

Tabela 8 – Energia livre de ligação (ΔG), constante de inibição (Ki) e eficiência de ligação (LE) dos compostos com albumina bovina (PDB ID 6QS9)

Compostos	ΔG^a	PDB ID 6QS9	
		Ki ^b	LE ^a
GLDL 06	-9,04	235,73	-0,301
GLDL 07	-9,42	125,37	-0,314
AMSACRINA	-10,47	21,19	-0,373
ETOPOSÍDEO	-4,71	354.600,0	-0,112
LIGANTE	-8,04	1.270,0	-0,423

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: ^a ΔG e LE medido em Kcal mol⁻¹;

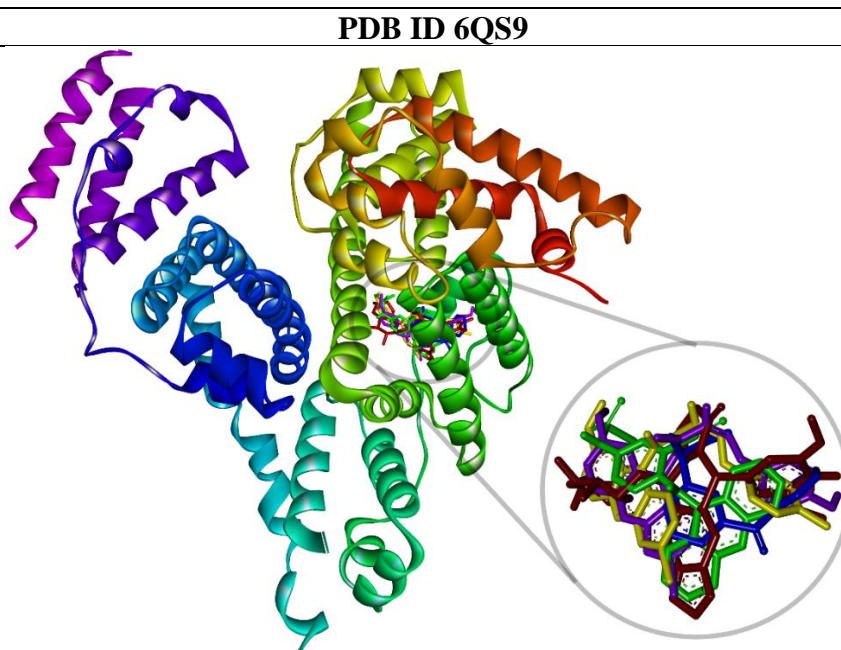
^b Ki em nM.

Através da tabela 8 é possível observar que para o alvo farmacológico (PDB ID 6QS9), o composto que apresentou melhor energia livre de ligação e constante de afinidade foi o controle positivo, amsacrina. Seguido do GLDL 07 (ΔG -9,42 Kcal mol⁻¹ / Ki 125,37 nM) e do GLDL 06 (ΔG -9,04 Kcal mol⁻¹ / Ki 235,73 nM). O ligante co-cristalizado do alvo (R-Cetoprofeno) apresentou resultados mais promissores de ΔG (-8,04 Kcal mol⁻¹) e Ki (1.270,0 nM) quando comparado com o etoposídeo (ΔG -4,71 Kcal mol⁻¹ / Ki 354.600,0 nM). Entretanto, os compostos da série GLDL se destacaram ao comparar seu resultado o etoposídeo e o cetoprofeno.

Para analisar o parâmetro de eficiência de ligação (LE) é imprescindível ressaltar, como já mencionado anteriormente, que desprezando a quantidade de átomos de hidrogênio, o composto GLDL 06 e GLDL 07 apresentam 30 átomos isoladamente, a amsacrina apresenta 28 átomos, etoposídeo apresenta 42 átomos e o cetoprofeno apresenta 19 átomos. Logo, o que é possível observar é que o composto que apresentou melhor eficiência de ligação foi o cetoprofeno com o valor de -0,423 Kcal mol⁻¹, o que difere dos resultados de energia livre de ligação e constante de afinidade. Entretanto, para os demais compostos analisados a eficiência de ligação foi equivalente a energia livre de ligação e constante de afinidade.

Na figura a seguir, é possível observar a sobreposição dos compostos na albumina bovina e analisar a posição e localização as quais os compostos se ligam nos alvos moleculares.

Figura 16 – Ligantes sobrepostos no alvo PDB ID 6QS9



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: Azul: ligante co-cristalizado; Verde: amsacrina; Vermelho: etoposídeo; Amarelo: GLDL06; Roxo: GLDL07.

A figura 16 mostra que o GLDL 06 (amarelo) e o GLDL 07 (roxo) apresentam o anel acridínico posicionado de forma bem similar. Diferentemente do que ocorre com a amsacrina (verde) que se ancorou na albumina bovina em posição distinta dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos. Porém, essas variações foram insignificantes, visto que, as quatro moléculas se ligaram no mesmo espaço de busca (*grid box*).

Outra forma de se estudar como os compostos se ligam nos alvos é através da análise dos tipos de ligações realizadas, das distâncias dessas ligações e com quais resíduos ocorrem essa interação (Tabela 9).

Tabela 9 – Perfil de interação dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)

Albumina bovina (PDB ID 6QS9)		
Compostos	Tipos de ligações	Resíduos
GLDL 06	Ligação de hidrogênio convencional	ARG B: 217 (2,17 Å), ARG B: 194 (2,16 Å), ARG B: 256 (2,79 Å; 4,92 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	SER B: 191 (3,67 Å)
	Interação desfavorável positivo-positivo	ARG B: 198 (3,71 Å; 4,28 Å), HIS B: 241 (4,74 Å; 3,59 Å), ARG B: 256 (5,50 Å; 4,19 Å)
	Pi-Ânion	GLU B: 291 (4,80 Å)
	Pi-Sigma	ALA B: 290 (3,94 Å; 3,80 Å)
	Pi-Enxofre	TYR B: 149 (4,68 Å)
	Alquil	ALA B: 260 (3,66 Å), ILE B: 263 (3,83 Å), LEU B: 259 (4,50 Å), ILE B: 289 (3,76 Å), ARG B: 217 (4,79 Å), LYS B: 221 (3,60 Å), LEU B: 218 (4,38 Å)
	Pi-Alquil	ILE B: 289 (4,85 Å), ALA B: 290 (5,04 Å; 4,92 Å), ARG B: 217 (4,92 Å), PHE B: 222 (5,17 Å), LEU B: 259 (5,43 Å), ARG B: 194 (3,37 Å)
GLDL 07	Ligação de hidrogênio convencional	ARG B: 217 (4,47 Å), ARG B: 198 (2,04 Å), ARG B: 256 (4,59 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	SER B: 191 (3,59 Å), ARG B: 194 (3,14 Å)
	Interação desfavorável positivo-positivo	ARG B: 198 (4,89 Å; 4,57 Å), HIS B: 241 (4,60 Å; 3,05 Å), ARG B: 256 (4,68 Å; 5,00 Å)
	Pi-Cátion	ARG B: 198 (3,89 Å)
	Pi-Sigma	ALA B: 290 (3,60 Å)
	Pi-Enxofre	TRP B: 213 (4,49 Å)
	Alquil	LYS B: 221 (3,19 Å), LEU B: 218 (4,29 Å)
	Pi-Alquil	ILE B: 289 (4,72 Å), ALA B: 290 (5,11 Å; 4,81 Å; 3,77 Å), ARG B: 217 (5,33 Å), PHE B: 222 (4,59 Å), ALA B: 260 (4,78 Å)
AMSACRINA	Ligação de hidrogênio convencional	ARG B: 194 (2,03 Å), ARG B: 198 (1,90 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	-
	Interação desfavorável doador-doador	ARG B: 198 (1,63 Å)
	Pi-Cátion	ARG B: 198 (3,80 Å)

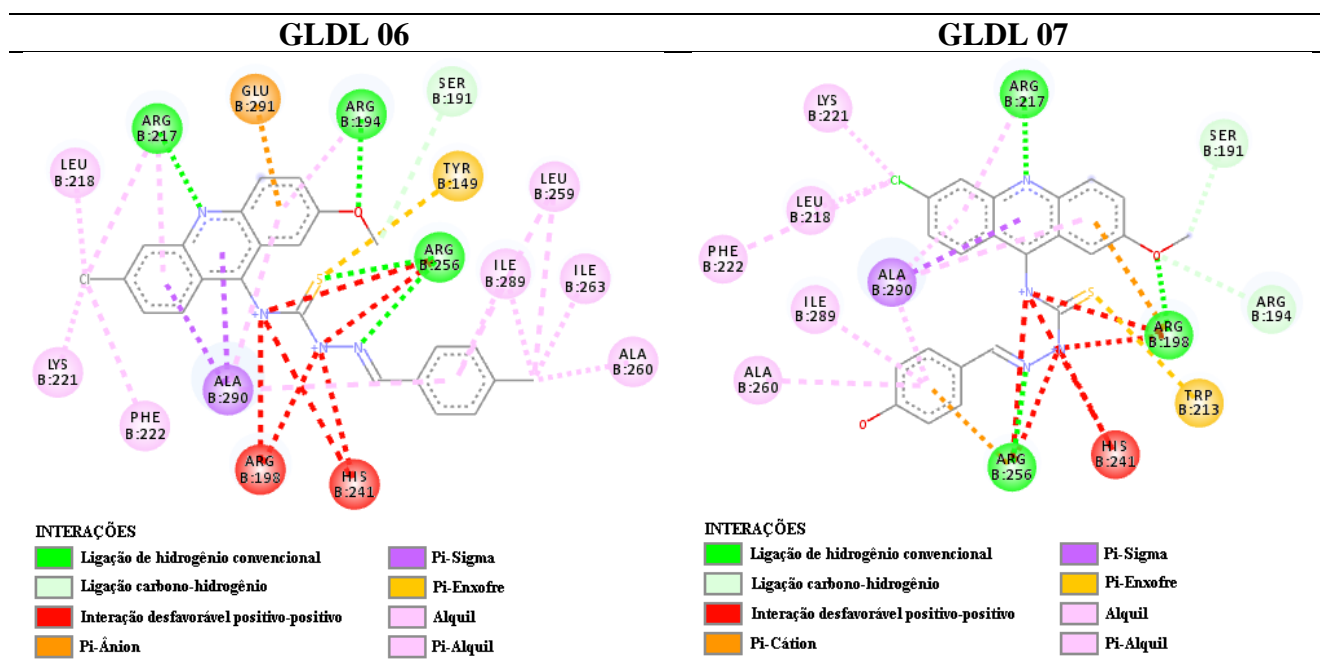
(continua)

Tabela 9 – Perfil de interação dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)

Compostos	Albumina bovina (PDB ID 6QS9)	
	Tipos de ligações	Resíduos
	Pi-Pi em forma de T	TRP B: 213 (5,68 Å)
Pi-Alquil	ILE B: 289 (5,49 Å), ALA B: 290 (4,24 Å; 4,91 Å; 4,22 Å; 4,91 Å), LYS B: 221 (4,53 Å), LEU B: 218 (4,86 Å), LEU B: 237 (4,66 Å; 5,40 Å)	
ETOPOSÍDEO	Ligação de hidrogênio convencional	ARG B: 217 (1,85 Å), ARG B: 256 (2,86 Å), ARG B: 198 (2,70 Å), HIS B: 241 (1,95 Å), ALA B: 260 (2,80 Å)
	Ligação carbono-hidrogênio	ARG B: 194 (2,73 Å)
	Interação desfavorável aceptor-aceptor	GLU B: 291 (2,73 Å), SER B: 286 (2,64 Å), ARG B: 256 (2,92 Å)
	Pi-Cátion	ARG B: 256 (4,82 Å)
	Pi-Sigma	ALA B: 290 (3,62 Å)
	Alquil	ALA B: 290 (3,85 Å)
	Pi-Alquil	LYS B: 221 (3,77 Å), LEU B: 218 (4,67 Å; 5,24 Å), LEU B: 259 (5,11 Å), LEU B: 237 (5,29 Å), HIS B: 241 (5,45 Å), TYR B: 149 (5,22 Å)

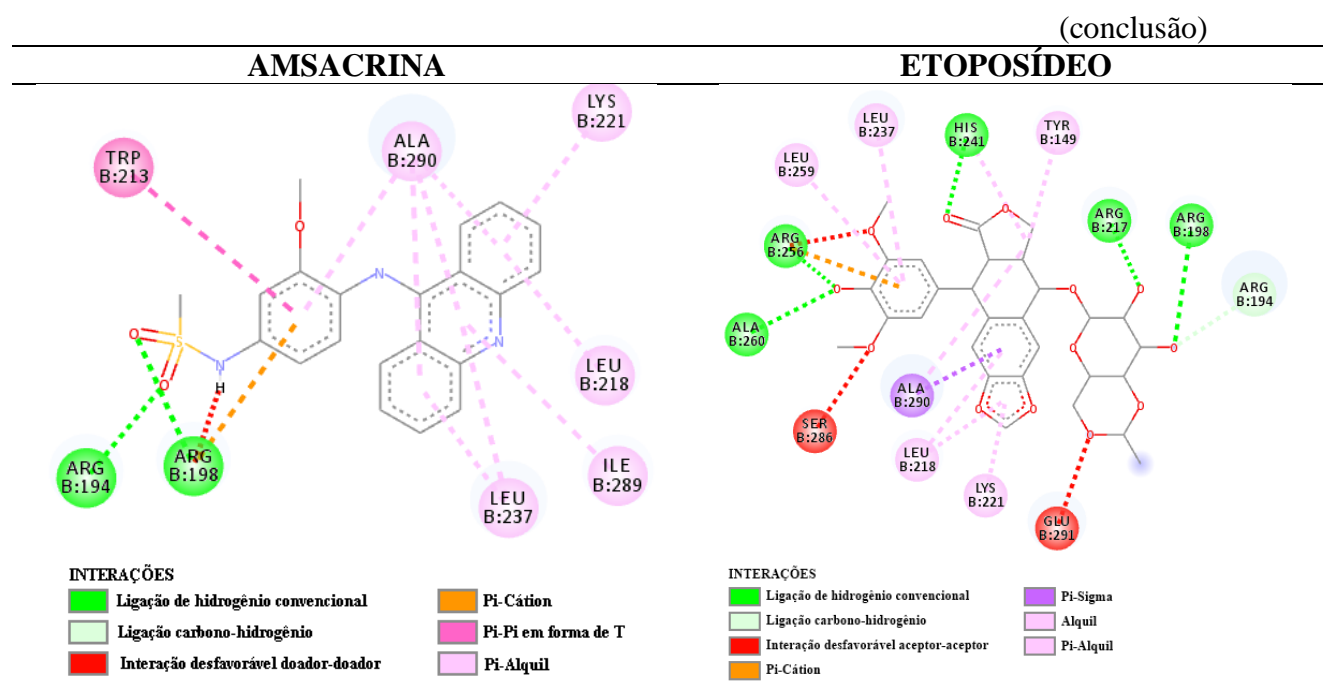
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Para uma melhor visualização destes resultados, a seguir estão as imagens das interações 2D e 3D realizadas pelos compostos analisados na albumina bovina (PDB ID 6QS9).

Figura 17 – Imagens em 2D das interações dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)

(continua)

Figura 17 – Imagens em 2D das interações dos compostos na albumina bovina (PDB ID 6QS9)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através dos resultados de docagem obtidos, como visto na tabela 9 e figura 17 acima, os compostos apresentaram perfis interessantes de serem avaliados. Todos os quatro compostos estudados (GLDL 06, GLDL 07, amsacrina e etoposídeo) realizaram ligações de hidrogênio convencional, ligação carbono-hidrogênio e Pi-alkil.

O composto GLDL 06 apresentou 4 ligações de hidrogênio convencional, enquanto que o GLDL 07 apresentou 3 ligações de hidrogênio convencional, a amsacrina realizou 2 ligações de hidrogênio e o etoposídeo exibiu 5 ligações de hidrogênio convencional. Analisando ainda esse tipo de ligação é possível observar que os compostos interagiram com a arginina B: 256, exceto a amsacrina. O GLDL 06, GLDL 07 e o etoposídeo realizaram interação com arginina B: 217. O GLDL 07, amsacrina e o etoposídeo interagiram com arginina B: 198. Já a ligação de hidrogênio convencional com arginina B: 194 só é encontrada na molécula GLDL 06 e amsacrina com distância de interação de 2,16 Å e 2,03 Å, respectivamente.

Para a ligação carbono-hidrogênio é possível observar que o GLDL 06 e o etoposídeo realizaram apenas 1 ligação, já o GLDL 07 realizou 2 ligações. Contudo, tanto o GLDL 06 como o GLDL 07 realizam interações com serina B: 191 com distâncias de 3,67 Å e 3,59 Å, respectivamente.

Como já discutido anteriormente, para a albumina bovina, os compostos que apresentaram melhor interação e afinidade foram a amsacrina seguido do GLDL 07.

Curiosamente entre os compostos envolvidos no estudo foram os únicos que realizaram ligação Pi-cátion com arginina B: 198, em que, a amsacrina obteve uma interação mais forte com distância de ligação de 3,80 Å e o composto GLDL 07 apresentou uma interação mais fraca com distância de ligação de 3,89 Å.

A interação Pi-sigma com alanina B: 290 é encontrada nos compostos GLDL 06, GLDL 07 e etoposídeo. Em que, o GLDL 06 realiza duas interações e o GLDL 07, bem como, o etoposídeo realizam apenas uma ligação.

Além disso, é possível observar que todos os compostos realizam ligações do tipo Pi-alquil. Em que, o GLDL 06, GLDL 07 e amsacrina interagem com isoleucina B: 289 e alanina B: 290. Todavia, apenas o GLDL 06 e GLDL 07 interagem com arginina B: 217 e fenilalanina B: 222.

Por fim, como já mostrado na figura 6, a amsacrina apresenta como espaçador o grupo amino, já os compostos GLDL apresentam como espaçador o grupo tiossemicarbazida. Desse modo, ao visualizar os resultados de *docking* molecular observamos que o grupo amino da amsacrina não realiza interações com a albumina bovina, entretanto, o grupo tiossemicarbazida presente nos compostos GLDL 06 e GLDL 07 exibiram 6 interações desfavoráveis positivo-positivo com os aminoácidos arginina B: 198, arginina B: 256 e histidina B: 241. Logo, essa porção não foi favorável a interação com a albumina. Decorrente, possivelmente, do perfil mais hidrofílico dessa parte da molécula, em que, apresenta menor afinidade com albumina bovina. Observamos, por exemplo, o etoposídeo que é uma molécula de caráter hidrofílico e apresenta uma menor interação e afinidade do que os outros compostos envolvidos na análise. Assim, esses resultados podem corroborar na explicação da variação de energia livre de ligação e constante de afinidade entre os compostos, em que, a amsacrina apresentou melhor ΔG e K_i quando comparado com o GLDL 06 e GLDL 07.

5.3 Estudo de dinâmica molecular

No estudo da DM podemos analisar, primeiramente, o desvio de todo o sistema para se identificar a estabilidade da simulação, incluindo alvo biológico, ligantes e interferências da água, pressão, temperatura e íons. Analisa-se, também, de forma específica: i) como se comporta a movimentação do alvo biológico (RMSD) ao longo do tempo, ii) a movimentação dos ligantes (RMSD) ao longo do tempo, iii) o desvio dos pares de base e/ou aminoácidos do alvo (RMSF) ao longo do tempo, e iv) as ligações de hidrogênio realizadas entre o alvo

biológico e o ligante avaliado ao longo do tempo. Os gráficos resultantes ajudam a compreender como ocorre a formação do complexo ao longo do tempo e sua estabilidade.

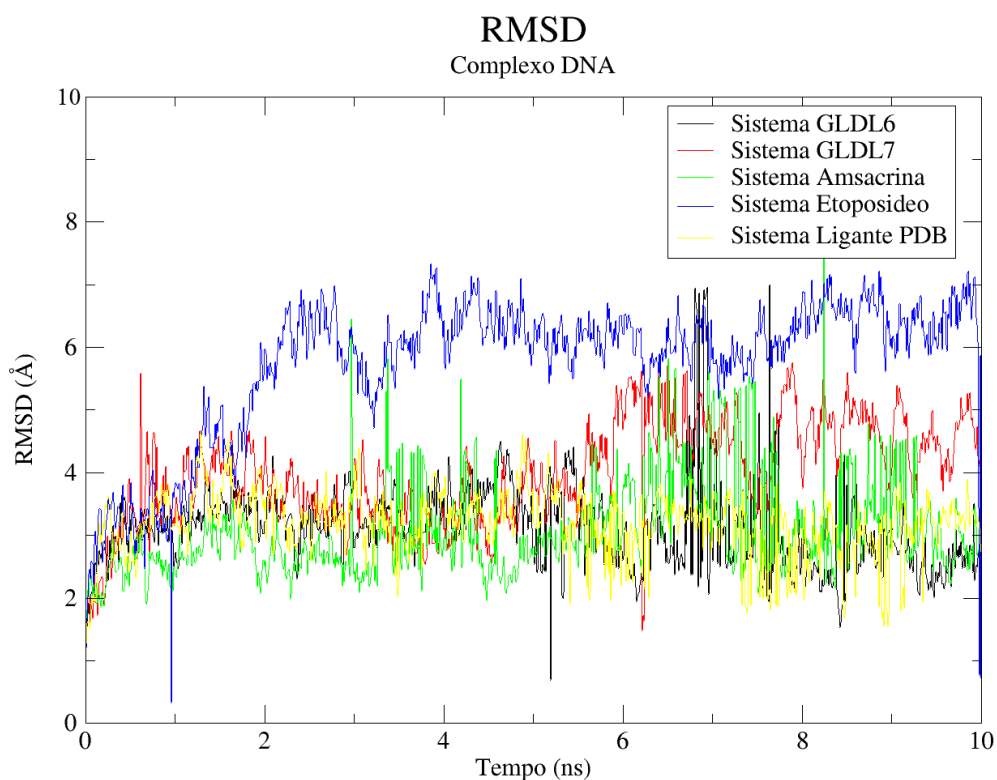
5.3.1 Dinâmica molecular no Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Um dos parâmetros mais amplamente utilizados nas simulações DM é o *Root Mean Square Deviation* (RMSD) ou simplesmente, raiz quadrada do desvio quadrático médio. O RMSD para DM reflete o deslocamento médio dos átomos e seu uso nos permite determinar a estabilização estrutural na escala de tempo do período de simulação (MARTÍNEZ, 2015; SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017).

Para o complexo formado entre DNA e ligante (PDB ID 1G3X), o RMSD do sistema demonstrou uma otimização completa da espinha dorsal do DNA antes de 1,0 ns (apêndice D) sem mudança significativa de conformação até 10 ns. Este fato indica que o tempo das simulações foi suficiente para o refinamento, ou seja, para a estabilização de todas as estruturas no período analisado (MALININA et al., 2002).

Na figura 18 a seguir, é possível observar os desvios do próprio DNA.

Figura 18 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para o DNA em diferentes sistemas

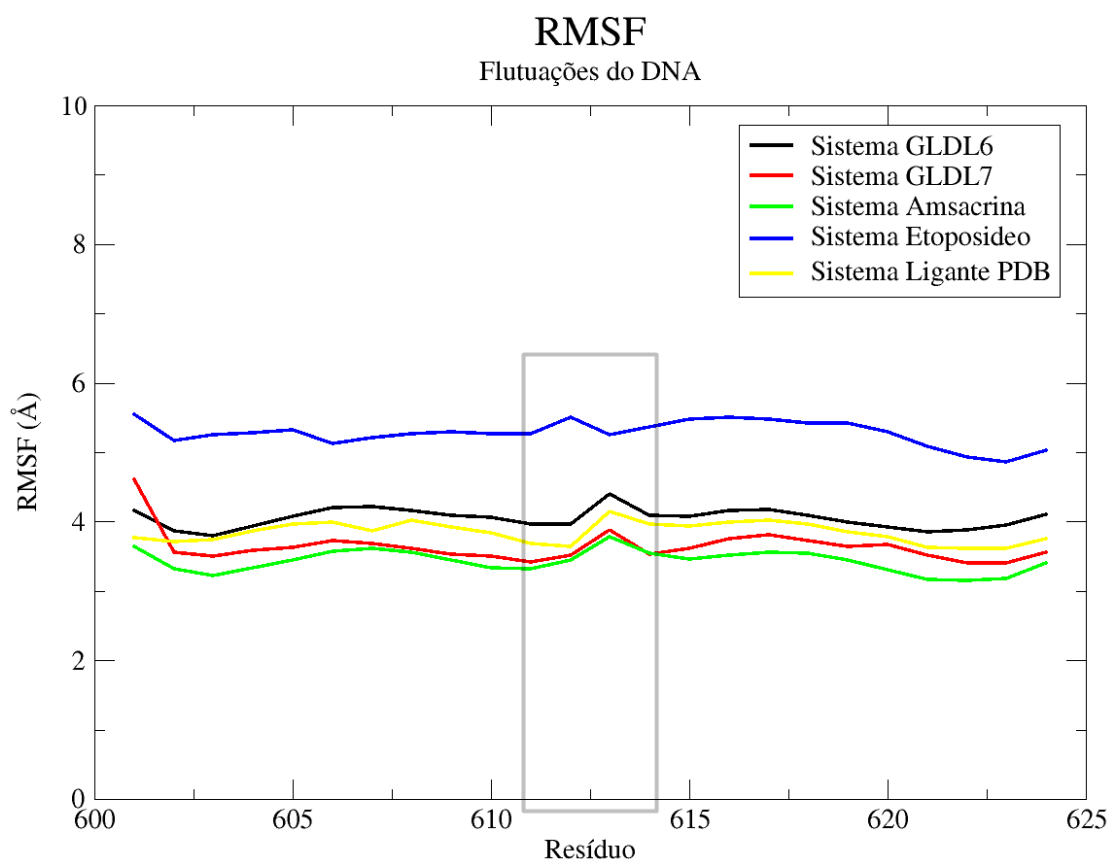


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Identificou-se que houveram grandes desvios estruturais durante a simulação de 10 ns, que se deve as extremidades da pequena dupla hélice do DNA ao apresentarem maior movimentação. Neste caso, o RMSD para os 5 sistemas estudados demonstrou um desvio médio entre 1 - 8 Å (Figura 18). Estas movimentações não afetaram a afinidade do complexo ligante-DNA, em que, o ligante permanece ancorado à estrutura até 10 ns.

O *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), ou simplesmente, raiz quadrada da flutuação quadrática média mede o desvio médio de cada partícula ao longo do tempo a partir de uma posição de referência. Ou seja, é responsável por mostrar as flutuações do movimento para cada resíduo do alvo analisado. A seguir, observa-se o RMSF dos resíduos do DNA nos diferentes sistemas:

Figura 19 – RMSF da simulação de dinâmica molecular do DNA em diferentes sistemas



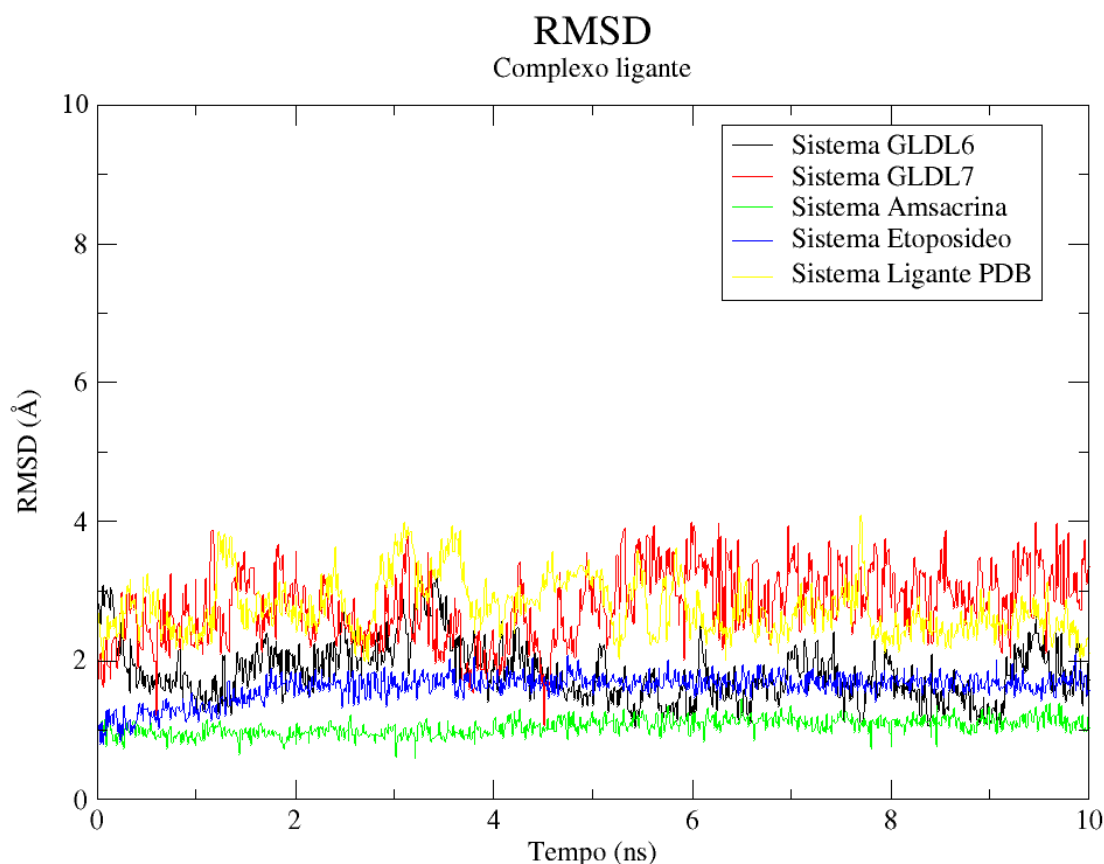
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota-se que entre as porções 612 e 613, região do sítio de ligação, demonstra a acentuação de um pequeno pico devido à interferência dos ligantes nesta região do sítio (Figura 19). Tais flutuações dos pares de base para o DNA foram bem similares entre os 4 sistemas avaliados (3 – 4 Å), o que demonstra similaridade de acoplamento, exceto para o sistema com

o ligante etoposídeo (aproximadamente 6 Å). Pode-se constatar que o etoposídeo não é um agente intercalante de DNA, mas apenas um inibidor da topoisomerase, o que explica os dados obtidos.

Na figura seguinte é possível observar os desvios de cada ligante imerso nos sistemas. Em outras palavras, a figura 20 demonstra o quanto cada composto se movimentou no sítio de ligação do DNA.

Figura 20 – RMSD da simulação de dinâmica molecular do ligante em diferentes sistemas

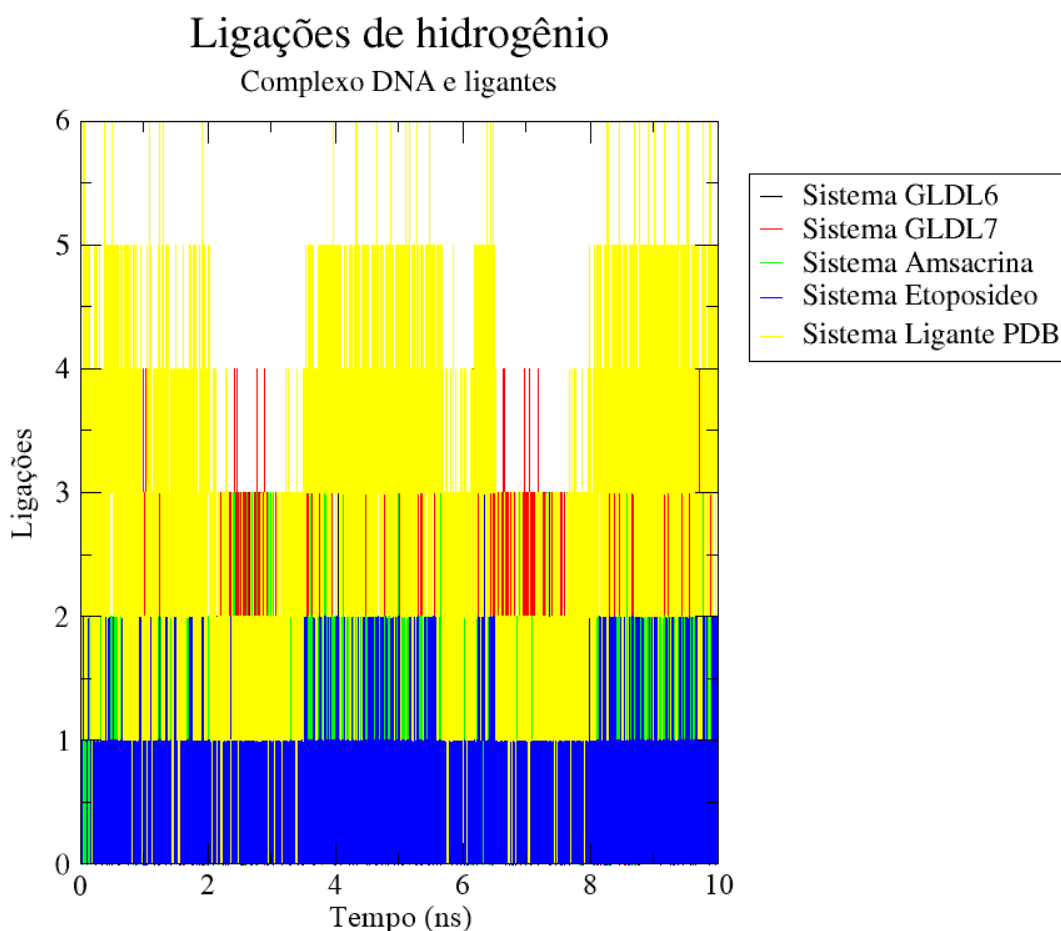


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

O desvio demonstrou pouca movimentação dos ligantes no sítio de ligação. Observa-se que após 1 ns todos os compostos se estabilizaram no sítio de ligação, com desvio entre 1 - 4 Å (Figura 20). A amsacrina apresentou o menor desvio, seguido pelo GLDL 06, etoposídeo, ligante PDB e GLDL 07. Esse maior desvio para o GLDL 07 e ligante PDB pode ser compreendido pelas trocas de ligações de hidrogênio, que hora faz 4 e 6, respectivamente, e em seguida se perde 1 ligação de hidrogênio (Figura 21) para ambos.

A figura 21 revela a quantidade de ligações de hidrogênio que cada composto realiza com o DNA por nanossegundos (ns).

Figura 21 – Ligações de hidrogênio existentes entre os ligantes e o DNA em diferentes sistemas



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Na figura 21 podemos observar a formação de várias ligações de hidrogênio entre os pares de base do sítio de ligação com os compostos analisados. Destaca-se até 6 ligações de hidrogênio para o ligante PDB, 4 ligações de hidrogênio para GLDL 07, 3 ligações de hidrogênio para amsacrina e GLDL 06 e até 2 ligações de hidrogênio para o etoposídeo.

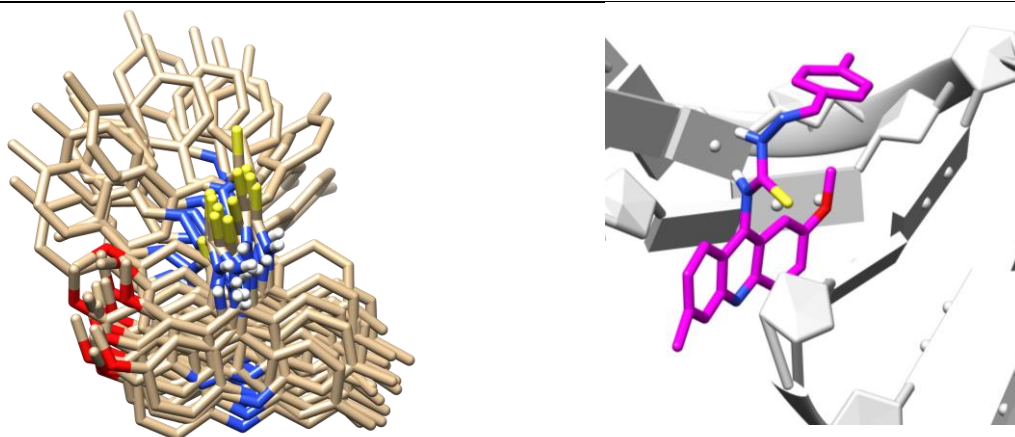
Esse resultado difere um pouco do encontrado no *docking* molecular, pois, no processo de docagem, o composto GLDL 06 apresentou uma melhor energia livre de ligação e constante de afinidade, em contra partida, na dinâmica, o GLDL 07 realizou uma ligação de hidrogênio a mais que o GLDL 06. Porém, observamos através da figura 20 que o composto GLDL 06 se apresentou mais estabilizado no alvo. Bem como, o DNA também se manteve melhor estabilizado no sistema que apresentava o composto GLDL 06 como ligante.

A seguir, é possível visualizar poses por nanossegundos dos compostos estudados no sítio de ligação (Figura 22). Os ensaios por DM mostraram que os compostos GLDL 06 e GLDL

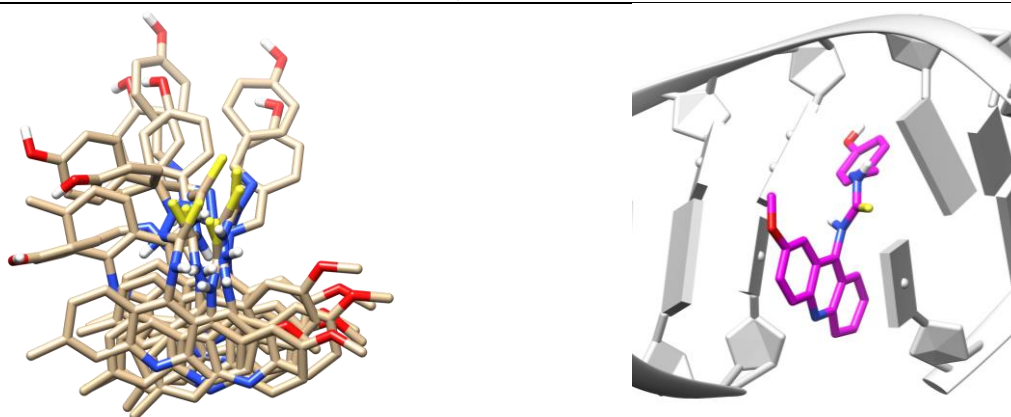
07 se orientam de forma semelhante aos inibidores amsacrina e etoposídeo, mimetizando interações importantes para a atividade.

Figura 22 – Comportamento dos compostos no sítio de ligação (PDB ID 1G3X). A) GLDL 06. B) GLDL 07. C) amsacrina. D) etoposídeo E) ligante co-cristalizado

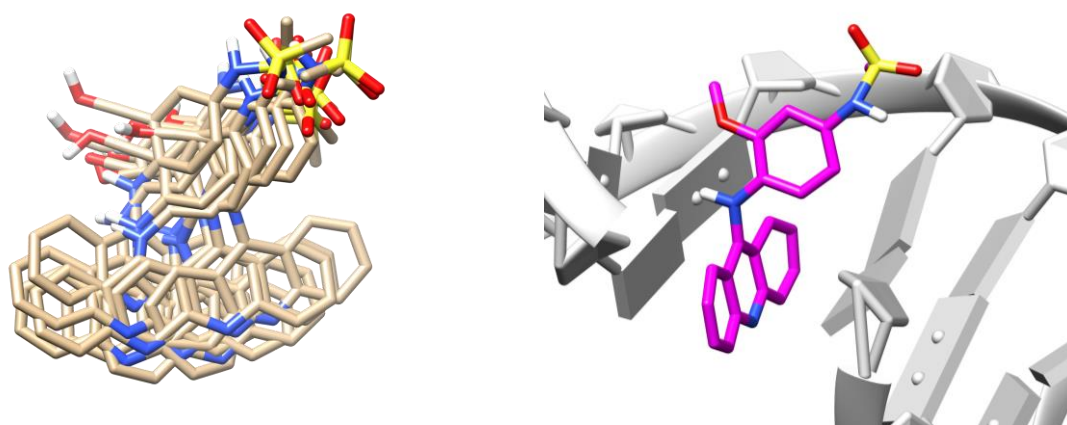
A) GLDL 06



B) GLDL 07



C) AMSACRINA

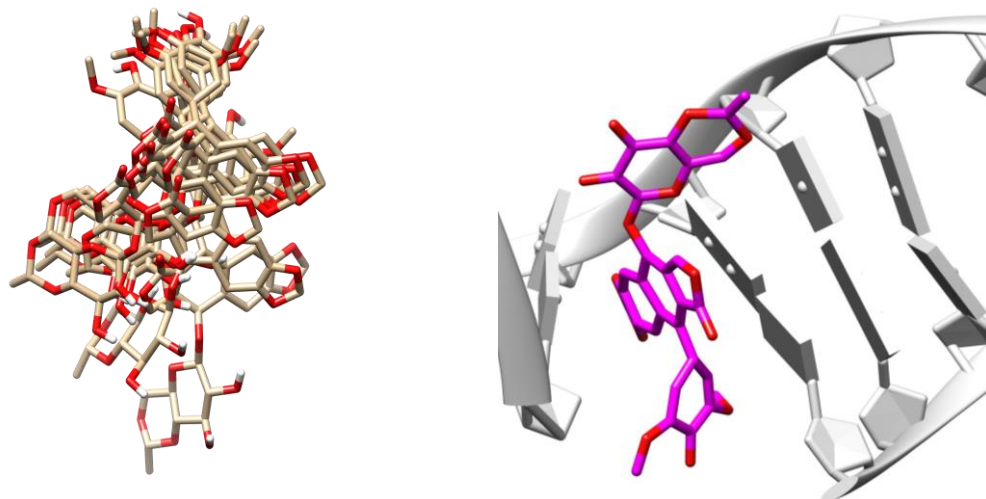


(continua)

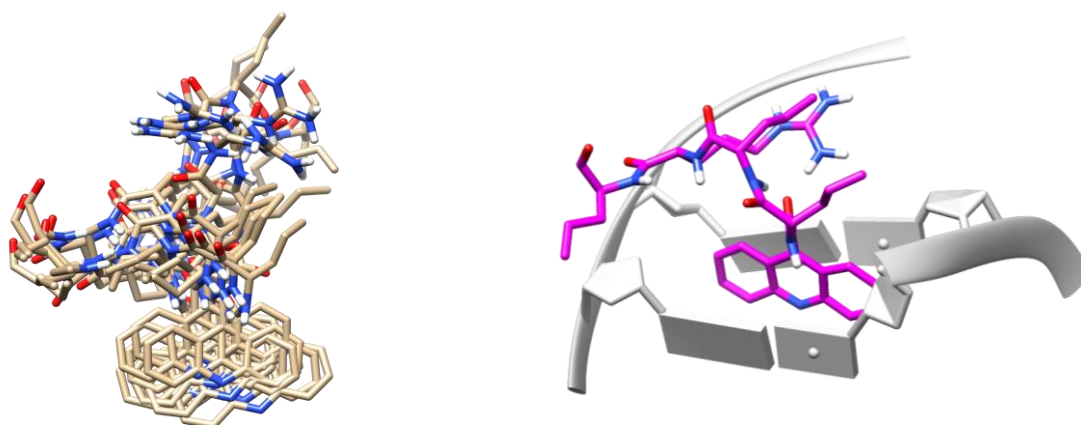
Figura 22 – Comportamento dos compostos no sítio de ligação (PDB ID 1G3X). A) GLDL 06. B) GLDL 07. C) amsacrina. D) etoposídeo E) ligante co-cristalizado

(conclusão)

D) ETOPOSÍDEO



LIGANTE CO-CRISTALIZADO NO ALVO



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: As conformações, por nanossegundos, dos ligantes está mostrado na esquerda.

Na direita a figura representa o sítio de ligação do DNA com o ligante acoplado na última conformação da simulação: na coloração cinza é DNA e em rosa destaca-se o ligante.

Adicionalmente, observa-se que o GLDL 06 e GLDL 07 apresentam posicionamentos semelhantes ao inibidor PDB, amsacrina e etoposídeo, com pouca movimentação no sítio de ligação. Desta forma, a presença do grupo acridina nestes compostos favorece a estabilidade de interação com os pares de base do DNA (Figura 22). Observa-se que a porção acridínica permanece acoplada ao sistema por meio de intercalação de pares de base no sítio de ligação, fornecendo pontos aceitadores de ligação de hidrogênio com os pares de base do sítio de ligação (Figura 21).

A maior quantidade de ligação de hidrogênio com o ligante PDB se dá devido à presença muitos grupos oxigenados e nitrogenados. Já para os compostos do nosso estudo, o GLDL 07 apresenta 1 ligação de hidrogênio a mais que o composto GLDL 06. Esse fato se evidencia pela presença do grupo 4-hidroxi-benzilideno acoplado ao grupamento tiossemicarbazida na estrutura do GLDL 07, que auxilia na formação de mais uma ligação de hidrogênio. Sabe-se que as ligações de hidrogênio são as interações intermoleculares mais fortes. Sua importância surge da grande diferença de eletronegatividade entre os elementos orgânicos (ALKORTA, 1998). Esta característica pode indicar o composto GLDL 07 como o que apresenta maior interação com o DNA comparado com o GLDL 06.

Para o GLDL 06 observa-se que a porção 4-metil-benzilideno acoplado ao grupamento tiossemicarbazida é a de maior movimentação, mas tais movimentos não apresentam grandes desvios no sítio (Figura 22). O ligante GLDL 06 se estabiliza com 2 ligações de hidrogênio com o DNA, realizando ao máximo 3. Dessa forma, é possível que o GLDL 06 apresente menor interação com o alvo quando comparado ao GLDL 07.

Nossos resultados corroboram com os obtidos previamente em literatura. Zeferino et al. (2020) identificou que a presença de interações hidrofóbicas com pares de base do DNA é importante para manutenção dos compostos no sítio de ligação.

A presença de múltiplos anéis aromáticos permite interações de empilhamento Pi com os nucleotídeos, que são a principal força motriz no modo de ligação de intercalação. A ligação por intercalação induz mudanças conformacionais nas estruturas de DNA, incluindo a abertura de uma lacuna entre as bases e um alongamento e desenrolamento da torção helicoidal. Essas mudanças estruturais afetam as funções biológicas do DNA, incluindo a inibição dos processos de transcrição, replicação e reparo do DNA, tornando os intercaladores potentes mutagênicos e potenciais drogas antitumorais (GILAD; SENDEROWITZ, 2014).

Outras interações que contribuem para a formação de complexos entre o DNA e compostos intercaladores são van der Waals, ligações de hidrogênio e interações de transferência de carga (GILAD; SENDEROWITZ, 2014; GOUVEIA et al., 2018).

5.3.2 Dinâmica molecular no complexo Topoisomerase II α / DNA

Através da dinâmica molecular realizada no complexo Topoisomerase-DNA (PDB ID 5GWK), observa-se que não há grande diferença entre a pose sugerida pelo *docking* e a pose final do ligante após a simulação de 10 ns na dinâmica molecular. A afinidade do complexo de ligação da proteína e os compostos apresentaram longo tempo de residência, em que, o ligante

não desacopla após a simulação (Apêndice E). Desta forma, destaca-se que os compostos se mantiveram estáveis ao longo do tempo.

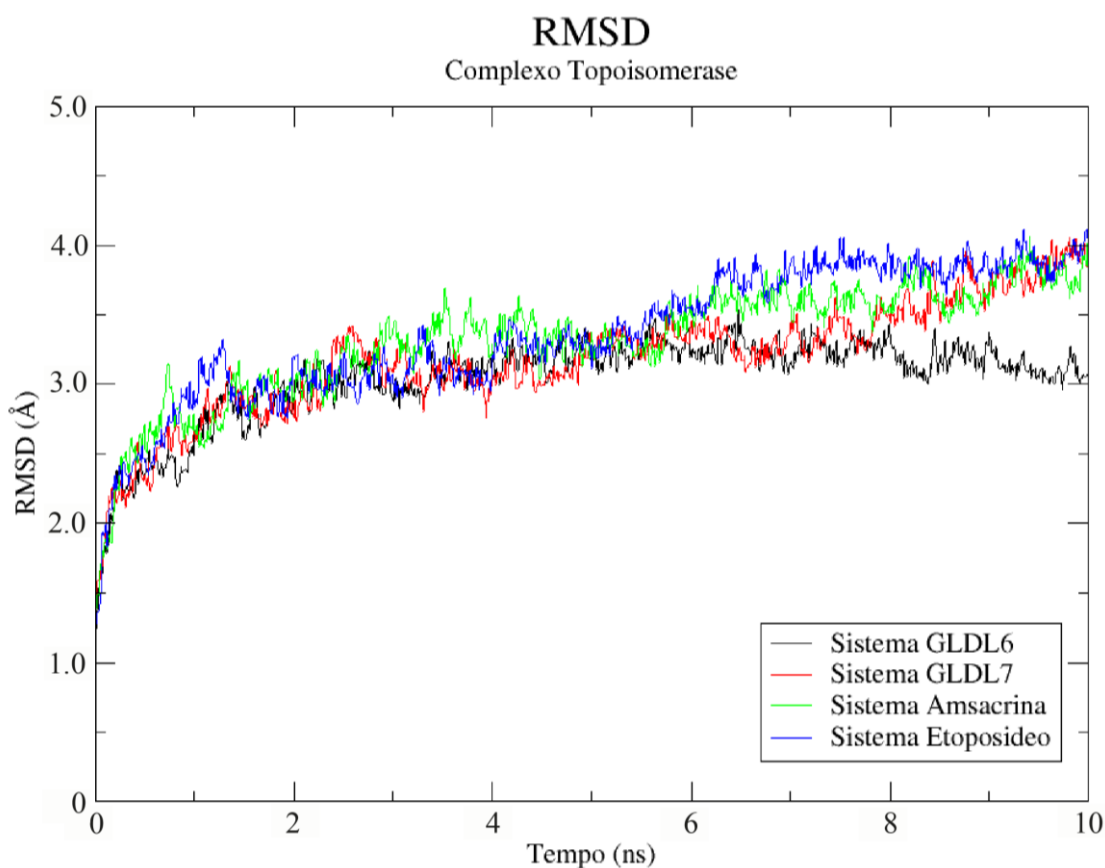
O RMSD dos sistemas GLDL 06, GLDL 07, do inibidor amsacrina e etoposídeo com a 5GWK demonstraram uma otimização completa da espinha dorsal da proteína antes de 2,0 ns, sem uma mudança significativa de conformação até 10 ns (Apêndice E).

Para uma melhor compreensão dos dados que serão exibidos a seguir é de suma importância ressaltar que esse estudo foi realizado no complexo topoisomerase-DNA, entretanto, para visualizar de forma específica como a topoisomerase e o DNA se comportam no sistema topo-DNA-ligante é que houveram a separação das figuras referentes ao RMSD e ao RMSF.

A seguir, é possível observar os desvios da topoisomerase e do DNA como um todo de cada ligante distinto (Figura 23).

Figura 23 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para os complexos estudados. A) RMSD da topoisomerase em diferentes sistemas. B) RMSD do DNA em diferentes sistemas

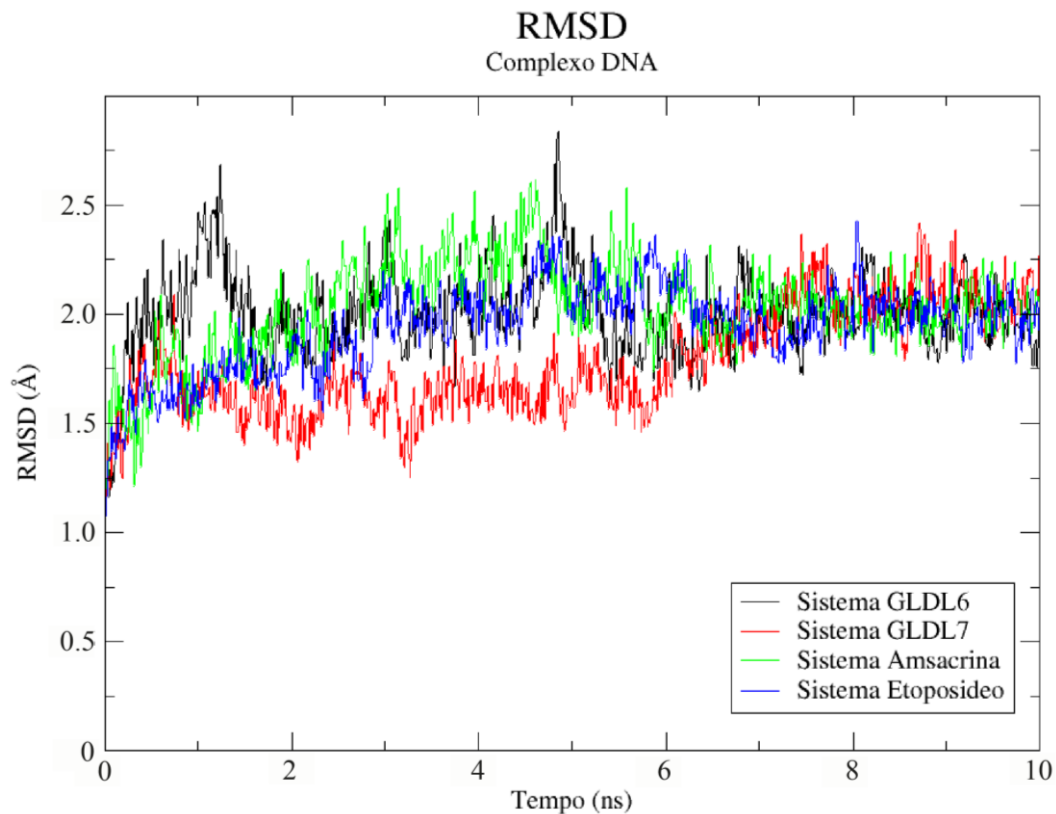
A



(continua)

Figura 23 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para os complexos estudados. A) RMSD da topoisomerase em diferentes sistemas. B) RMSD do DNA em diferentes sistemas (conclusão)

B



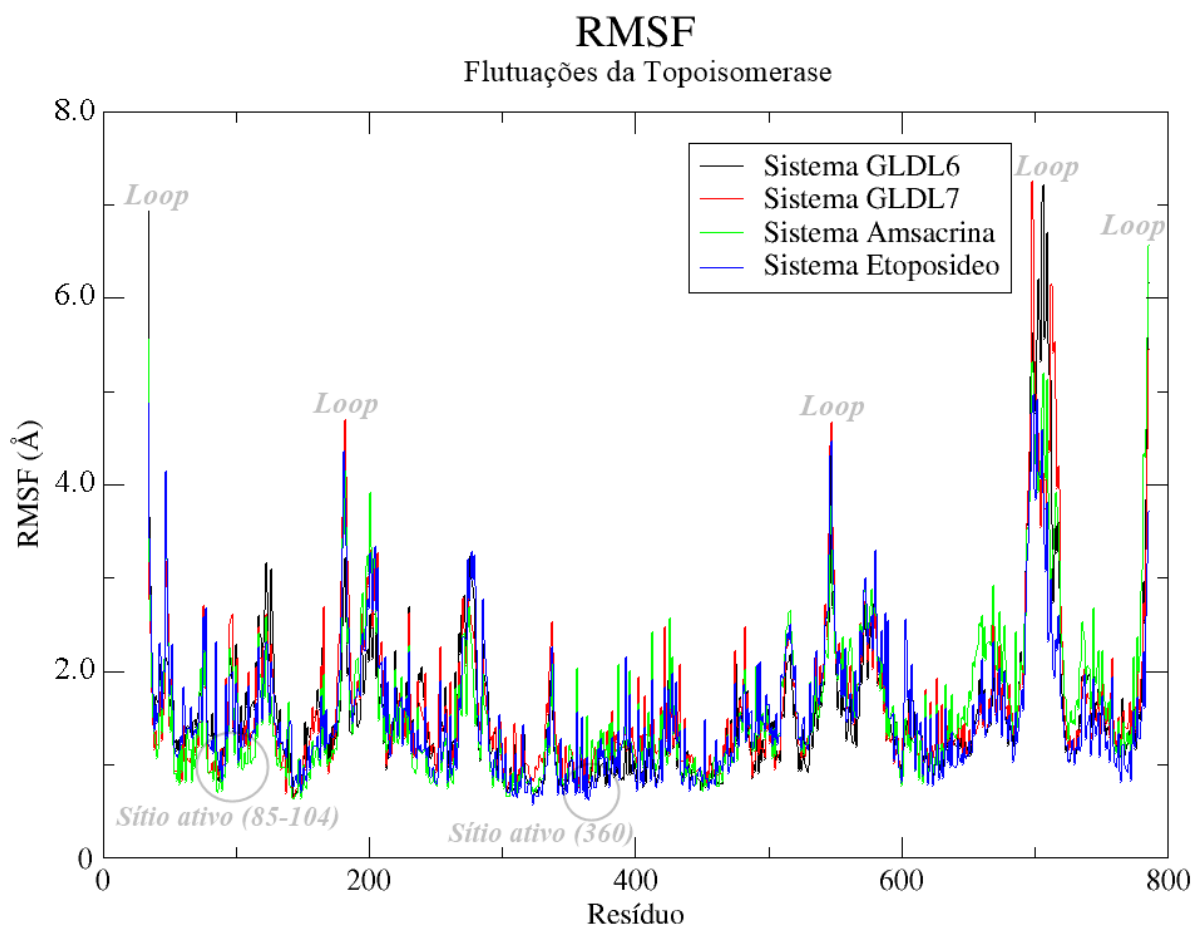
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

O RMSD da topoisomerase e do DNA para os sistemas GLDL 06 e o GLDL 07 demonstrou movimentação similar ao sistema dos inibidores amsacrina e etoposídeo. Os sistemas apresentaram mínimos desvios e se estabilizaram após 6 ns (Figura 23). Para o DNA (Figura 23 B) observa-se que os compostos não apresentaram altos desvios da estrutura, permanecendo sem grandes movimentações. Para a topoisomerase, no entanto, após 8 ns, houve um maior pico de movimentação que se deve aos *loops* presentes na estrutura da proteína. Entende-se que os *loops* são estruturas de alta movimentação (NESTL; HAUER et al., 2014) e que podem apresentar maiores movimentações. Os *loops* pertencem às partes mais flexíveis das estruturas enzimáticas e apresentam uma maior mudança de interação com as moléculas do solvente. Estas porções estão distantes do sítio de ligação e não são foram suficientes para desestabilizar as estruturas de DNA (Figura 23 B).

O RMSF mede o desvio médio de uma partícula ao longo do tempo a partir de uma posição de referência. Neste sistema as partículas referem-se aos aminoácidos da topoisomerase

e aos pares de bases nitrogenadas do DNA. A seguir, observa-se o RMSF dos resíduos da topoisomerase nos diferentes sistemas:

Figura 24 – RMSF da simulação de dinâmica molecular para topoisomerase em diferentes sistemas

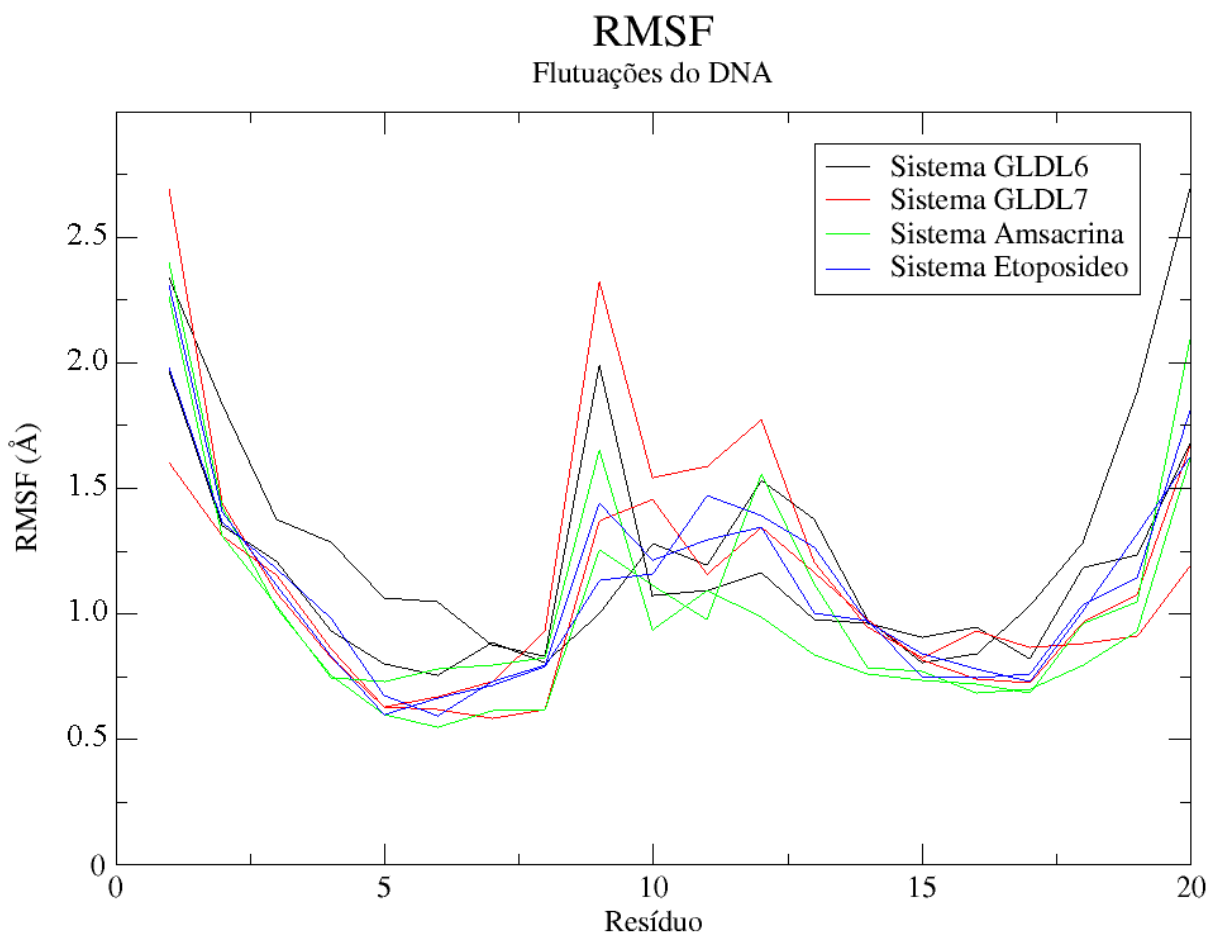


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Neste estudo, observa-se que as flutuações dos resíduos de aminoácidos para a topoisomerase foram bem similares entre os 4 sistemas estudados. A região de maior desvio se apresenta entre os resíduos de aminoácidos 680-720, que se destaca pela presença de *loops* na estrutura proteica. Os resíduos de aminoácidos Arg85, Glu104 e Met360 representam os aminoácidos envolvidos no sítio ativo de ligação, em que estes apresentaram baixa oscilação ao longo da simulação (Figura 24).

Por outro lado, o RMSF dos resíduos do DNA nos diferentes sistemas estudados destaca outro perfil (Figura 25).

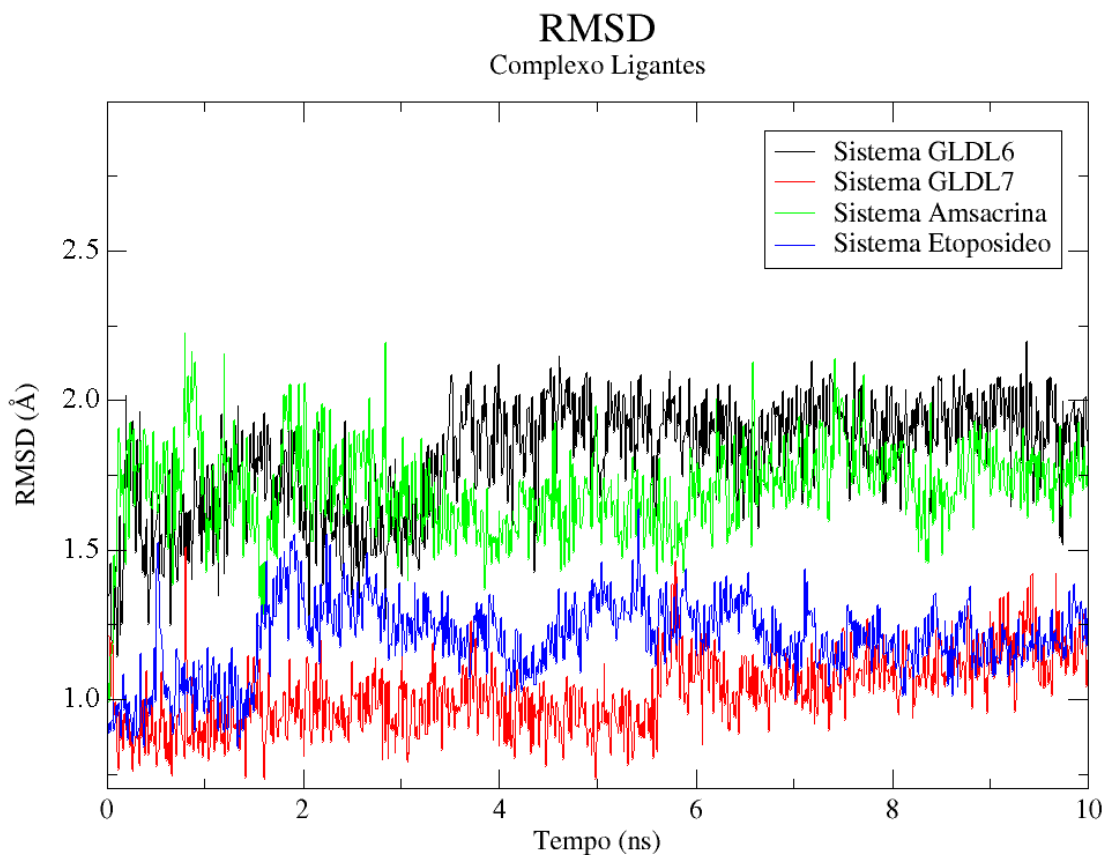
Figura 25 – RMSF da simulação de dinâmica molecular para o DNA em diferentes sistemas



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Neste estudo, observa-se que as flutuações dos pares de base do DNA foram bem similares entre os 4 sistemas. Os desvios ocorrem entre os pares de base 8-13, formando picos acentuados devido a interferência dos ligantes nesta região do sítio (Figura 25).

Na figura seguinte, é possível observar os desvios de cada ligante imerso nos sistemas contendo topo/DNA, água, pressão, temperatura e íons. Em outras palavras, a figura 26 demonstra o quanto cada composto se movimentou no sítio ativo de ligação do complexo topoisomerase/DNA.

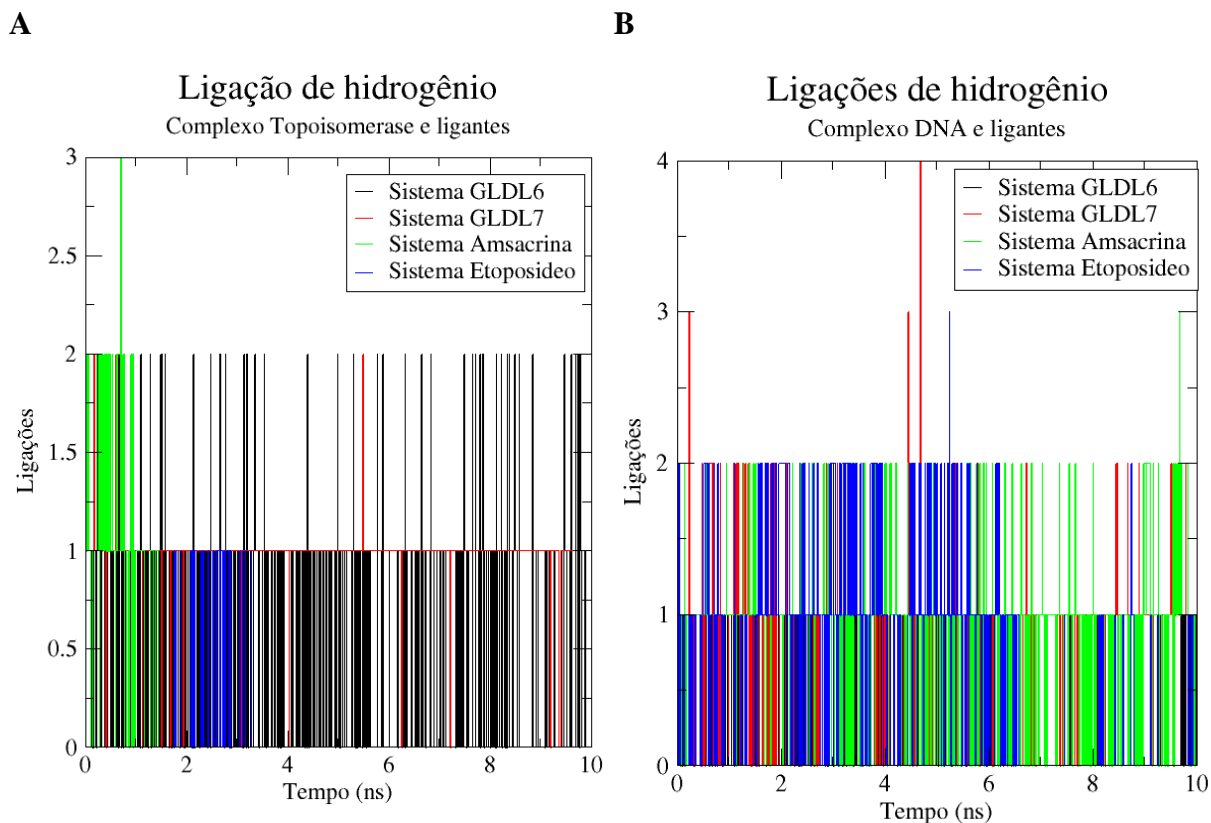
Figura 26 – RMSD dos ligantes em diferentes sistemas

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Com relação ao desvio dos ligantes, estes apresentaram-se vinculados ao seu local de ligação, que se mantiveram estabilizados por 10 ns. Pode-se observar que o ligante GLDL 07 apresentou menores movimentações no sistema, enquanto para o GLDL 06 e amsacrina os desvios foi 1 Å maior (Figura 26). Esse detalhe pode ocorrer devido à alta estabilidade das ligações de hidrogênio e empilhamento π - π existentes entre a porção acridínica, os resíduos de aminoácidos da topoisomerase e DNA.

Além da avaliação dos desvios estruturais dos receptores e ligantes, também é possível avaliar a quantidade de ligações de hidrogênio que cada composto realiza com a topoisomerase e com o DNA, medida por nanosegundos (ns) (Figura 27).

Figura 27 – Ligações de hidrogênio observadas durante 10 ns da simulação para os complexos estudados. A) Ligações de hidrogênio entre a topoisomerase e os ligantes em diferentes sistemas. B) Ligações de hidrogênio entre o DNA e os ligantes em diferentes sistemas



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

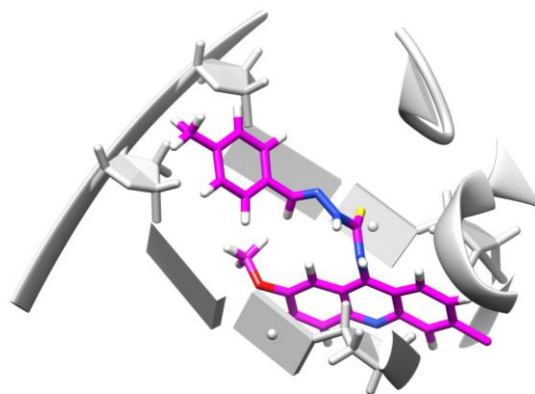
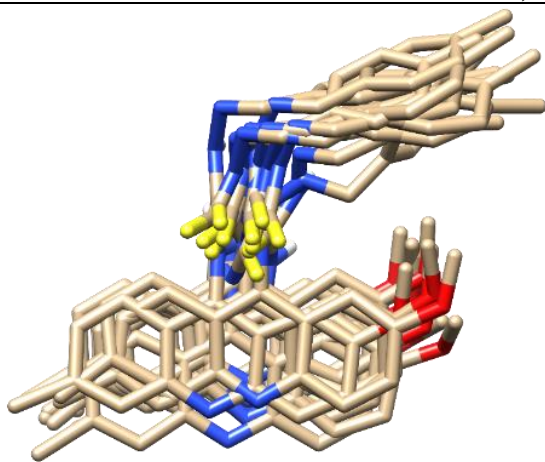
Ao avaliar a presença de ligações de hidrogênio entre os sistemas observa-se que o ligante GLDL 06 apresenta cerca de 2 ligações de hidrogênio estabilizadas com a topoisomerase, permanecendo ancorado durante os 10 ns (Figura 27A). No entanto, não se observam ligações de hidrogênio estáveis do GLDL 06 com o DNA (Figura 27B).

Por outro lado, o GLDL 07 apresenta na maior parte do tempo 1 ligação de hidrogênio com a topoisomerase, e até 2 ligações quando próximo aos 6 ns (Figura 27A). Para o DNA, o GLDL 07 apresenta uma maior interação, que se estabilizam em 2 ligações de hidrogênio. A depender a conformação o GLDL 07 pode realizar até 4 ligações de hidrogênio (Figura 27B).

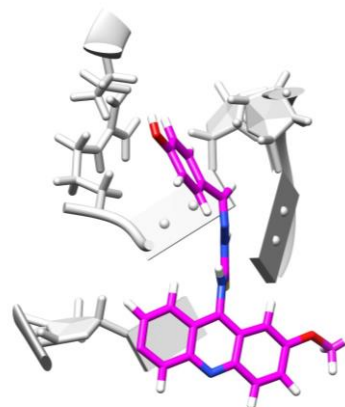
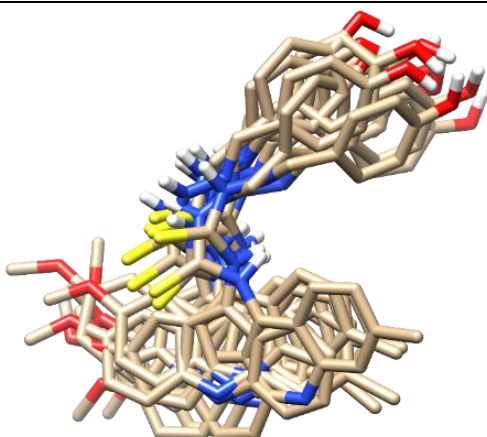
Esses ensaios por DM mostraram que esses compostos se orientam de forma semelhante aos inibidores amsacrina e etoposídeo, mimetizando interações importantes para a atividade. A seguir, é possível observar através de figuras alguns comportamentos dos compostos no sítio ativo de ligação (Figura 28).

Figura 28 – Comportamento dos compostos no sítio ativo (PDB ID 5GWK) após 10 ns de simulação. A) Sistema GLDL 06. B) Sistema GLDL 07. C) Sistema amsacrina. D) Sistema etoposídeo

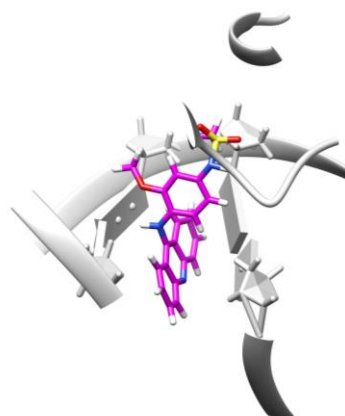
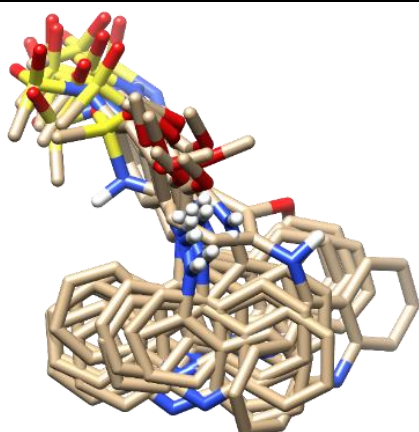
A) GLDL 06



B) GLDL 07



C) AMSACRINA

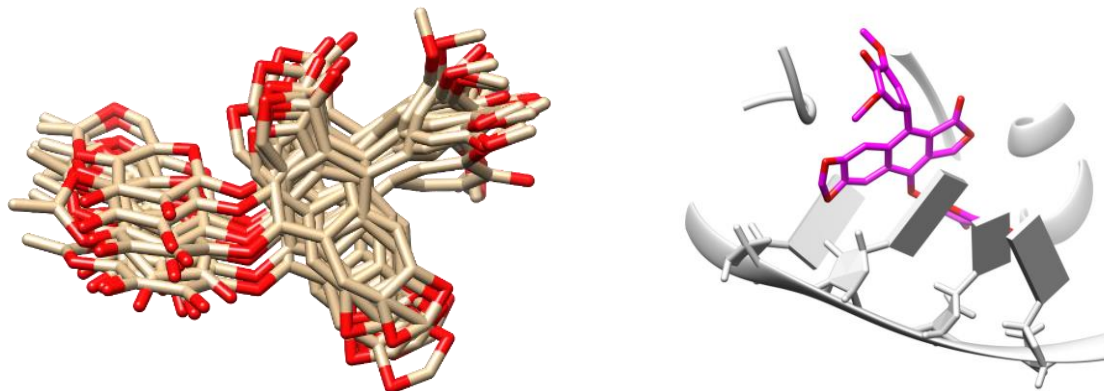


(continua)

Figura 28 – Comportamento dos compostos no sítio ativo (PDB ID 5GWK) após 10 ns de simulação. A) Sistema GLDL 06. B) Sistema GLDL 07. C) Sistema amsacrina. D) Sistema etoposídeo

(conclusão)

D) ETOPOSÍDEO



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: As conformações, por nanossegundos, dos ligantes está mostrado na esquerda.

Na direita a figura representa o sítio ativo do complexo topo/DNA com o ligante acoplado na última conformação da simulação: na coloração cinza é o sítio ativo e em rosa destaca-se o ligante.

A partir da figura 28, observa-se que a porção acridínica permanece realizando interações de empilhamento π - π com os pares de base do DNA, característica crucial a intercalação no sítio ativo. Essas interações apresentam importância na estabilização da estrutura 3D macromolecular. Esta estabilidade tem sido impulsionada por uma combinação de interações intramoleculares e intermoleculares. Além disso, a presença dos pares de base nitrogenadas do DNA maximizam as interações hidrofóbicas (MORRIS-ANDREWS; ROTTLE; PLOTKIN, 2010).

Destaca-se, também, que o composto GLDL 07 apresenta mais ligações de hidrogênio que o composto GLDL 06 no complexo topoisomerase/DNA. Este fato se evidencia pela presença da hidroxila na porção 4-hidro-benzilideno, posicionada na porção flexível da estrutura do GLDL 07, que auxilia na formação de mais ligações de hidrogênio com a topoisomerase, enquanto o grupo acridina é responsável por manter as ligações do tipo π - π com o DNA. Sabe-se que as ligações de hidrogênio são as interações intermoleculares mais fortes dada sua importância na diferença de eletronegatividade entre os elementos orgânicos (ALKORTA, 1998). As ligações do tipo π - π , por outro lado, pode ocorrer entre os anéis aromáticos e desempenhar um papel importante na estabilização do ligante (MCGAUGHEY; GAGNÉ; RAPPÉ, 1998).

Os estudos de Gomes e colaboradores (2022) retratam que os compostos inibidores de Topo II α , apresentam propriedades estruturais de médio e grande porte, além da planicidade dos anéis aromáticos, que é atenuada devido aos anéis flexíveis, mas também podem apresentar elementos que restringem a conformação.

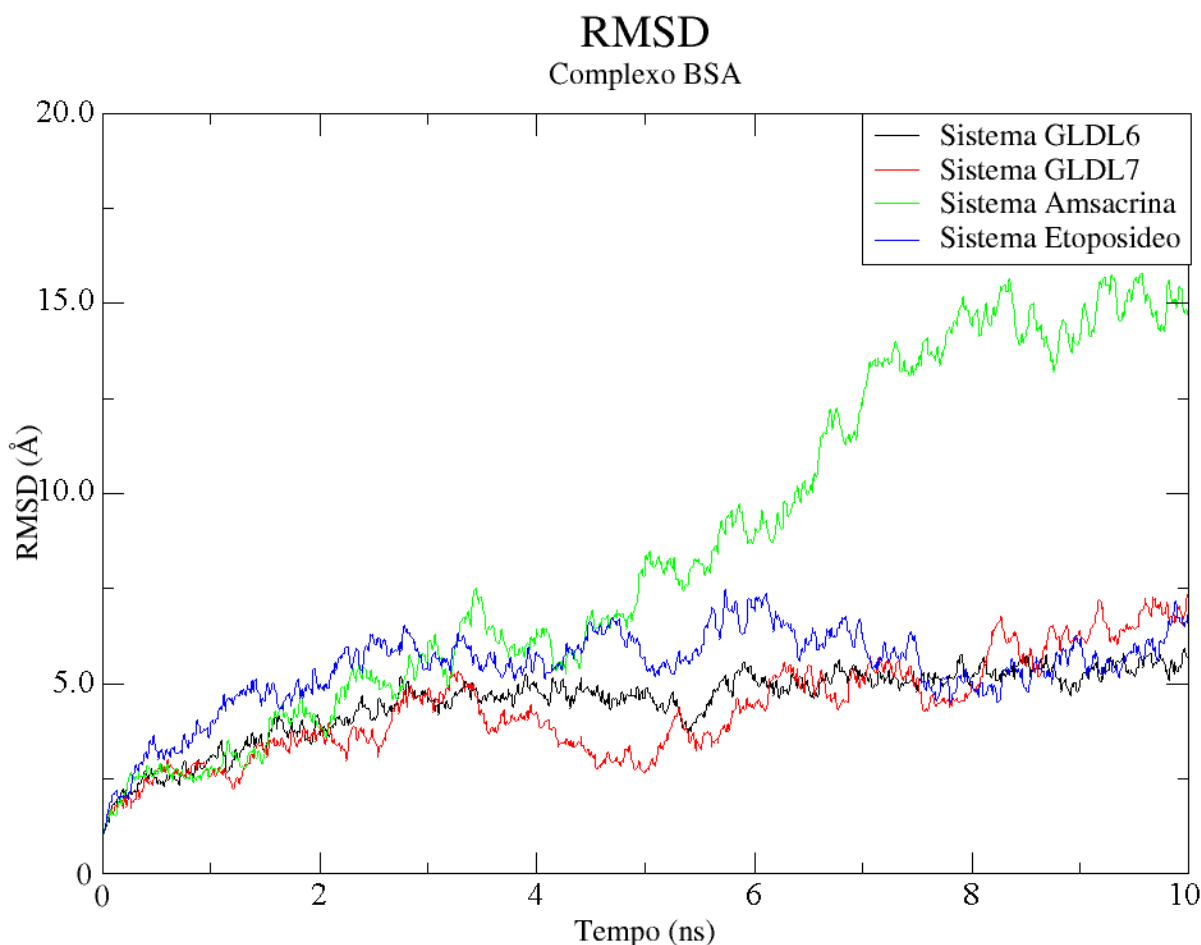
Dessa forma, nossos resultados corroboram com os obtidos previamente em literatura. Karatas et al. (2021) identificou que grupos benzoxazol e piridinas interagem de forma similar como inibidores da topoisomerase II α humana. Estes grupos são formados por grupos fechados de heterocíclicos que se pareiam nos pares de base do DNA, além de fornecerem ligações de hidrogênio pela presença de grupos oxigenados e nitrogenados.

Portanto, observa-se que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 podem se tornar compostos *hits* para avaliação da atividade inibitória *in vitro* e confirmação dos resultados obtidos computacionalmente. Levando em consideração esses resultados promissores dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e ciente da importância da albumina sérica na farmacocinética de fármacos antitumorais foi o que impulsionou continuar esses estudos computacionais na albumina.

5.3.3 Dinâmica molecular na albumina sérica bovina

A seguir, é possível observar os desvios de movimento da BSA ao sofrer interferências da água, pressão, temperatura, íons e principalmente, de cada ligante distinto.

Figura 29 – RMSD da simulação de dinâmica molecular para a BSA em diferentes sistemas

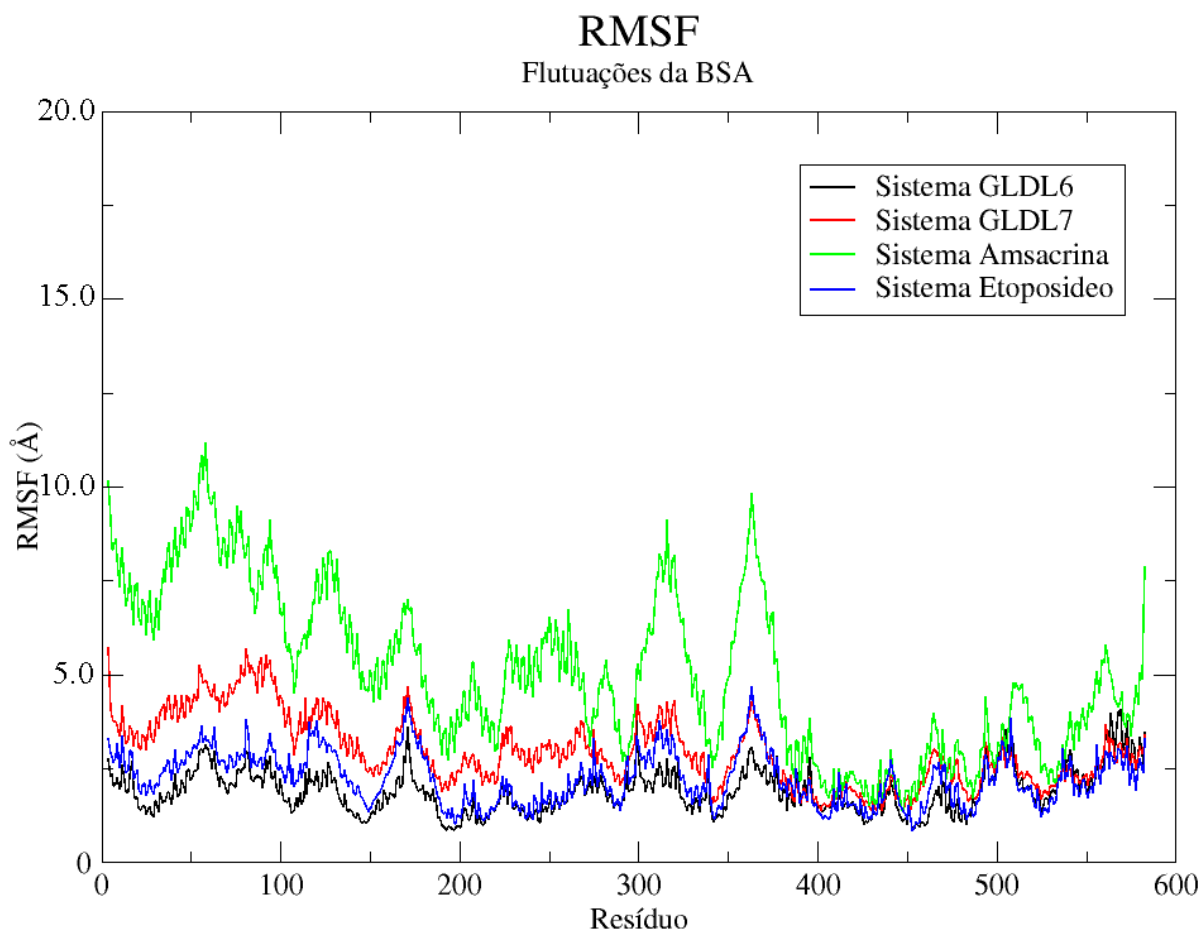


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através da dinâmica molecular realizada na albumina bovina (PDB ID 6QS9), observa-se que os sistemas que continham os ligantes GLDL 06, GLDL 07 e etoposídeo foram mais estáveis, ou seja, a albumina bovina apresentou menor deslocamento, em que, o sistema conseguiu se estabilizar em aproximadamente 2 ns atingindo até no máximo 7,5 Å. Quando observamos o RMSD do sistema da albumina bovina contendo o ligante amsacrina vemos que só conseguiu se estabilizar em aproximadamente 7,5 ns e apresentou um desvio de 15 Å.

Portanto, a amsacrina tornou a albumina bovina mais instável diferente do que ocorreu com a albumina ao se ligar com etoposídeo, GLDL 06 e GLDL 07. Ao visualizar a figura 33, que demonstra o posicionamento dos compostos no sítio ativo, observamos que o anel acridínico da amsacrina se comporta de maneira distinta do GLDL 06 e GLDL 07, o que possivelmente essa conformação pode estar gerando uma instabilidade na albumina bovina.

A seguir, observa-se o RMSF dos resíduos da BSA nos diferentes sistemas:

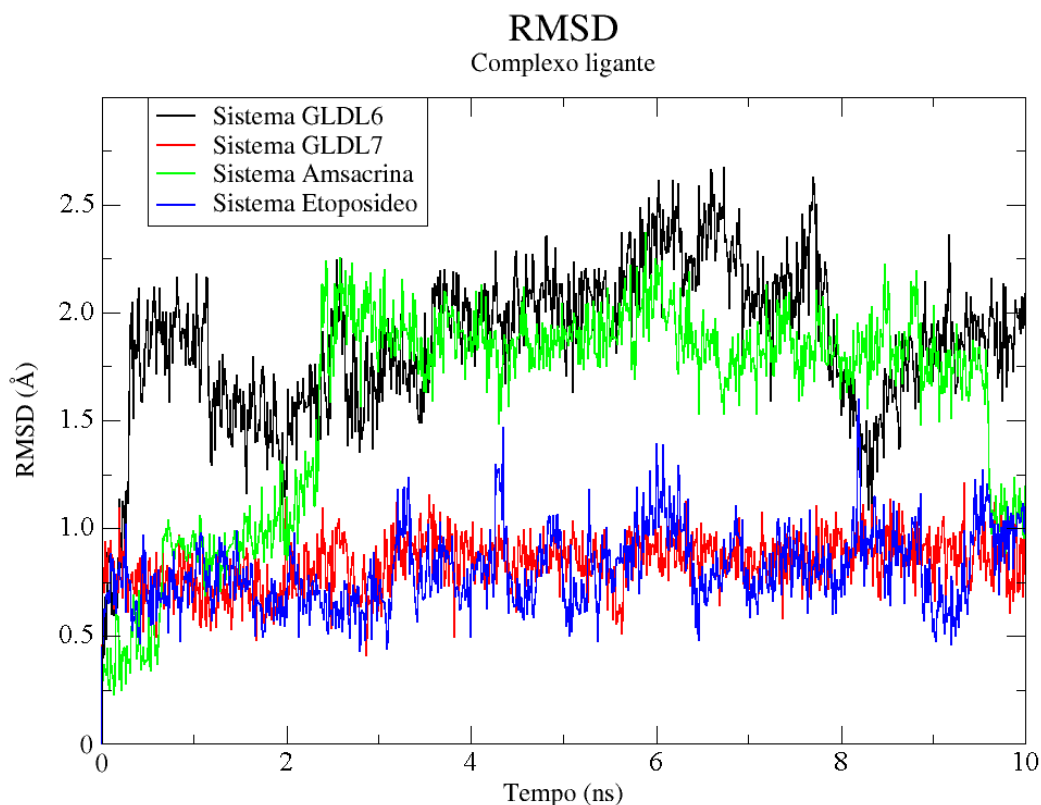
Figura 30 – RMSF da simulação de dinâmica molecular para a BSA em diferentes sistemas

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Neste estudo, observa-se que o perfil das flutuações dos resíduos de aminoácidos para a albumina bovina foi bem similar entre os 4 sistemas estudados. Em que, foi reproduzido o resultado do RMSD (Figura 29), logo, o sistema que apresentou mais flutuações foi o com o ligante amsacrina apresentando o RMSF até pouco mais de 10 Å. Em contrapartida, o RMSF para os outros sistemas não atingiu 6 Å. Portanto, o alto valor de RMSF indica mais flexibilidade com menor estabilidade, enquanto o baixo valor de RMSF indica rigidez da proteína com maior estabilidade (ANITHA et al., 2022).

Desse modo, observamos que o posicionamento da amsacrina no sítio ativo (Figura 33), possivelmente pode estar gerando maiores flutuações dos resíduos de aminoácidos da albumina bovina.

Na figura a seguir, é possível observar os desvios de movimento de cada ligante imerso nos sistemas contendo BSA, água, pressão, temperatura e íons. Em outras palavras, a figura 31 demonstra o quanto cada composto se movimentou no sítio ativo de ligação.

Figura 31 – RMSD dos ligantes em diferentes sistemas

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Com relação ao desvio dos ligantes, estes apresentaram-se vinculados ao seu local de ligação, que se manteve estabilizado por 10 ns. Pode-se observar também que os ligantes GLDL 07 e o etoposídeo apresentaram menores movimentações nos sistemas, ou seja, foram compostos mais estáveis atingindo no máximo o RMSD de 1.5 Å. Por outro lado, para o GLDL 06 e amsacrina os desvios foram maiores, entretanto, o desvio não foi superior a 2.75 Å.

Concluimos então para essa análise que os compostos que apresentam grupamentos hidroxilas (-OH) são mais estáveis apresentando assim, um menor valor de RMSD. Esse resultado concorda com os descritos em literatura.

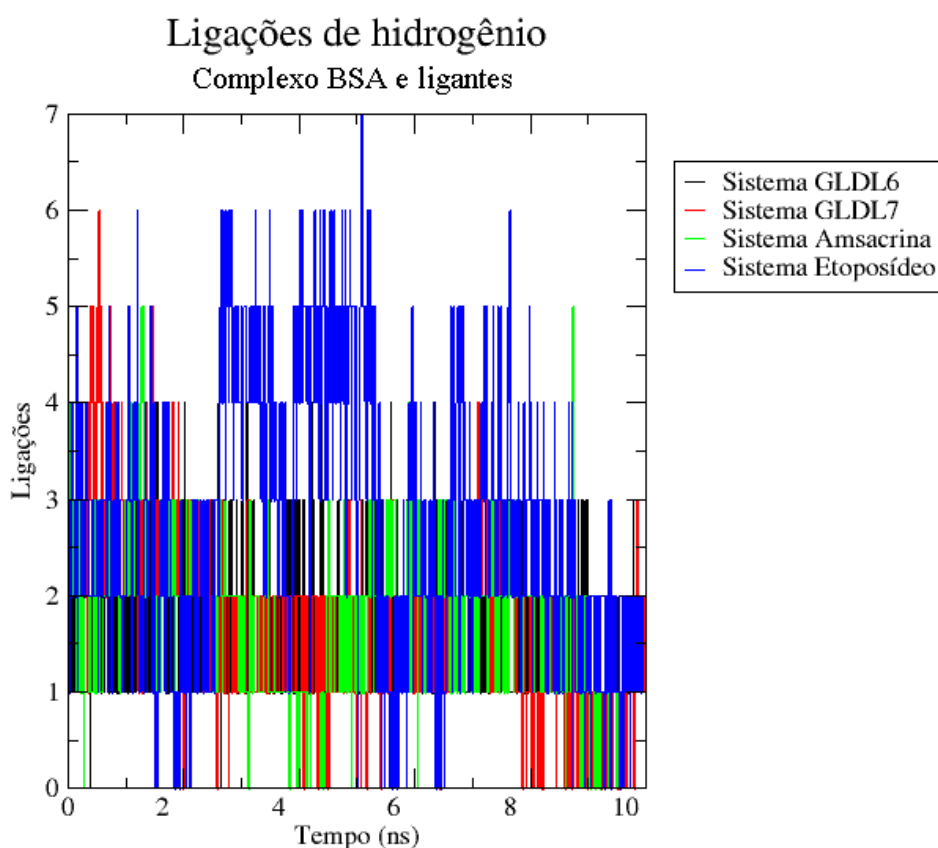
Os flavonóides, catequina e epicatequina, apresentam grupamentos hidroxilas (-OH) em sua estrutura química que podem aumentar a afinidade de ligação com os resíduos polares da BSA devido justamente à formação de pontes de hidrogênio. Logo, a estabilidade estrutural dos complexos biomoleculares é sustentada pela formação de ligações de hidrogênio (ANITHA et al., 2022).

A carga negativa desta proteína será alterada para neutra ou positiva em pH mais baixo, proporcionando o desligamento do complexo proteína-fármaco através da força repulsiva entre elas no tecido tumoral. Portanto, a propriedade sensível ao pH dessa proteína a torna uma

candidata valiosa para o sistema de entrega de drogas com o menor número de efeitos colaterais para superar os problemas de quimioterapia e MDR (MOLLAZADEH et al., 2022).

A figura 32 exibe a quantidade de ligações de hidrogênio por nanosegundos (ns) que os compostos realizam com a albumina.

Figura 32 – Ligações de hidrogênio existentes entre os ligantes e a BSA em diferentes sistemas



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Para o sistema BSA-GLDL06 apresentou até 4 ligações de hidrogênio durante os 6,2 ns, porém, durante os 10 ns apresentou uma predominância de 3 ligações de hidrogênio. O sistema BSA-GLDL 07 apresentou 5-6 ligações de hidrogênio nos dois primeiros nanosegundos, contudo, durante os 10 ns analisados, ocorreu a predominância de 3 ligações de hidrogênio.

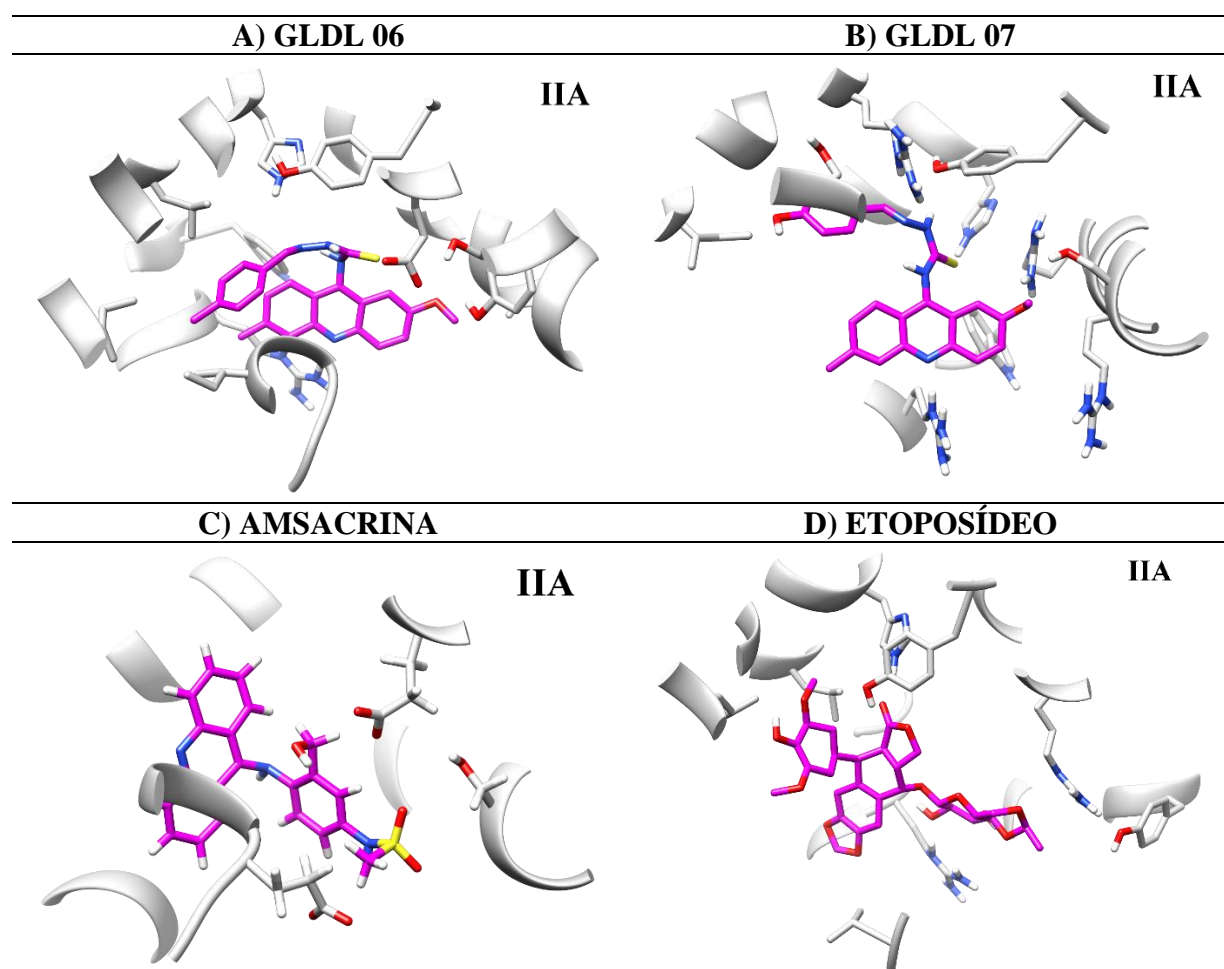
A amsacrina, em dois momentos realizou até 5 ligações de hidrogênio, porém, a maior quantidade de ligações de hidrogênio realizadas foi de até no máximo 3 ligações de hidrogênio durante aproximadamente 8,5 ns. Depois de 8,5 ns, a amsacrina só realizou 1-2 ligações de hidrogênio.

Por fim, nos cinco primeiros nanosegundos, o etoposídeo apresentou até 7 ligações de hidrogênio. Entretanto, entre o intervalo de tempo de 5-8,8 ns ocorreram até 6 ligações de hidrogênio. Ao analisar o gráfico, nos 10 ns de análise, o etoposídeo apresentou 2-3 ligações de hidrogênio com grande frequência. Podemos concluir que o etoposídeo foi o composto que mais realizou interações de hidrogênio com o alvo.

Esses resultados concordam com os dados obtidos de RMSD dos ligantes (Figura 31), em que, os compostos que demonstraram maior estabilidade (etoposídeo e GLDL 07) são os que apresentam grupamentos hidroxilas em sua estrutura molecular e, portanto, foram os compostos que realizaram maior quantidade de ligações de hidrogênio durante os 10 ns.

A seguir é possível observar o comportamento dos compostos no sítio ativo da albumina bovina.

Figura 33 – Comportamento dos compostos no sítio ativo (PDB ID 6QS9). A) GLDL 06. B) GLDL 07. C) amsacrina. D) etoposídeo



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota: A figura representa o sítio ativo da albumina bovina com o ligante acoplado em 5 ns da simulação: na coloração cinza é o sítio ativo e em rosa destaca-se o ligante.

Os compostos interagem no subdomínio IIA da albumina, no qual observamos que a porção acridínica do GLDL 06 e do GLDL 07 se posicionam no sítio ativo de forma similar, diferenciando a posição na porção flexível da molécula, em que, o grupo substituinte do GLDL 06 é uma metila (-CH₃) e do GLDL 07 é uma hidroxila (-OH).

A amsacrina porém apresenta a porção acridínica posicionada de forma totalmente distinta do GLDL 06 e GLDL 07. E o etoposídeo, que é um composto grande, realiza várias ligações no sítio ativo, principalmente devido aos grupamentos hidroxilas.

A maior interação do etoposídeo com a albumina visualizadas na figura 32 e o comportamento desse composto exibida na figura 33 concordam com os dados da literatura, no qual, MIGNOT et al. (1996) e CHEN et al. (2014) relataram que moléculas volumosas demonstraram grande afinidade com o sítio II da albumina sérica humana.

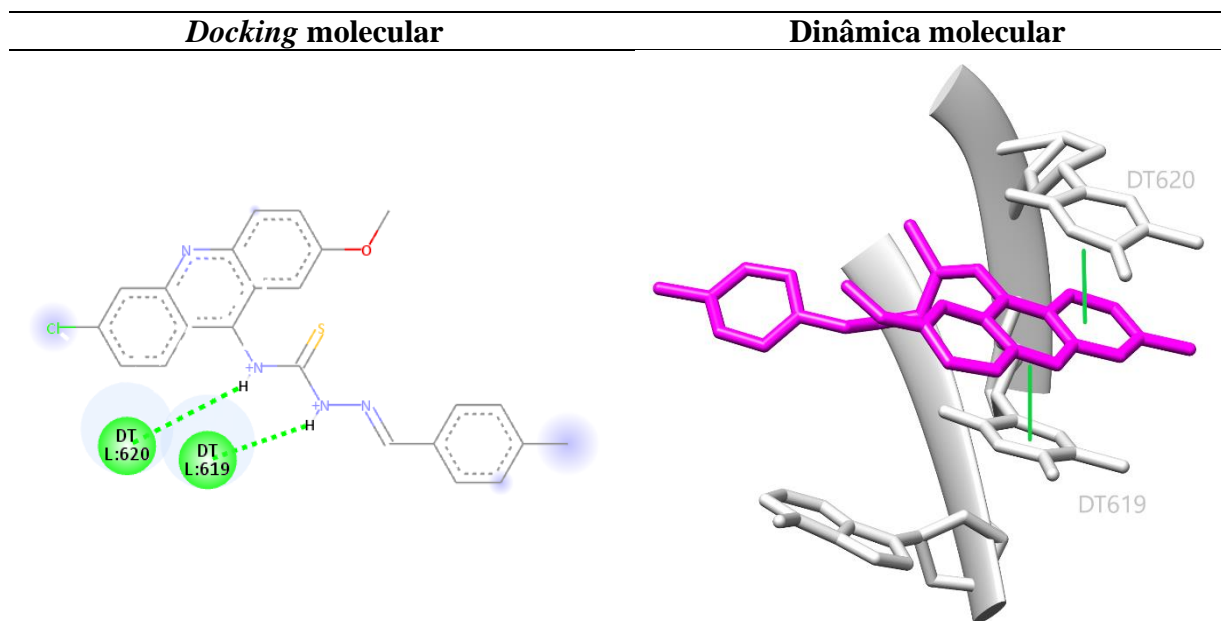
Silva e colaboradores (2018) por sua vez constataram através de estudos *in vitro* que derivados de acridina avaliados podem se ligar preferencialmente ao sítio II da HSA.

5.4 Comparativo das análises de *docking* e dinâmica molecular

Apesar de ser possível a análise comparativa dos resultados obtidos no *docking* molecular e na dinâmica molecular pode-se haver divergências. Em que, essas divergências possivelmente são explicadas devido serem estudos computacionais e, conseqüentemente, terem margem de erro. Além disso, são softwares que são construídos de formas diferentes, ou seja, esses programas dispõem de algoritmos, cálculos e interpretações distintos.

5.4.1 Docking e dinâmica molecular no DNA

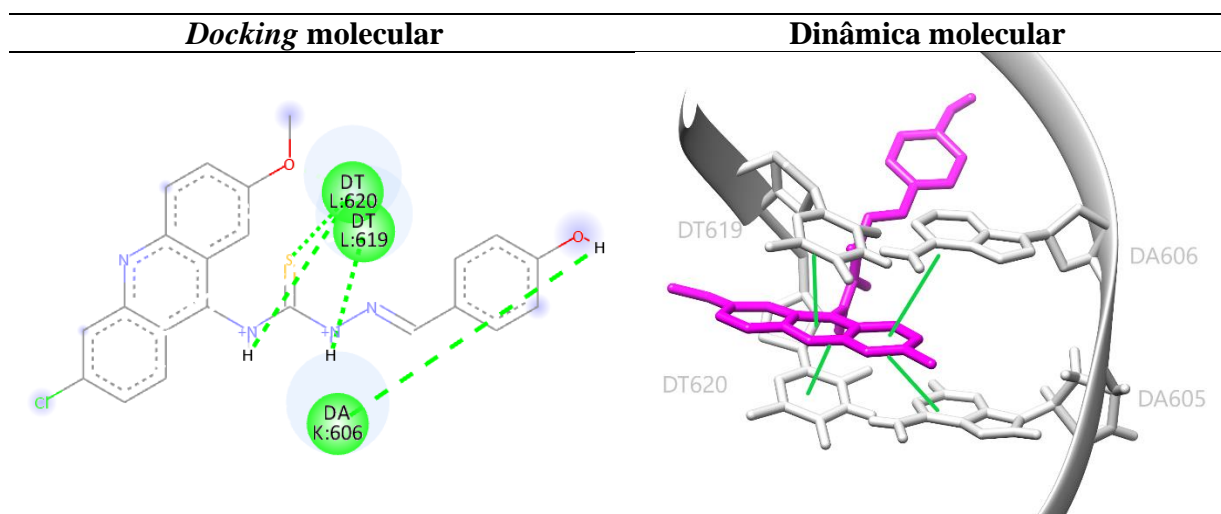
Na figura a seguir é possível observar as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 06, com o DNA.

Figura 34 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 no DNA (PDB ID 1G3X)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Como é possível observar na figura acima, para o *docking* molecular com o DNA, o GLDL 06 apresentou 2 ligações de hidrogênio, sendo uma com timina L: 619 e outra com timina L: 620. Esse resultado foi reproduzido igualmente na dinâmica molecular. Em que, possivelmente essas bases nitrogenadas são importantes para a afinidade ligante-alvo.

Na figura a seguir é possível observar as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 07, com o DNA.

Figura 35 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 no DNA (PDB ID 1G3X)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

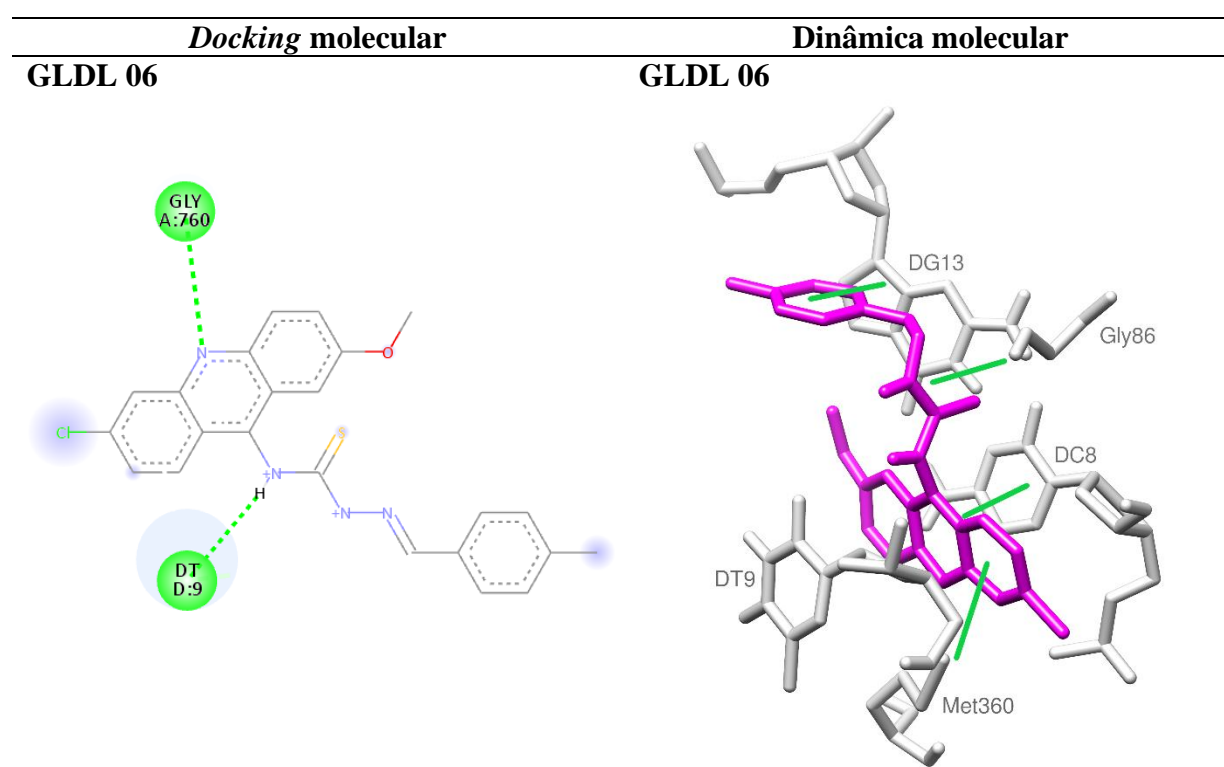
Como é possível observar na figura 35, para o *docking* molecular com o DNA, o GLDL 07 apresentou 4 ligações de hidrogênio com timina L: 619, timina L: 620 e adenina K: 606. O mesmo perfil de interação é observado na dinâmica molecular, em que, o GLDL 07 também realiza 4 ligações de hidrogênio com timina 619, timina 620 e adenina 606. A única exceção é que na dinâmica molecular é observada uma ligação de hidrogênio com adenina 605.

Portanto, pode-se dizer que as interações realizadas pelo GLDL 06 e GLDL 07 demonstradas no *docking* molecular se reproduziram na dinâmica molecular para este alvo do DNA reforçando ainda mais a importância desses estudos de *docking* molecular como triagem, visto que, os estudos de dinâmica molecular requerem um pouco mais de tempo para serem realizados.

5.4.2 Docking e dinâmica molecular no complexo Topo/DNA

A seguir, é possível observar as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 06, com o complexo topoisomerase/DNA.

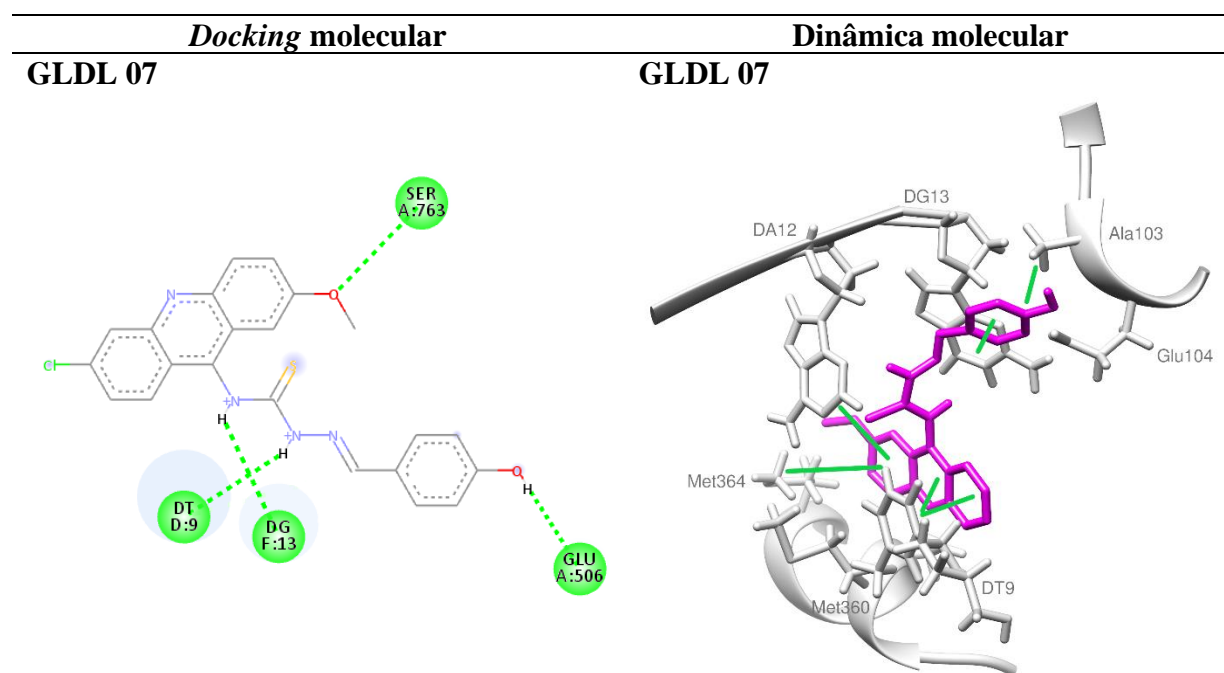
Figura 36 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 na Topoisomerase/DNA (PDB ID 5GWK)



Já observando a figura 36 nota-se para o *docking* molecular com a topo/DNA, que o GLDL 06 apresentou 2 ligações de hidrogênio, sendo uma com o DNA (timina D: 9) e uma com topoisomerase (glicina A: 760). Já para a dinâmica molecular, o GLDL06 também realiza ligação com o DNA (timina 9), além disso, ainda interage com o DNA através de ligações com guanina 13 e citosina 8. As ligações de hidrogênio visualizadas do GLDL 06 com a topoisomerase foram com metionina 360 e glicina 86.

A seguir, é possível observar as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 07, com o complexo topoisomerase/DNA.

Figura 37 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 na Topoisomerase/DNA (PDB ID 5GWK)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

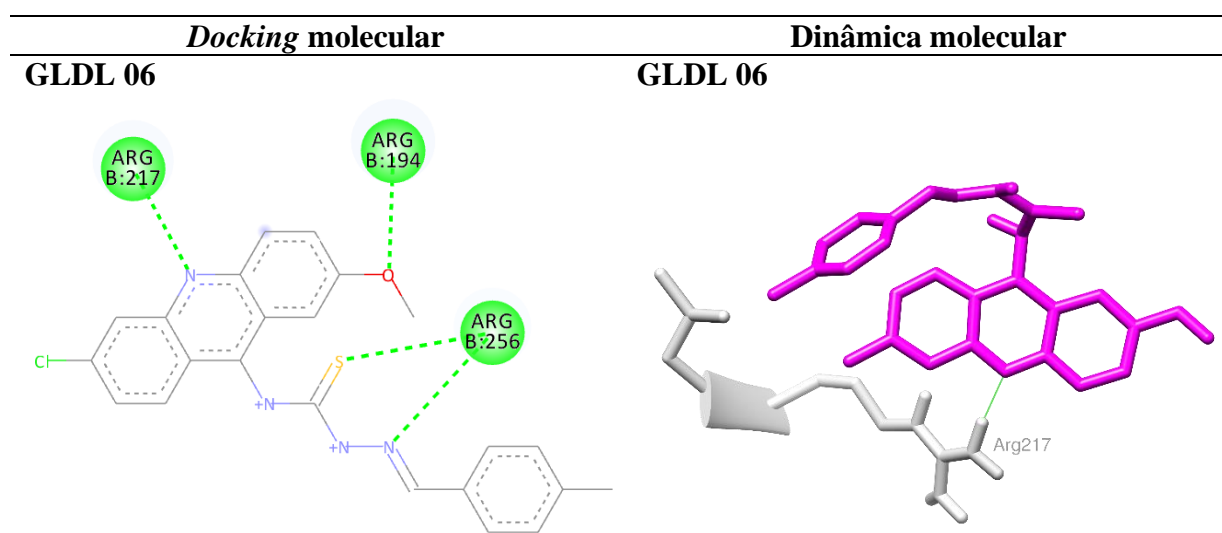
Como é possível observar na figura 37, para o *docking* molecular com a topo/DNA, o GLDL 07 apresentou 4 ligações de hidrogênio, sendo duas com o DNA (timina D: 9 e guanina F: 13) e duas com topoisomerase (serina A: 763 e glutamato A: 506). Já para a dinâmica molecular, o GLDL 07 também realiza ligações com o DNA (timina 9 e guanina 13), além disso, ainda interage com o DNA através da ligação com adenina 12. As ligações de hidrogênio visualizadas do GLDL 07 com a topoisomerase foram com metionina 360, metionina 364, glutamato 104 e alanina 103.

Portanto, observamos que os tipos de interações que o GLDL 06 e o GLDL 07 realizaram com as bases nitrogenadas do DNA se coincidiram, como por exemplo no GLDL 06: ligação de hidrogênio com timina D: 9. E no GLDL 07, ligações de hidrogênio convencional com timina 9 e guanina 13, todavia, as interações realizadas por esses compostos com a enzima topoisomerase apresentaram ligações distintas com os resíduos de aminoácidos, possivelmente porque esses compostos deveriam estar em posições distintas no sítio ativo. Entretanto, essa divergência não foi suficiente para interferir nos resultados finais dessa análise, visto que para ambos os programas, o composto GLDL 07 foi mais promissor para a topoisomerase/DNA do que o GLDL 06.

5.4.3 Docking e dinâmica molecular na BSA

Na figura 38 a seguir, é possível observar as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 06, com a albumina bovina.

Figura 38 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 06 na albumina bovina (PDB ID 6QS9)



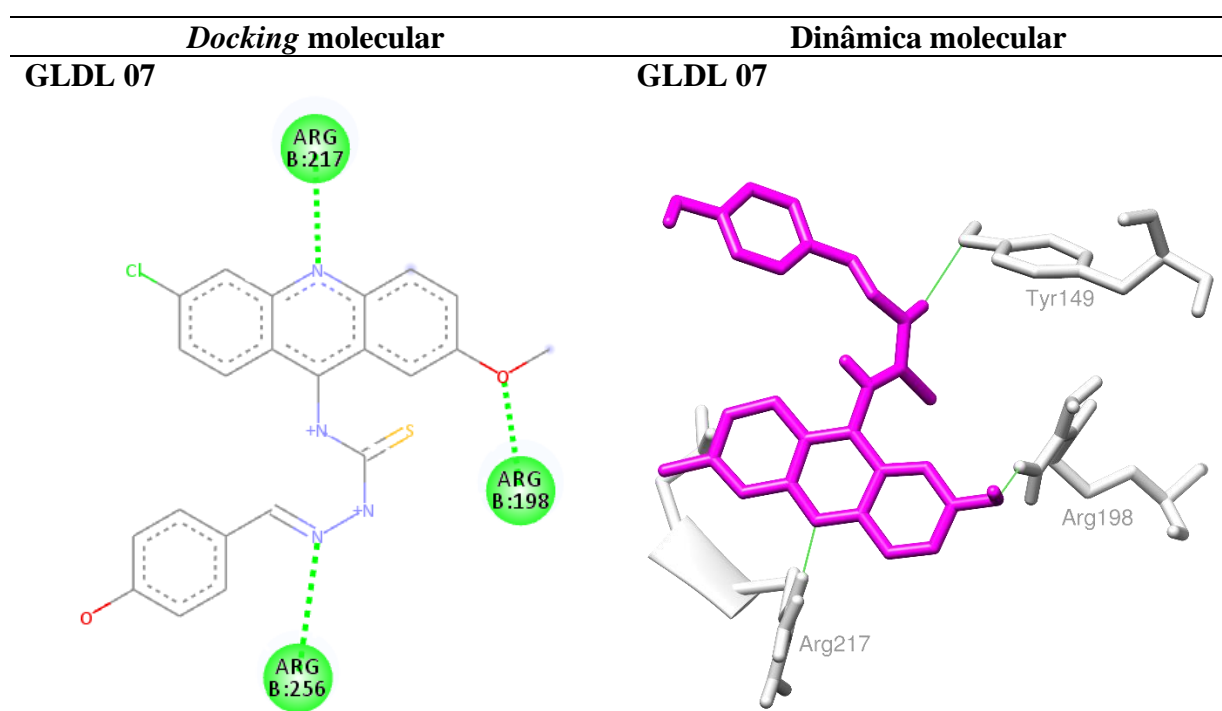
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

No *docking* molecular foi possível observar ligações de hidrogênio com arginina B: 217, arginina B:194 e arginina B:256. Na dinâmica molecular para essa pose, só é possível observar uma ligação de hidrogênio, entretanto, essa interação foi semelhante a encontrada no *docking*, ou seja, o nitrogênio do núcleo acridínico realizando ligação de hidrogênio com arginina B:217.

Portanto, possivelmente o resíduo de arginina B:217 é um aminoácido importante para a interação dessa molécula com o alvo.

A seguir, estão descritas as ligações de hidrogênio encontradas nos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico, GLDL 07, com a albumina bovina.

Figura 39 – Ligações de hidrogênio realizadas pelo GLDL 07 na albumina bovina (PDB ID 6QS9)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Como é possível observar na figura 39, para o *docking* molecular com a albumina bovina, o GLDL 07 apresentou 3 ligações de hidrogênio com arginina B:217, arginina B:198 e arginina B:256. Na dinâmica molecular, o GLDL 07 também realiza 3 ligações de hidrogênio, sendo 2 ligações semelhantes, sendo elas: ligação de hidrogênio do núcleo acridínico com arginina B:217 e ligação de hidrogênio da metoxila com arginina B:198. Diferindo apenas a ligação do espaçador com o aminoácido tirosina 149.

Desse modo, ao comparar os dados obtidos através do *docking* molecular e os dados obtidos através da dinâmica molecular para o GLDL 06 e GLDL 07 observamos o perfil de interações bastante similar. Em que, para o GLDL 06, a ligação de hidrogênio convencional com arginina B: 217 foi reproduzida na dinâmica molecular. Da mesma forma que ocorreu para

o GLDL 07, em que, as ligações de hidrogênio com arginina B:198 e arginina B:217 foram reproduzidas na dinâmica, inclusive nas mesmas porções da molécula.

No *docking* molecular, as ligações de hidrogênio realizadas pelos compostos GLDL 06 e GLDL 07, na porção tiossemicarbazida das moléculas apresentaram interações com aminoácidos distintos na dinâmica. Ou seja, o grupamento tiossemicarbazida do GLDL 06 realizou interações com arginina B:256 que não foram visualizadas nos estudos de dinâmica. O grupamento tiossemicarbazida do GLDL 07 também realizou interação com a arginina B:256, entretanto, na dinâmica molecular observou-se a interação com tirosina 149. Porém, como já foi descrito anteriormente, esses programas podem apresentar divergências devido a apresentarem algoritmos e cálculos distintos, entretanto, essas variações não foram suficientes para alterarem os resultados finais dessa análise, visto que para ambos os programas, o composto GLDL 07 foi mais promissor para a albumina do que o GLDL 06.

Devido a estes estudos computacionais terem apontado resultados interessantes e promissores dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e para aprofundar nessas análises é que foram realizados os estudos *in vitro* no ssDNA, topoisomerase/DNA e albumina bovina como estarão descritos a seguir.

5.5 Análise da interação *in vitro* ao ssDNA

É descrito na literatura que sondas fluorescentes ligantes do DNA são úteis para decifrar o modo de interação entre um fármaco ou candidato a fármaco e essa biomolécula (SARWAR et al., 2017). Para o melhor entendimento dos possíveis mecanismos de ação dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, foi realizada a análise de ligação do ssDNA por absorção UV-vis dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 e dos compostos de referência amsacrina e etoposídeo.

Para estudar as interações dos compostos com ssDNA, foram feitas titulações espectrofotométricas em tampão aquoso (Tris-HCl, pH 7,6). 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 evidências do modo de interação que ocorreu (SALEM et al., 2016).

Os dados espectroscópicos de absorção UV-vis gerados a partir da análise das referidas sondas com o ssDNA estão mostrados na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10 – Dados espectroscópicos de absorvância dos GLDLs na presença e ausência do ssDNA a 298K

Compostos	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercro mismo ^a (%)	Kb (M ⁻¹)	R ^{2b}
GLDL 06	318	316	02	50%	6.84 x 10 ⁴	0.9905
GLDL 07	319	318	01	33%	1.08 x 10 ⁵	0.9929

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: a Hipercromismo resultante da interação das sondas fluorescentes fixadas em 1mM de GLDL 06 e GLDL 07 com o ssDNA em variadas concentrações (10-100 μ M).

b Coeficiente de correlação.

Existem dois tipos de deslocamentos que podem ser identificados na interação ligante-DNA. O primeiro é o deslocamento batocrômico (deslocamento vermelho) que consiste no aumento do comprimento de onda de máxima absorção. O segundo deslocamento é o hipsocrômico (deslocamento azul) referente a diminuição do comprimento de onda de máxima absorção. Além disso, os efeitos hipercrômico ou hipocrômico, responsáveis pelo aumento e diminuição da absorvância da banda, respectivamente, também podem ser observados (LIU et. al, 2002).

Conforme mostrado na tabela 10 acima, os comprimentos de onda relacionados aos picos máximos de absorção observados para o GLDL 06 e GLDL 07 livres foram de 318 nm e 319 nm, respectivamente. Após o processo de interação, nota-se que os picos máximos do GLDL 06 e GLDL 07 sofreram deslocamento atingindo 316 nm e 318 nm, respectivamente.

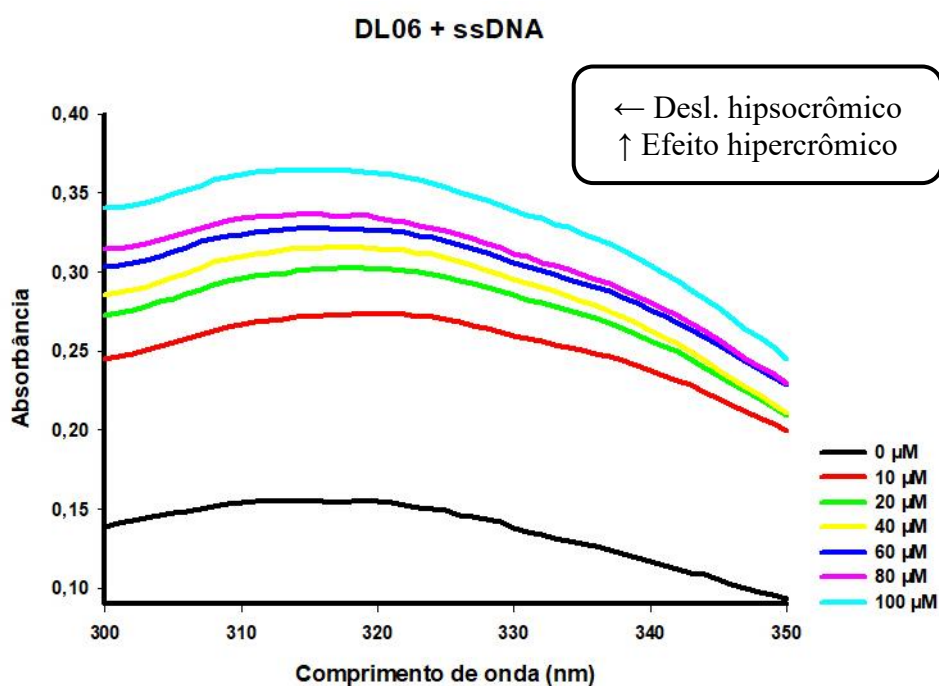
Logo, o pico máximo absorvivo do GLDL 06 foi deslocado para a região espectral azul (hipsocromismo) (02 nm), bem como, o pico máximo absorvivo do GLDL 07 também apresentou um desvio para a região espectral azul (hipsocromismo) (01 nm). Pois, ambos apresentaram diminuição no comprimento de onda máxima de ligação.

Também é possível observar que as sondas intercalativas usadas no referido ensaio não apresentaram hipocromismo (diminuição do pico máximo). Contudo, as sondas mostraram um hipercromismo (aumento do pico máximo) de 50% para o GLDL 06 e 33% para o GLDL 07. Esse hipercromismo pode ter ocorrido devido a várias interações não covalentes, que aumentaram a intensidade de absorção após a adição de quantidades crescentes de ssDNA (ALVES et al., 2021).

No que diz respeito à constante de afinidade (Kb) averiguada, as sondas intercalantes GLDL 06 e GLDL 07 obtiveram valores na magnitude de 6.84 x 10⁴ e 1.08 x 10⁵, nessa ordem, típico para compostos intercaladores (10⁴-10⁶) (SALEM et al., 2016).

Portanto, os compostos GLDL 06 e GLDL 07 são sondas fluorescentes portadores de cromóforos aromáticos planares, o que confere a estes compostos um mecanismo intercalativo de interação, pois podem se inserir entre pares de bases em uma hélice de DNA (SANI et al., 2018). Desse modo, o espectro de absorção do composto GLDL 06 na presença e na ausência de ssDNA está representado na figura a seguir:

Figura 40 – Espectro de absorção do GLDL 06 (1mM) em concentrações crescentes de DNA

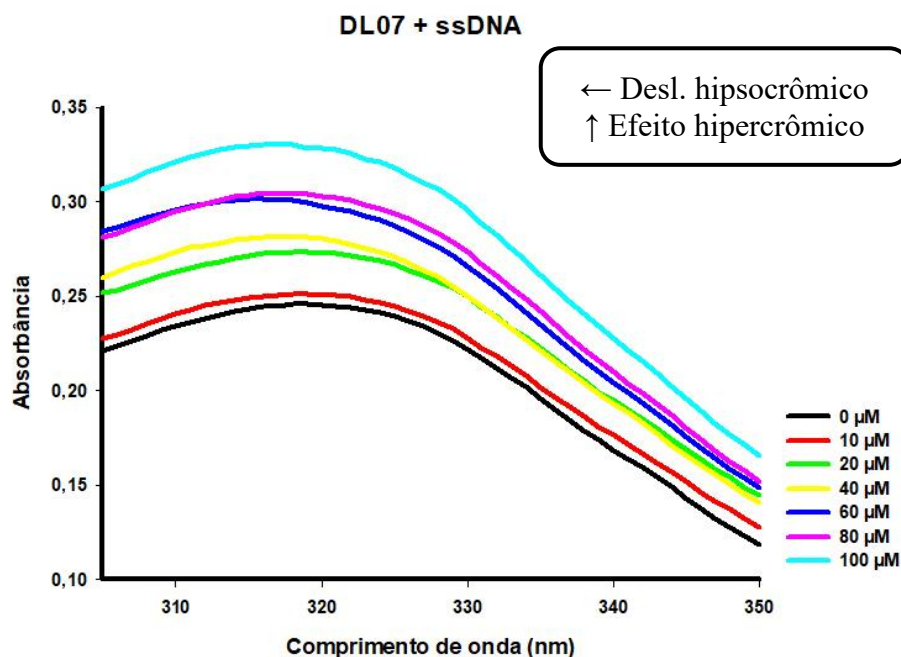


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através do espectro de absorção acima observa-se que mantendo a concentração do GLDL 06 fixada em 1mM e adicionando concentrações crescentes do DNA, verificou-se que as bandas de absorção aumentaram à medida que aumentou a concentração do DNA. Todavia, a absorbância apresentada na concentração de 20 μM e 40 μM, bem como, 60 μM e 80 μM foram bem semelhantes. E que a banda gerada para o composto GLDL 06 isolado apresentou uma absorbância bem discrepante das absorbâncias geradas pelo complexo composto-DNA confirmando assim a interação desse composto com o alvo.

O espectro de absorção do compostos GLDL 07 analisado na presença e na ausência de ssDNA está representado na figura 41 a seguir.

Figura 41– Espectro de absorção do GLDL 07 (1mM) em concentrações crescentes de DNA



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Por meio do espectro de absorção acima observa-se que mantendo a concentração do GLDL 07 fixada em 1mM e adicionando concentrações crescentes do DNA, constatou-se que as bandas de absorção aumentaram à medida que aumentou a concentração do DNA. Todavia, a absorbância apresentada na concentração de 20 µM e 40 µM, bem como, 60 µM e 80 µM foram bem semelhantes.

Entretanto, ao comparar com espectro de absorção do GLDL 06 (Figura 40) observa-se este composto necessitou de uma menor concentração de ssDNA (10 µM) para ocorrer uma interação suficiente que modificou a absorbância de aproximadamente 0,15 para aproximadamente 0,25. Diferentemente do que ocorreu no estudo realizado com o GLDL 07 (Figura 41), em que, ao adicionar 10 µM de ssDNA, a absorbância praticamente permaneceu similar a absorbância do composto isolado concluindo que ocorreu uma fraca interação. E, apenas quando utilizou 20 µM de ssDNA é que ocorreu um maior aumento na banda de absorção (Figura 41).

Esses dados espectroscópicos obtidos da análise da interação *in vitro* dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com o ssDNA concordam com os resultados *in silico* previamente realizados, em que, no *docking* molecular, o composto GLDL 06 (ΔG -11,79 Kcal mol⁻¹/ Ki 2,29 nM) apresentou uma maior interação e afinidade com o DNA do que o GLDL 07 (ΔG -10,98 Kcal mol⁻¹/ Ki 8,98 nM). E na dinâmica molecular, apesar do composto GLDL

07 ter apresentado uma maior quantidade de ligações de hidrogênio, o composto GLDL 06 foi mais estável no sítio de ligação.

Com respaldo nos dados espectroscópicos de absorção acima discutidos e, com a correlação existente com os estudos computacionais, é evidente que os resultados verificados robustecem e consolidam a hipótese de que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos descritos pelo estudo supracitado interagem com o ssDNA através do mecanismo de intercalação.

Essa intercalação ocorre devido a presença do anel acridínico nos compostos tiossemicarbazônicos-acridínicos, e esse mecanismo encontrado nos estudos acima concordam com dados da literatura. Nas análises computacionais de Gouveia e colaboradores (2018), a amsacrina foi capaz de se intercalar entre os pares de bases do DNA realizando ligações de hidrogênio. Logo, a presença de múltiplos anéis aromáticos nestes compostos permite interações de empilhamento-pi com nucleotídeos.

5.6 Análise da interação *in vitro* à BSA

A albumina do soro bovino (BSA), bem como, a humana (HSA), exibem uma cadeia simples de aminoácidos e o microambiente da estrutura secundária da cadeia proteica pode ser modificado pela interação das proteínas com pequenos compostos e, nesse caso, geralmente, ocorre a supressão da fluorescência intrínseca da biomolécula (MOREIRA et al., 2015).

Os dados espectroscópicos de absorção UV-vis gerados a partir da análise das referidas sondas com a BSA estão mostrados na Tabela 11, a seguir.

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de absorbância dos GLDLs na presença e ausência da BSA em 298K

Compostos	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercro mismo ^a (%)	Kb (M ⁻¹)	R ^{2b}
GLDL 06	278	268	10	40%	1.87 x 10 ⁵	0.9964
GLDL 07	278	269	09	50%	1.21 x 10 ⁵	0.9951

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Notas: ^a Hipercromismo resultante da interação das sondas fluorescentes fixadas em 1mM de GLDL 06 e GLDL 07 com a BSA em variadas concentrações (10-100 μ M).

^b Coeficiente de correlação.

Conforme mostrado na tabela 11 acima, os comprimentos de onda relacionados aos picos máximos de absorção observados para o GLDL 06 e GLDL 07 livres foram de 278 nm para ambos os compostos. Após o processo de interação, nota-se que os picos máximos do GLDL 06 e GLDL 07 sofreram deslocamento atingindo 268 nm e 269 nm, respectivamente.

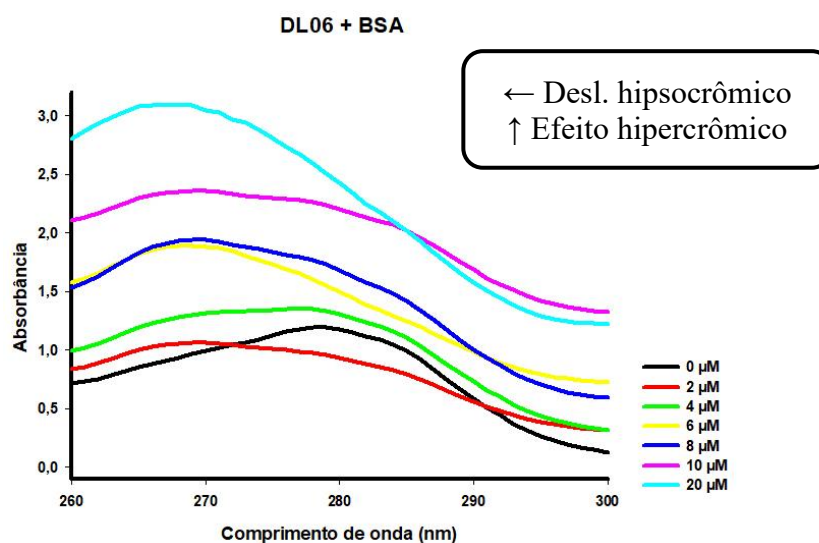
Logo, o pico máximo absorptivo do GLDL 06 foi deslocado para a região espectral azul (hipsocromismo) (10 nm). Bem como, o pico máximo absorptivo do GLDL 07 também apresentou um desvio para a região espectral azul (hipsocromismo) (09 nm). Pois, ambos apresentaram diminuição no comprimento de onda máxima de ligação. Essa diminuição do comprimento de onda, por sua vez, pode ser atribuída a interação com a estrutura terciária da BSA que leva à alteração no ambiente hidrofóbico do triptofano, causando supressão de fluorescência, ou seja, esses resultados indicam a formação de um complexo entre os compostos e a biomolécula (FILHO et al., 2019).

Também é possível observar que as sondas intercalativas usadas no referido ensaio não apresentaram hipocromismo (diminuição do pico máximo). Contudo, as sondas mostraram um hiperromismo (aumento do pico máximo) de 40% para o GLDL 06 e 50% para o GLDL 07.

Para melhor avaliar a interação BSA-GLD L06 e BSA-GLDL 07, os dados de absorção foram usados para calcular a constante de ligação (K_b). Os valores de K_b foram 1.87×10^5 e $1.21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que indica uma boa afinidade com a proteína BSA (FILHO et al., 2019).

O espectro de absorção do GLDL 06 na presença de BSA está representado na figura, a seguir:

Figura 42– Espectro de fluorescência comparando a extinção da fluorescência da BSA (10 μM) na presença de concentrações crescentes do GLDL 06

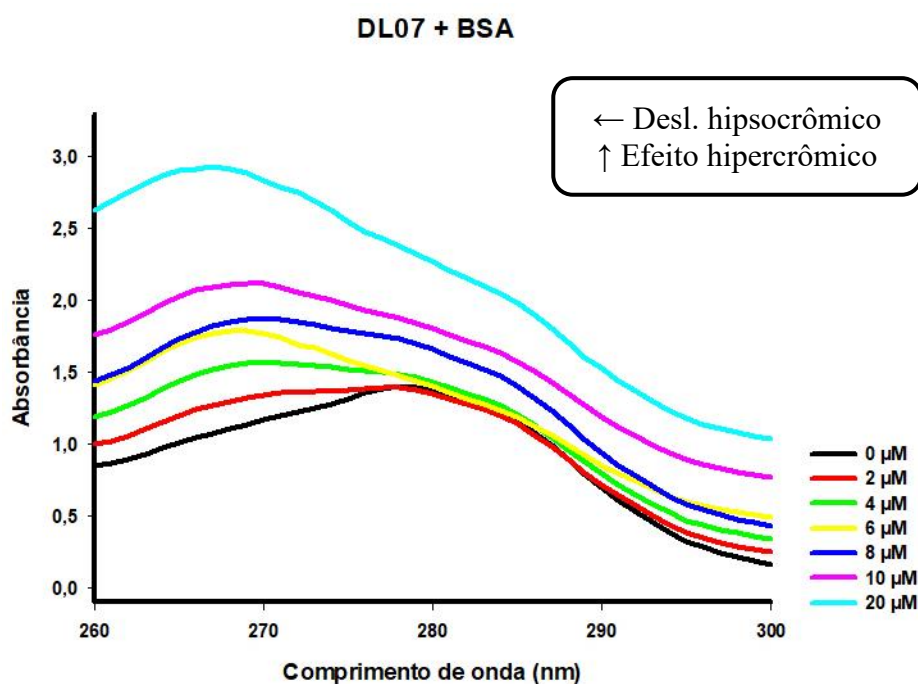


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Mantendo a concentração da BSA fixada em 10 μM e adicionando concentrações crescentes do GLDL 06, verificou-se que as bandas de absorção aumentaram (hipercromismo) à medida que aumentou a concentração do GLDL 06. Esses resultados indicaram a formação de um complexo composto-BSA.

O espectro de absorção do GLDL 07 na presença de BSA está representado na figura, a seguir:

Figura 43– Espectro de fluorescência comparando a extinção da fluorescência da BSA (10 μM) na presença de concentrações crescentes do GLDL 07



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Mantendo a concentração da BSA fixada em 10 μM e adicionando concentrações crescentes do GLDL 07, verificou-se que as bandas de absorção aumentaram (hipercromismo) à medida que aumentou a concentração do GLDL 07. Esses resultados indicaram a formação de um complexo composto-BSA.

Através desses dados espectroscópicos é possível verificar que a interação existente entre os compostos (GLDL 06 e GLDL 07) com a albumina são bem próximas. Entretanto, como já discutido anteriormente, o composto GLDL 07 interagiu melhor com o alvo (aumento do pico máximo em 50%) quando comparado com o GLDL 06 (aumento do pico máximo de 40%).

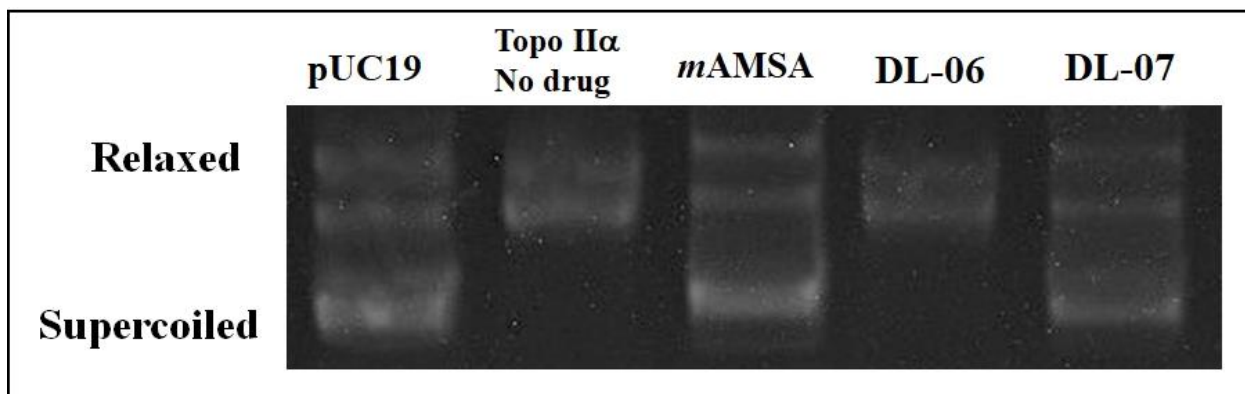
Esses dados obtidos da análise da interação *in vitro* dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com a albumina concordam com os resultados *in silico* previamente realizados, em que, no *docking* molecular, o composto GLDL 07 (ΔG -9,42 Kcal mol⁻¹ / Ki 125,37 nM) apresentou uma maior interação e afinidade com a albumina do que o GLDL 06 (ΔG -9,04 Kcal mol⁻¹ / Ki 235,73 nM). A dinâmica molecular também corrobora com esses resultados, em que, o composto GLDL 07 se apresentou melhor estabilizado e além disso, realizou maior número de ligações de hidrogênio com a albumina (5-6 ligações de hidrogênio ocorrendo a predominância de 3 ligações de hidrogênio) quando comparado com o GLDL 06 (4 ligações de hidrogênio com predominância de 3 ligações de hidrogênio). Portanto, a diferença de energia livre de ligação e constante de afinidade no *docking*, bem como, a quantidade de ligações de hidrogênio na dinâmica foi relativamente pequena, assim como nos estudos *in vitro*.

Esses dados obtidos concordam com análises já publicadas. Silva e colaboradores (2018) constataram através de estudos *in vitro* que quando adicionadas quantidades crescentes de derivados de acridina, observa-se uma diminuição gradual da intensidade de fluorescência de HSA, indicando que estes compostos se ligam à proteína, suprimindo a fluorescência intrínseca da proteína.

5.7 Ensaio de inibição da Topoisomerase II α humana

As enzimas topoisomerasas são essenciais para a proliferação celular, sobrevivência e apoptose, pois estas conduzem uma quebra transitória nas fitas de DNA, sendo essenciais para a transcrição e replicação.

O relaxamento do plasmídeo PUC19 foi estudado com eletroforese em gel de agarose e comparado com o controle positivo amsacrina (*m*-AMSA) para investigar o efeito na Topoisomerase II α humana (Figura 44). O objetivo do experimento foi determinar se os derivados poderiam ou não afetar o desenovelamento do DNA super-enovelado. Também foram realizados os testes de inibição da topoisomerase II com os compostos GLDL 06 e GLDL 07, afim de comparar o efeito dos grupamentos químicos na inibição desta enzima, como mostra a tabela 12.

Figura 44 – Ensaio de inibição da topoisomerase II α humana

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Conforme demonstrado na figura 44, os compostos GLDL 06 (DL-06) e GLDL 07 (DL-07) apresentaram atividade inibidora de Topoisomerase II α quando comparados com o padrão amsacrina (*m*-AMSA) com diferentes graus de inibição como podemos visualizar na tabela 12, a seguir:

Tabela 12 – Densidade óptica de inibição da Topoisomerase II α

Compostos	Porcentagem de inibição enzimática
AMSACRINA	100%
GLDL 06 (DL-06)	54%
GLDL 07 (DL-07)	92%

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através dessa análise é possível observar o controle positivo (amsacrina) apresentou inibição enzimática máxima de 100%. Quando se compara os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (GLDL06 e GLDL 07) conclui que o composto GLDL 07 exibiu uma melhor inibição de topoisomerase (92%) do que o composto GLDL 06 (54%), o qual pode estar relacionado com os diferentes substituintes na estrutura química da molécula, podendo alterar suas propriedades físico-químicas e/ou farmacológicas.

Ao correlacionar esse ensaio de inibição da Topoisomerase II α humana com os estudos computacionais de *docking* observamos que os resultados coincidem, pois, assim como nos estudos *in vitro*, a amsacrina apresentou uma maior interação e afinidade com o alvo (ΔG - 10,71 Kcal mol⁻¹/ Ki 14,22 nM), seguido do composto GLDL 07 (ΔG -10,34 Kcal mol⁻¹/ Ki 26,4 nM), e por fim, o GLDL 06 que apresentou o ΔG -9,99 Kcal mol⁻¹ e a Ki 47,91 nM. Analisando a dinâmica molecular concluímos também que o GLDL 07 apresentou resultados mais promissores quando comparado com o GLDL 06.

5.8 Estudos preditivos farmacocinéticos (ADMET)

Na busca de novos compostos contra o câncer a semelhança com fármacos e propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox) destas com os candidatos a futuros fármacos devem ser considerados.

5.8.1 Propriedades físico-químicas

Um dos pontos que corrobora com a possibilidade da administração oral dos compostos testados é o cumprimento a regra de Lipinski e de Veber, avaliados com auxílio da ferramenta SwissADME, que fornece informações sobre um possível perfil *Drug Likeness* desses compostos, ou seja, o quão "semelhante a uma droga" é uma substância. (LIPINSKI et al., 2001; VEBER et al., 2002).

Tabela 13 – Propriedades físico-químicas

Compostos	REGRA DE LIPINSKI						REGRA DE VEBER			
	Peso molecular (g/mol)		Aceptores de lig. de H		Doadores de lig. de H		Núm. de lig. rotacionáveis		TPSA (Å ²)	
	SWISS ADME	pK-CSM	SWISS ADME	pK-CSM	SWISS ADME	pK-CSM	SWISS ADME	pK-CSM	SWISS ADME	pK-CSM
GLDL 06	434,94	434,95	3	4	2	2	6	4	90,63	184,27 (*)
GLDL 07	436,91	436,92	4	5	3	3	6	4	110,86	182,70 (*)
AMSACRINA	393,46	393,46	4	5	2	2	5	5	79,47	162,77 (*)
ETOPOSÍDEO	572,56 (*)	588,56 (*)	12 (*)	13 (*)	2	3	5	5	140,60 (*)	240,22 (*)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Nota: (*) violação das regras de Lipinski e Veber.

Através da tabela acima observamos que só o etoposídeo que viola a primeira regra de Lipinski, em que, apresenta o peso molecular maior que 500 g/mol. Em relação a quantidade de aceptores de ligação de hidrogênio, só ocorre violação da regra pelo etoposídeo apresentando valores maiores que dez. Observamos também que nenhum composto violou a regra de Lipinski no parâmetro de doador de ligação de hidrogênio. Em relação ao Log P descrito na tabela 14 a seguir, é possível observar que o GLDL 06 e amsacrina apresentaram Log P de 5,49 e 5,29, respectivamente. E assim, violaram uma das regras de Lipinski, em que, o Log P deve ser menor que 5.

Já em relação a regra de Veber é possível analisar através dos dados obtidos do SwissADME e pK-CSM que nenhum composto violou o parâmetro de número de ligações

rotacionáveis. Em contrapartida, na análise da área de superfície polar topológica ocorreu violação pelo etoposídeo como vemos na tabela 13 emitida pelo SWISSADME. E através dos dados gerados pelo pk-CSM observamos que todos os compostos violaram a regra de Veber, em que, apresentaram uma área de superfície polar maior que 140 \AA^2 .

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos através da plataforma SwissADME podemos observar que o GLDL 07 não violou nenhuma das regras de Lipinski e Veber. O GLDL 06 por sua vez violou uma regra de Lipinski (Log P), assim como a amsacrina, que é um fármaco já utilizado na clínica. Essa violação é aceitável, visto que, os compostos podem apresentar no máximo 1 violação a todos os parâmetros da regra de Lipinski. Além disso, o GLDL 06 e a amsacrina não violaram as regras de Veber. Desse modo, conclui-se que o GLDL 06 e o GLDL 07 são compostos *Drug Like*.

5.8.2 Estudos preditivos de absorção

A absorção de um fármaco depende de diversos fatores entre eles a solubilidade em água, a lipofilicidade e absorção intestinal, avaliados através das ferramentas SwissADME e pK-CSM. Os resultados preditivos para os parâmetros de absorção dos compostos estudados estão descritos na tabela 14 e tabela 15.

Tabela 14 – Estudos preditivos farmacocinéticos de absorção pela plataforma SWISSADME

ABSORÇÃO			
SWISSADME			
Compostos	Log S (ali)	Log P (w LOGP)	Absorção intestinal humana
GLDL 06	-7,07 (pouco solúvel)	5,49	Alto
GLDL 07	-6,75 (pouco solúvel)	4,89	Alto
AMSACRINA	-5,06 (moderadamente solúvel)	5,29	Alto
ETOPOSÍDEO	-4,14 (moderadamente solúvel)	2,04	Baixo

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Tabela 15 – Estudos preditivos farmacocinéticos de absorção pela plataforma pK-CSM

Compostos	ABSORÇÃO		
	Solubilidade em água (log mol/L)	Absorção intestinal (humana) (% absorvido)	Permeabilidade da pele (log Kp)
GLDL 06	-4,498	92,557	-2,741
GLDL 07	-3,885	90,003	-2,735
AMSACRINA	-4,772	93,366	-2,734
ETOPOSÍDEO	-3,852	83,142	-2,735

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Para projetos de descoberta visando a administração oral, a solubilidade é uma propriedade importante que influencia diretamente a absorção e distribuição dos futuros fármacos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Do mesmo modo que o Log P, a solubilidade aquosa de um medicamento é um fator importante que afeta sua biodisponibilidade. Inúmeros métodos computacionais foram desenvolvidos para a previsão de solubilidade aquosa a partir da estrutura de um composto, e três são disponibilizados pelo SwissADME: ESOL, Ali e SILICOS-IT. Os resultados são expostos na tabela 14, de modo que a solubilidade é definida de acordo com o seguinte parâmetro, por meio do resultado de Log S: insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < solubilidade moderada < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente solúvel.

Ao analisar os parâmetros de Log S (ali) da tabela 14 emitidos pela plataforma SwissADME observamos que etoposídeo e amsacrina são classificados como compostos moderadamente solúveis e os derivados tiossemicarbazônicos- acridínicos (GLDL 06 e GLDL 07) como pouco solúveis. Ou seja, quanto mais o Log S se aproxima do zero mais solúvel será o composto.

Já observando os parâmetros da tabela 15 emitidos pela plataforma pK-CSM é possível pontuar que os compostos que apresentaram maior solubilidade foram o etoposídeo e o GLDL 07. Contudo, o composto que apresentou menor solubilidade foi a amsacrina.

A lipofilicidade foi avaliada usando o logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água (LogPo/w) que está intimamente relacionado aos processos de transporte, incluindo a permeabilidade da membrana e distribuição para diferentes tecidos e órgãos. Segundo Domínguez-Villa, Durán-Iturbide e Ávila-Zárraga (2021) para uma boa biodisponibilidade oral (boa permeabilidade e solubilidade) é preciso ter um logPo/w moderado ($0 < \log P < 3$). Para nossos compostos, os valores previstos de logPo/w foram de 5,49 para o GLDL 06 e 4,89 para o GLDL 07, em que o composto da série que mais se aproximou do valor ideal foi o GLDL 07. Contudo, podemos observar também por predição, que o GLDL 07

apresentou uma melhor biodisponibilidade oral, do que a amsacrina que é um fármaco já utilizado na clínica com atividade antitumoral.

Em relação ao último parâmetro analisado através da plataforma SwissADME foi observado que ambos os compostos da série GLDL apresentaram uma alta absorção intestinal, assim como, a amsacrina. Todavia, o etoposídeo demonstrou uma baixa absorção intestinal.

5.8.3 Estudos preditivos de distribuição

A distribuição dos medicamentos em diferentes compartimentos no corpo foi avaliada, com auxílio da ferramenta pK-CSM, através da glicoproteína P (P-gp), da permeabilidade na barreira hematoencefálica (LogBHE) e permeabilidade no sistema nervoso central LogPS, conforme a tabela 16.

Tabela 16 – Estudos preditivos farmacocinéticos de distribuição pela plataforma pK-CSM

DISTRIBUIÇÃO			
pK-CSM			
Compostos	P-gp: substrato e inibição, respectivamente (Sim/Não)	Log BHE (log BHE)	Log PS (log PS)
GLDL 06	Sim; sim	-0,024	-1,593
GLDL 07	Sim; sim	-1,118	-1,858
AMSACRINA	Sim; sim	-0,21	-2,058
ETOPOSÍDEO	Sim; não	-1,858	-4,007

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A glicoproteína-P está presente em diversos tecidos como fígado, pâncreas, rins, cólon, entre outros, e atua como uma bomba de secreção dos fármacos, sendo importante marcador para distribuição de fármacos nestes tecidos. E essa distribuição está relacionada com a resistência a múltiplas drogas. Portanto, é importante que fármacos antineoplásicos sejam inibidores dessas glicoproteínas. Para que diminua os casos de reincidência do câncer e, conseqüente um mau prognóstico.

Através da tabela 16 acima, observa-se que os compostos GLDL 06, GLDL 07 e a amsacrina são substratos e inibidores da P-gp podendo ter resultados benéficos de distribuição ou secreção em determinados tecidos, como também diminuição de reações adversas ou efeitos em determinados órgãos por inibir esta proteína. Para determinar exatamente quais as futuras conseqüências são necessários estudos mais aprofundados em cada tecido alvo e tipos de P-gp presentes. O etoposídeo é apenas substrato da P-gp o que pode reduzir sua distribuição.

A barreira hematoencefálica (BHE) funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central (SNC), dessa forma, é uma barreira importante na proteção do SNC. É formada principalmente por endotélio cerebral, que pode prevenir a entrada de moléculas maiores (100%) e pequenas (98%) no SNC, mas também permite a passagem de moléculas pequenas solúveis e através de transportadores específicos (DURÁN-ITURBIDE, DÍAZ-EUFRACIO, MEDINA-FRANCO, 2020).

O GLDL 06 e a amsacrina apresentam moderada capacidade de permear a barreira hematoencefálica por apresentarem valores de LogBB próximos de 0 (-0,024 para GLDL 06 e -0,21 para amsacrina) o que permite uma possível ação no sistema nervoso central. Por outro lado, o composto GLDL 07 (LogBB -1,118) e principalmente, o etoposídeo (LogBB -1,858) são considerados mal distribuídos para o cérebro por apresentar LogBB <-1, sugerindo menor efeito no sistema nervoso central. Atravessam prontamente a barreira hematoencefálica aqueles compostos com LogBB >0,3.

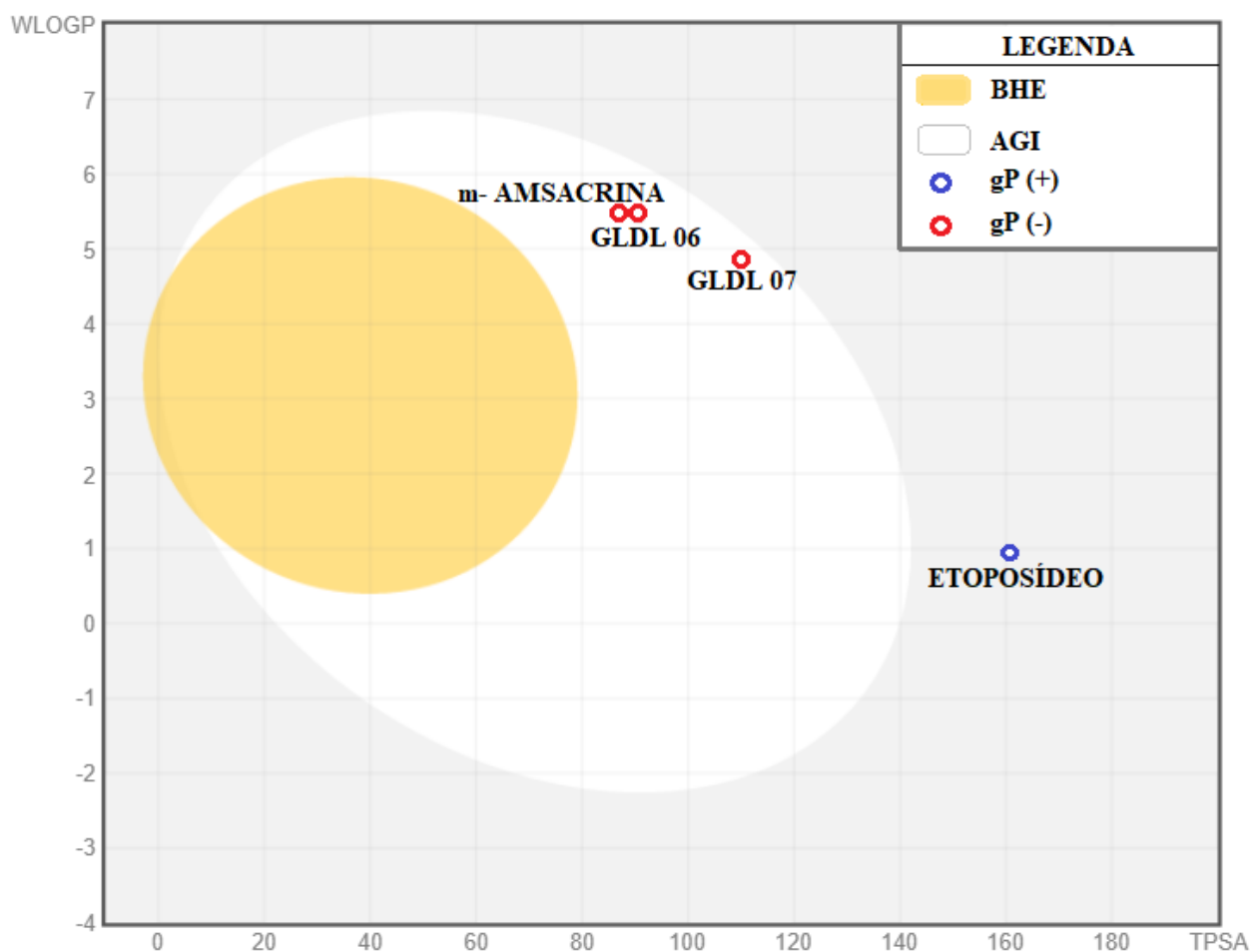
A permeabilidade ao sistema nervoso central também pode ser avaliada através do parâmetro LogPS que avalia a permeabilidade advinda da relação sangue-cérebro. São considerados penetrantes no sistema nervoso central compostos com logPS >-2, enquanto aqueles que apresentam LogPS <-3 são considerados incapazes de penetrar. Os dados de LogPS dos compostos sugeriram que o etoposídeo (LogPS -4,007) é incapaz de penetrar a BHE, como visualizado na figura 45 pelo modelo de *Boiled-egg*. Já em relação aos compostos estudados (GLDL 06 e GLDL 07) através dos resultados obtidos pela plataforma pK-CSM (tabela 16) é possível observar que o logPS do GLDL 06 foi de -1,593 e do GLDL 07 foi de -1,858, em que, pode-se inferir que ambos os compostos são penetrantes no sistema nervoso central diferindo do resultado encontrado pelo modelo de *Boiled-egg* via *SwissADME*. Do ponto de vista de fármacos antitumorais para neoplasias de SNC esse dado seria positivo. Entretanto, do ponto de vista de antineoplásicos para diversos outros tipos de câncer esse dado é negativo, pois, ao penetrar o sistema nervoso central, o fármaco pode causar neurotoxicidade.

De acordo com Daina e Zoete (2016) modelo do *boiled-egg* (ovo cozido) avalia dois comportamentos farmacocinéticos cruciais no processo de descobertas de fármacos são elas: absorção gastrointestinal e o acesso ao cérebro. Dessa forma, pode-se prever o comportamento de estruturas químicas de baixa massa molecular a partir do cálculo da lipofilicidade e de polaridade. Este modelo pode ser aplicado a uma variedade de configurações durante a seleção de compostos de uma quimioteca nas etapas iniciais do estudo pré-clínico.

Com relação ao comportamento dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 observa-se uma alta probabilidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal, porém, não permeiam a

barreira hematoencefálica (BHE), o mesmo ocorre para a amsacrina. Já o etoposídeo apresenta uma baixa probabilidade de ser absorvido pelo trato gastrointestinal e principalmente de atravessar a membrana hematoencefálica (Figura 45).

Figura 45 – Perfil de distribuição dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 e controles positivos (amsacrina e etoposídeo) pelo modelo *in silico* (Boiled-egg) via SwissADME



Fonte: adaptado de SwissADME (2019).

Nota: BHE (barreira hematoencefálica);

AGI (absorção gastrointestinal);

gP (substrato de proteína G+ ou -).

Estes estudos são importantes, pois, a barreira hematoencefálica (BHE) é um dos mecanismos de proteção mais essenciais no sistema nervoso central (SNC), permitindo seletivamente a passagem de pequenas moléculas lipossolúveis através da membrana endotelial capilar e limitar a passagem de agentes patogênicos e toxinas. Apesar da BHE ser indispensável no mecanismo de defesa, também é um obstáculo durante o estado de doença, uma vez que limita o fornecimento de medicamento a área cerebral (UPADHYAY, 2014; ZHOU et al. 2018), no caso por exemplo, de doenças como gliomas cerebrais.

Através da figura 45 também pode-se observar que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 não são possíveis substratos da glicoproteína P (gp-P) ou proteína de resistência a múltiplas drogas. Essa informação é relevante devido a atuação da gp-P como bomba de efluxo, impedindo que a substância atinja a concentração terapêutica no corpo humano, ou permeie a barreira HE. Com relação ao mecanismo de reconhecimento do substrato/não substrato pela gp-P ainda se permanece incerto, entretanto há estudos que sugerem locais específicos na cavidade de ligação principal importantes na ativação da enzima (AZEREDO; UCHÔA; COSTA, 2009; MUKHAMETOV; RAEVSKY, 2017; MONTANARI; ECKER, 2015).

5.8.4 Estudos preditivos de metabolismo

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos fármacos, no entanto, todos os tecidos do corpo são capazes de metaboliza-los em certo grau. Os locais particularmente ativos incluem a pele, os pulmões, o trato gastrintestinal e os rins. As reações de metabolismo dos fármacos envolvem um sistema de enzimas microssômicas hepáticas P450, dentre estas, cinco (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4) que são responsáveis por aproximadamente 95% do metabolismo oxidativo dos fármacos (GOLAN et al., 2014).

Neste sentido, avaliamos o metabolismo dos compostos GLDL 06, GLDL 07, amsacrina e etoposídeo, tabelas 17 e 18, utilizando as ferramentas *SwissADME* e *pK-CSM*, através das enzimas do citocromo p450, para auxiliar sobre possíveis risco de interações medicamentosas destes compostos.

Tabela 17 – Estudos preditivos farmacocinéticos de metabolismo pela plataforma SWISSADME

METABOLISMO					
SWISSADME					
Compostos	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
GLDL 06	Não	Sim	Sim	Não	Sim
GLDL 07	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
AMSACRINA	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ETOPOSÍDEO	Não	Não	Não	Sim	Não

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Tabela 18 – Estudos preditivos farmacocinéticos de metabolismo pela plataforma pK-CSM

METABOLISMO							
pK-CSM							
Compostos	Substrato CYP2D6	Substrato CYP3A4	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
GLDL 06	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
GLDL 07	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
AMSACRINA	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
ETOPOSÍDEO	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

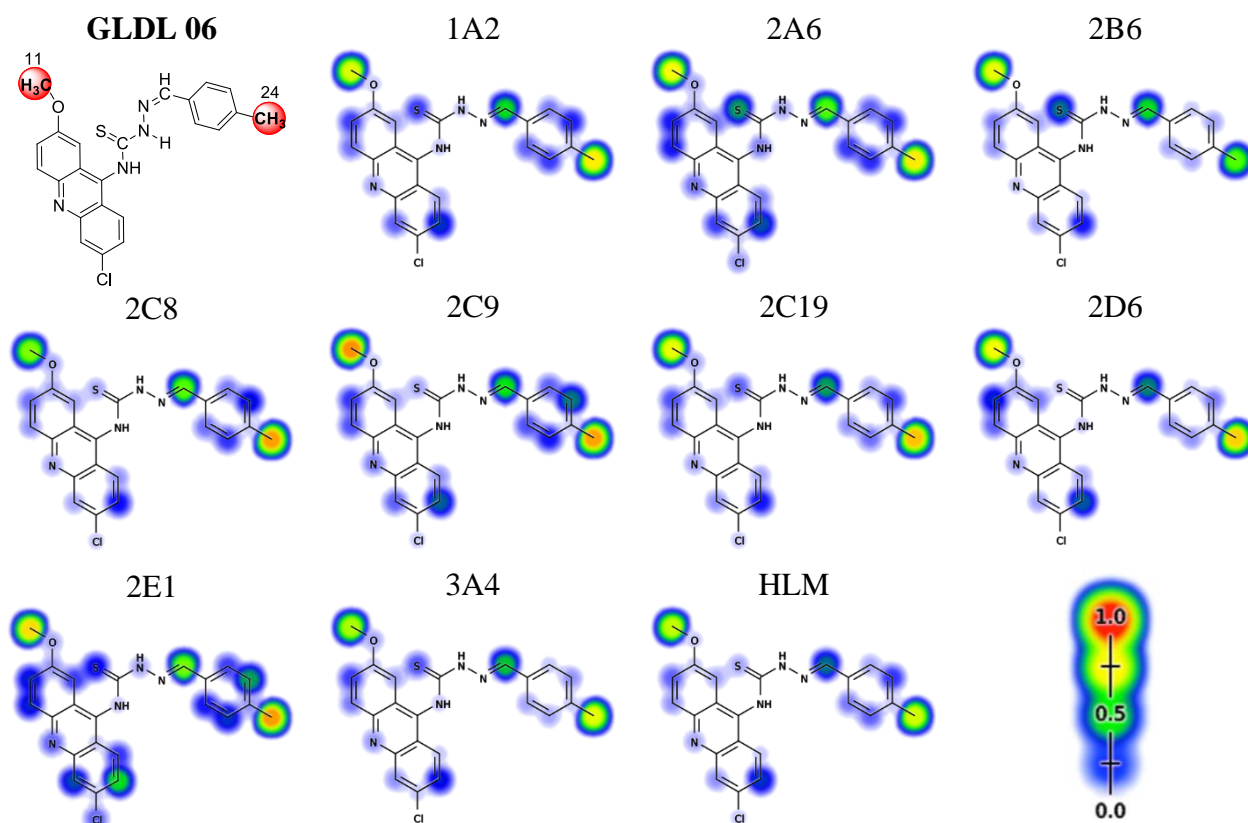
A ferramenta SwissADME permite identificar se as estruturas são inibidoras do sistema enzimático citocromo P450 (CYPs) como observamos na tabela 17, a amsacrina é inibidora de todas as CYPs descritas na tabela. O etoposídeo só inibe a CYP2D6, todavia não é inibidora de CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. Já observando a série GLDL é possível concluir que o GLDL07 só não é inibidor da CYP2D6. Em contrapartida, o GLDL 06 inibe CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4, porém não é inibidora de CYP1A2 e CYP2D6.

Através da tabela 18 (pK-CSM) podemos observar que o composto GLDL 06, GLDL 07, amsacrina e etoposídeo não inibem a enzima CYP2D6, porém todos esses compostos inibem a enzima CYP3A4. O GLDL 06, GLDL 07 e amsacrina inibem as enzimas CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9, entretanto, o etoposídeo não inibe nenhuma das três enzimas. Nenhum dos quatro compostos analisados são substrato para a enzima CYP2D6. Já para a enzima CYP3A4, apenas o GLDL 07 não é substrato desta enzima.

O perfil de interação com as enzimas do citocromo p450, nos fornece dados preciosos de possível perfil para interações medicamentosas, mas não invalida estes compostos como potenciais fármacos, visto que temos no mercado atual diversas substâncias com perfil de interações medicamentosas através da inibição ou indução das CYPs.

O entendimento acerca de como os fármacos são metabolizados também é importante na determinação do perfil farmacocinético e suas interferências na eficácia e segurança dos compostos em estudo. Dessa forma foi utilizado o servidor da web *Xenosite* para prever quais sítios de metabolização dos derivados são modificados durante o metabolismo mediado pela superfamília de enzimas heme CYP. Esse modelo preditivo permite compreender mecanismos farmacológicos ou identificar possíveis falhas de natureza farmacocinética (Figuras 46, 47 e 48).

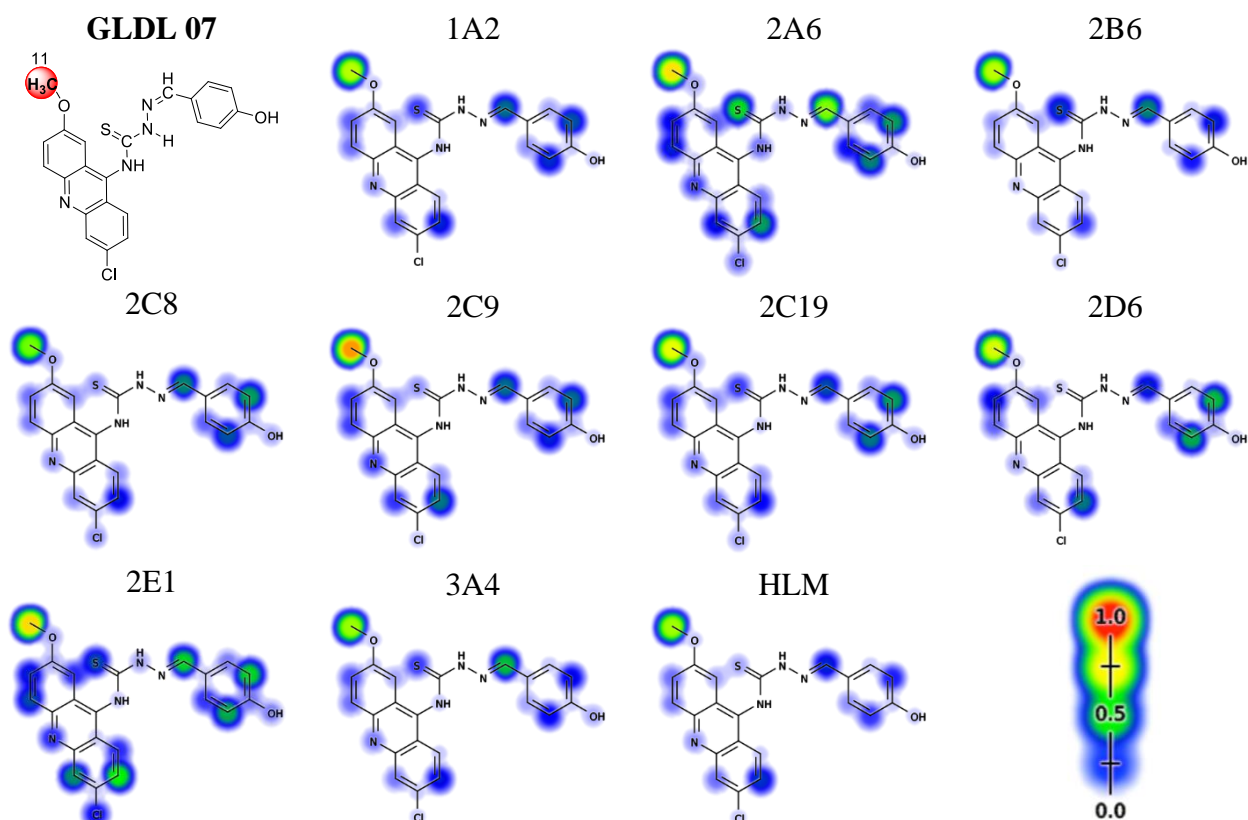
Figura 46 – Predição dos sítios de metabolização do GLDL06 via *Xenosite*



Fonte: adaptado de *Xenosite* (2022).

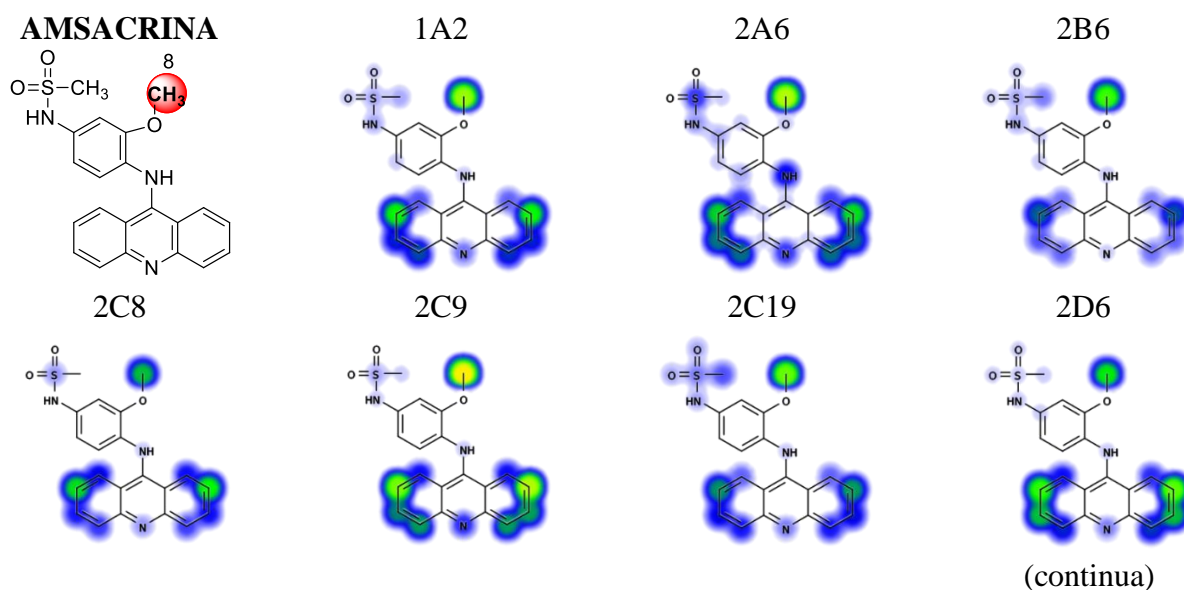
Através do software *Xenosite* foram identificados os pontos mais reativos das moléculas que as tornam mais susceptíveis ao sistema enzimático de metabolização. Logo, cada enzima do citocromo P450 exibe isoformas diferentes e conseqüentemente reatividades diferentes.

Através dessa premissa é possível observar que o composto GLDL 06 apresenta duas regiões de maior reatividade susceptíveis a metabolização, são elas: 11 e 24. Em que, o CH₃ (11) pode sofrer oxidação (metabolismo de fase I), do tipo O-desalquilação. Já o CH₃ (24) inicialmente pode sofrer oxidação e em seguida conjugação com ácido glicurônico, aminoácidos e glicina (metabolismo de fase II).

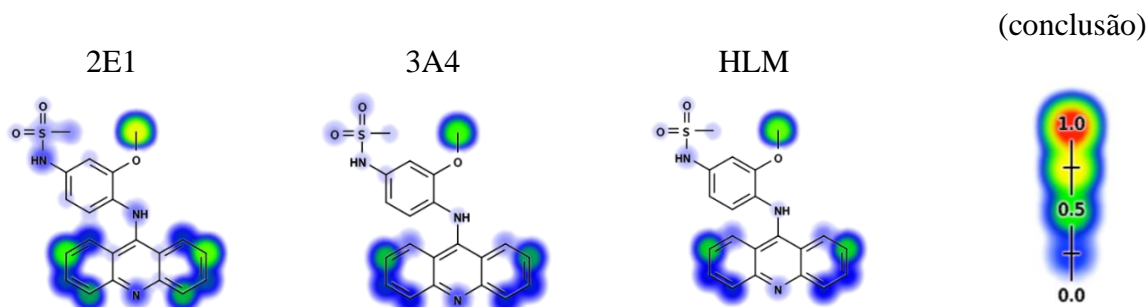
Figura 47 – Predição dos sítios de metabolização do GLDL07 via *Xenosite*

Fonte: adaptado de *Xenosite* (2022).

Para o composto GLDL 07 (B), a região de maior reatividade é o 11. Em que, o CH₃ (11) pode sofrer oxidação, do tipo O-desalquilação.

Figura 48 – Predição dos sítios de metabolização da amsacrina via *Xenosite*

(continua)

Figura 48 – Predição dos sítios de metabolização da amsacrina via *Xenosite*

Fonte: adaptado de *Xenosite* (2022).

Já para a amsacrina, a região mais reativa da molécula é a 8. Em que, o CH₃ (8) é susceptível a oxidação (metabolismo de fase I), do tipo O-desalquilação. Por fim, o sistema enzimático de maior metabolização para os compostos GLDL 06 e GLDL 07 foi a isoforma 2C9. Já para a amsacrina além da isoforma 2C9 é interessante chamar atenção também para a isoforma 2E1.

5.8.5 Estudos preditivos de excreção

A excreção ocorre principalmente como uma combinação da depuração hepática e renal, está relacionado à biodisponibilidade e é importante para determinar taxas de dosagem para atingir concentrações em estado estacionário. A excreção foi prevista pela interação com o substrato do transportador orgânico de Cátions 2 renal (OTC2 renal) e pela depuração total, conforme tabela 19, utilizando a ferramenta online pK-CSM.

Tabela 19 – Estudos preditivos farmacocinéticos de excreção pela plataforma pK-CSM

EXCREÇÃO		
pK-CSM		
Compostos	Substrato OCT2 Renal (Sim/Não)	Depuração total (log mL/min/Kg)
GLDL 06	Não	0,08
GLDL 07	Não	-0,093
AMSACRINA	Não	0,252
ETOPOSÍDEO	Não	0,015

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

Através da tabela acima é possível inferir que nenhum dos compostos foram substrato para o OCT2 renal e a depuração total dos compostos variou de -0,093 a 0,252 ml/mim/Kg. Este parâmetro se faz importante para estudos futuros de determinação de dose efetiva e dose tóxica dos compostos.

5.8.6 Estudos preditivos de toxicidade

A determinação da toxicidade dos compostos promissores a fármacos é necessária para identificar seus efeitos prejudiciais em humanos, animais, plantas ou meio ambiente. Testes *in vivo* são limitados pelo tempo e quantidade de animais, envolvendo questões éticas importantes, além de ser de alto custo. Os métodos *in silico* estão cada vez mais sendo utilizados para auxiliar na determinação e predição da toxicidade dos compostos, minimizando falhas e reduzindo custos. Neste sentido comparamos a toxicidade dos compostos GLDL 06 e GLDL 07 com os fármacos amsacrina e etoposídeo, como descritos na tabela a seguir.

Tabela 20 – Estudos preditivos farmacocinéticos de toxicidade pela plataforma pK-CSM

TOXICIDADE			
pK-CSM			
Compostos	Máx. dose tolerada (humano) (log mg/kg/dia)	Hepatotoxicidade (Sim/Não)	Sensibilização da pele (Sim/Não)
GLDL 06	0,699	Sim	Não
GLDL 07	0,801	Sim	Não
AMSACRINA	0,380	Sim	Não
ETOPOSÍDEO	-0,199	Não	Não

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

A concentração terapêutica situa-se entre as concentrações geradoras de efeito mínimo eficaz (limite mínimo) e efeito tóxico (concentração máxima tolerada, limite máximo). A relação entre as concentrações terapêuticas e tóxicas é chamada índice terapêutico (I.T.). Quanto maior for o índice terapêutico (IT), mais seguro será o xenobiótico e maior a “janela terapêutica” do medicamento. Através da tabela 20 observamos que o composto GLDL 07 foi o que apresentou uma maior dose tolerada, seguido do GLDL 06 e depois da amsacrina, ou seja, possivelmente o composto GLDL 07 é o menos tóxico para o corpo humano do que os outros compostos analisados.

Os parâmetros gerados de toxicidade pela plataforma pK-CSM mostraram que o GLDL 06 e GLDL 07 apresentam potencial para causar hepatotoxicidade. No entanto, não invalida estes compostos como promissores para futuros fármacos. Pois, a principal via de administração dos fármacos antitumorais é a intravenosa, como é o caso da amsacrina e do etoposídeo, logo, não passa pelo mecanismo de primeira passagem no fígado para em seguida atingir a circulação sistêmica. Como esses fármacos são de administração intravenosa, o fármaco já é administrado na circulação sanguínea. Logo, apesar da amsacrina demonstrar toxicidade hepática em estudos *in silico* têm formulações aprovadas pelos órgãos competentes e comercializados atualmente.

Assim, reforça-se a necessidade de análises complementares como estudos *in vivo* e ainda com diferentes formulações farmacêuticas que possam minimizar os dados de toxicidade destes compostos. Além disso, apesar desses medicamentos não serem comercializados para que a via de administração seja dérmica, os estudos *in vitro* mostrando que nenhum dos compostos apresentaram sensibilização na pele.

Ao analisar todos os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade, conclui-se que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 apresentam limitações farmacocinéticas, todavia, os fármacos antitumorais, como por exemplo: amsacrina e etoposídeo também exibem limitações farmacocinéticas. E, que o perfil dos compostos tiosemicarbazônicos-acridínicos são bem parecidos com o da amsacrina, que como já falado anteriormente é um medicamento bem elucidado e utilizado para o tratamento de neoplasias. Logo, essas moléculas são promissoras, pois, além de apresentarem resultados significativos nos estudos computacionais e *in vitro*, elas apresentam uma maior dose tolerada no organismo humano quando comparado com a amsacrina e o etoposídeo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que comparando os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (GLDL 06 e GLDL07), o composto GLDL 06 apresentou maior interação nos estudos *in vitro* com o DNA concordando com os resultados obtidos computacionalmente.

Já para o complexo topoisomerase/DNA, tanto nos estudos *in silico*, como nos testes *in vitro*, o composto GLDL 07 foi mais promissor do que o GLDL 06. Observou-se também que as porções acridínicas desses compostos acoplam no DNA através do mecanismo de intercalação dos pares de base nitrogenadas realizando interações de empilhamento π - π . Enquanto que a porção 4-metil-benzilideno acoplada ao grupamento tiossemicarbazida (GLDL 06) e a porção 4-hidro-benzilideno acoplada ao grupo tiossemicarbazida (GLDL 07), regiões de maior flexibilidade das moléculas ficam mais livres para interagirem com a enzima topoisomerase II.

Para os estudos *in vitro* na albumina bovina, o composto GLDL 07 apresentou maior interação comparado com o GLDL 06. Esse resultado corroborou com os estudos *in silico*. Porém, os dados obtidos do GLDL 07 revelaram valores aproximados do GLDL 06 em todas as análises.

Ao analisar os resultados farmacocinéticos *in silico* concluiu-se que o GLDL 07 não violou nenhuma das regras de Lipinski e Veber. O GLDL 06 por sua vez violou uma regra de Lipinski (Log P), assim como a amsacrina. Desse modo, conclui-se que o GLDL 06 e o GLDL 07 são compostos *Drug Like*. Além disso, esses compostos apresentam uma maior dose tolerada nos organismos humanos do que a amsacrina e o etoposídeo.

Por fim, o planejamento molecular para descoberta de novas entidades químicas com possíveis atividades antitumorais é de suma importância para que se obtenha compostos mais eficazes e com menores efeitos colaterais. Por tanto, através dos resultados apresentados durante o trabalho pode-se concluir que os compostos GLDL 06 e GLDL 07 são compostos promissores para o tratamento de neoplasias e, desse modo, faz-se necessário mais estudos e aprimoramentos dessas moléculas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, Amsterdam, v. 1-2, p. 19-25, Sept. 2015.
- ABULKHAIR, H. S.; TURKY, A.; GHIATY, A.; AHMED, H. E. A.; BAYOUMI, A. H. Novel triazolophthalazine-hydrazone hybrids as potential PCAF inhibitors: design, synthesis, *in vitro* anticancer evaluation, apoptosis, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 100, n. 103899, July 2020.
- AGI, L. L. F.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, D. G. The influence of BRCA1 and BRCA 2 genes in the diagnosis and prognosis of breast carcinoma. **Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências e Educação**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 743–753, Sept. 2022.
- ALBINO, S. L. **Desenvolvimento e avaliação preliminar de novos derivados espiro-acridínicos com potencial atividade antileishmania**. 2017. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.
- ALBINO, S. L. **Planejamento, síntese e avaliação do perfil quimioterápico de derivados tiosemicarbazônicos hibridizados a núcleos heterocíclicos**. 2020. 251f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.
- ALKORTA, I.; ROZAS, I.; ELGUERO, J. Non-conventional hydrogen bonds. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 27, n. 2, p. 163-170, 1998.
- ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, L. P. B. G.; AMORIN, C. A. C.; OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; LIMA, M. C. A.; JÚNIOR, L. B. C. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, June 2015.
- 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.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; LIMA, M. C. A. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 92, p. 467-475, Nov. 2016.
- AL-OMARY F. A.M.; HASSAN G. S.; EL-MESSERY S. M.; EL-SUBBAGH H. I. Substituted thiazoles V. synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3-*b*]quinazoline and pyrido[4,3-*d*]thiazolo[3,2-*a*]pyrimidine analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 47, p. 65-72, Jan. 2012.
- ALPHONSA, T. A. (E)-1-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl)-3-phenyl prop-2-en-1-ones: design, synthesis, anti-cancer activity and molecular docking studies. **Chemical Data Collections**, [s. l.], v. 25, n. 100310, Feb. 2020.

ALVES, J. E. F.; LUCENA, M. L. C.; LUCENA, A. E. S.; MERCES, A. A. D.; AZEVEDO, R. D. S.; SOUSA, G. L. S.; MOURA, R. O.; LIMA, M. C. A.; JÚNIOR, L. B. C.; ALMEIDA, S. M. V. A simple method for obtaining human albumin and its use for in vitro interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 192, p. 126-137, Dec. 2021.

ALVES, J. E. F.; OLIVEIRA, J. F.; SOUZA, T. R. C. L.; MOURA, R. O.; JÚNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A.; ALMEIDA, S. M. V. Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 170, p. 622-635, Feb. 2021.

ANITHA, S.; SARANYA, V.; SHANKAR, R.; SASIREKHA V. Structural exploration of interactions of (+) catechin and (–) epicatechin with bovine serum albumin: insights from molecular dynamics and spectroscopic methods. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 348, n. 11802615, Feb. 2022.

ARPUDHAMARY, V.; PRIYA, S.; MANZOOR, M. A. P.; MUBARAKALI, D.; HEMALATHA, S. Apoptotic-inducing factor 1 (AIF1) plays a critical role in cembranoid mediated apoptosis to control cancer: Molecular docking and dynamics study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 101343, Nov. 2019.

AUSTIN, C. A.; MARSH, K. L.; WASSERMAN, R. A.; WILLMORE, E.; SAYER, P. J.; WANG, J. C.; FISHER, M. Expression, domain structure, and enzymatic properties of na active recombinant human dna topoisomerase II β . **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, n. 26, p. 15739-15746, June 1995.

AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 321-326, 2009.

BALIWADA, A.; RAJAGOPAL, K.; VARAKUMAR, P.; RAMAN, K.; BYRAN, G. A review on acridines as antiproliferative agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 22, n. 21, p. 2769-2798, Aug. 2022.

BODDU, L.; PAGUDALA, A. K.; GANDAMALLA, D.; BALABADRA, S.; MANGA, V.; REDDY, Y. N.; SUBHASHINI, N. J. P. Synthesis, anticancer activity and docking studies of N-phenyl-2-(2-((4-phenyl piperazin-1-yl) methyl)-1H-benzo [d] imidazol-1-yl) acetamides. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1166, p. 362-368, Aug. 2018.

BRELA, M. Z.; DIDOVETS, Y.; BOCZAR, M.; SATO, H.; NAKAJIMA, T.; WÓJCIK, M. J. The hydrogen bond interaction dynamics in polyvinylphenol: studied by born-oppenheimer molecular dynamics. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 805, Oct. 2022.

CASTAGNA, R.; DONINI, S.; COLNAGO, P.; SERAFINI, A.; PARISINI, E.; BERTARELLI, C. Biohybrid electrospun membrane for the filtration of ketoprofen drug from water. **ACS Omega**, Washington, v. 4, n. 8, p. 13270–13278, Aug. 2019.

CHEN, Z.; XU, H.; ZHU, Y.; LIU, J.; WANG, K.; WANG, P.; SHANG, S.; YI, X.; WANG, Z.; SHAO, W.; ZHANG, S. Understanding the fate of an anesthetic, nalorphine upon

interaction with human serum albumin: a photophysical and mass-spectroscopy approach. **RSC Advances**, v. 4, p. 25410-25419, 2014.

CHENG, B.; PAN, W.; XING, Y.; XIAO, Y.; CHEN, J.; XU, Z. Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 230, n. 114109, Feb. 2022.

COCCO, D. R.; SOUZA, M. R.; ALARCON, S. P.; KURITA, V. R. Use of computational methods for pharmacological and toxicological analysis of Velutin. **Journal of Medicine and Health Promotion**, [Patos], v. 5, n. 2, p. 88-99, Abr/Jun. 2020.

CZARNECKA, K.; LISIECKI, P.; SZEWCZYK, E.; CHUFAROVA, N.; WÓJTOWICZ, P.; KRĘCISZ, P.; SZYMAŃSKI, P. New acridine derivatives as promising agents against methicillin-resistant staphylococci - From tests to in silico analysis, **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 88, Jun. 2020.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 11, n. 11, p. 1117-1121, June 2016.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, n. 42717, p. 1-13, Mar. 2017.

DOMÍNGUEZ-VILLA, F. X.; DURÁN-ITURBIDE, N. A.; ÁVILA-ZÁRRAGA, J.G. Synthesis, molecular docking, and in silico ADME/Tox profiling studies of new 1-aryl-5-(3-azidopropyl)indol-4-ones: Potential inhibitors of SARS CoV-2 main protease, **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 106, n. 104497, Jan. 2021.

DREW, H.R.; WING, R.M.; TAKANO, T.; BROKA, C.; TANAKA, S.; ITAKURA, K.; DICKERSON, R.E. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 2179-2183, Apr. 1981.

DURÁN-ITURBIDE, N. A.; DÍAZ-EUFRACIO, B. I.; MEDINA-FRANCO, J. L. In silico ADME/Tox profiling of natural products: a focus on BIOFACQUIM. **ACS Omega**, Washington, v. 5, n. 26, p. 16076-16084, June 2020.

FILHO, F. A. S.; SOUZA, T. F.; RIBEIRO, A. G.; ALVES, J. E. F.; OLIVEIRA, J. F.; SOUZA, T. R. C. L.; MOURA, R. O.; LIMA, M. C. A.; JUNIOR, L. B. C.; ALMEIDA, S. M. V. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 138, p. 582-589, Oct. 2019.

FRAGA, C. A. M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. O paradigma atual da química medicinal: descoberta racional do composto-protótipo. In: MONTANARI, C. A. (Org.). **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. cap. 2.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, [Oxford], v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GEYER, C. E.; FORSTER, J.; LINDQUIST, D.; CHAN, S.; ROMIEU, C. G.; PIENKOWSKI, T.; SKARLOS, D.; CAMPONE, M.; DAVIDSON, N.; BERGER, M.; OLIVA, C.; RUBIN, S. D.; STEIN, S.; CAMERON, D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 355, n. 26, p. 2733-2743, Dec. 2006.

GILAD, Y.; SENDEROWITZ H. Docking studies on DNA intercalators. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 54, n. 1, p. 96-107, Jan. 2014.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN JR. A. H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG A. W. Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2014.

GOMES, J. N. S. **Estudo *in silico* de derivados acridínicos com potencial atividade antitumoral**. 2019. 108 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

GOMES, J. N. S.; SANTOS, M. B.; DE MEDEIROS E SILVA, Y. M. S. M.; ALBINO, S. L.; DE MOURA, R. O. Topoisomerase enzyme inhibitors as potential drugs against cancer: what makes them selective or dual? - A review. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 28, n. 34, p. 2800-2824, Sept. 2022.

GOUVEIA, R. G. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos**. 2017. 129 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

GOUVEIA, R. G.; RIBEIRO, A. G.; SEGUNDO, M. Â. S. P.; OLIVEIRA, J. F.; LIMA, M. C. A.; SOUZA, T. R. C. L.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURA, R. O. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 26, n. 22, p. 5911-5921, Dec. 2018.

GROMOVA, I.; BIRSACK, H.; JENSEN, S.; NIELSEN, O. F.; WESTERGAARD, O.; ANDERSEN, A. H. Characterization of DNA topoisomerase II α / β heterodimers in HeLa cells. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 16645-16652, 1998.

GUI, P.; BIVONA, T. G. Evolution of metastasis: new tools and insights. **Trends in Cancer**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 98-109, Feb. 2022.

GURRAPU, N.; KUMAR, E. P.; KOLLURI, P. K.; PUTTA, S.; SIVAN, S. K.; SUBHASHINI, N. J. P. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 1,2,3-triazole tethered chalcone hybrids as potential anticancer agents. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1217, n. 128356, Oct. 2020.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 18, n. 12, p. 1463– 1472, Sept. 1997.

HOLANDA, V. N.; DA SILVA, W. V.; NASCIMENTO, P. H.; SILVA, S. R. B.; CABRAL FILHO, P. E.; ASSIS, S. P. O.; SILVA, C. A.; OLIVEIRA, R. N.; FIGUEIREDO, R. C. B.

- Q.; LIMA, V. L. M. Antileishmanial effects of 4-phenyl-1-[2-(phthalimido-2-yl)ethyl]- 1H-1,2,3-triazole (PT4) derivative on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*: In silico ADMET, in vitro activity, docking and molecular dynamic simulations. **Bioorganic Chemistry**, Amsterdam, v. 1, n. 104437, p. 1-48, Nov. 2020.
- HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, Berlin, v. 13, n. 10, p. 714-726, Oct. 2013.
- HONORIO, K. M.; MODA, T. L.; ANDRICOPULO, A. D. Pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling in drug discovery. **Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 9, n. 2, p. 163-176, Mar. 2013.
- HORNAK V, ABEL R, OKUR A, STROCKBINE B, ROITBERG A, SIMMERLING C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 712–725, Nov. 2006.
- HUANG, R.; ZHOU, P. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 6, n. 254, Jul. 2021.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, New York, v. 14, n. 1, p. 33-38, Feb. 1996.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120 p.
- ISMAIL, S. Y.; UZAIRU, A. In silico QSAR and molecular docking studies of sulfur containing shikonin oxime derivatives as anti-cancer agent for colon cancer. **Radiology of Infectious Diseases**, [Beijing], v. 6, n. 3, p. 108-121, Sept. 2019.
- KARATAS, E.; FOTO, E.; ERTAN-BOLELLI, T.; YALCIN-OZKAT, G.; YILMAZ, S.; ATAELI, S.; ZILIFDAR, F.; YILDIZ, I. Discovery of 5-(or 6)-benzoxazoles and oxazolo[4,5-b]pyridines as novel candidate antitumor agents targeting hTopo II α . **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 112, n. 104913, July 2021.
- KE, X.; SHEN, L. Molecular targeted therapy of cancer: the progress and future prospect. **Frontiers in Laboratory Medicine**, [Beijing], v. 1, n. 2, p. 69-75, June 2017.
- KLIGERMAN, J. Estimativa sobre a incidência e mortalidade por câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [Rio de Janeiro], v. 46, n. 2, p. 135-136, 2000.
- 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, Dec. 2008.
- KUNWAR, S.; HWANG, S.; KATILA, P.; SEO, M.; KADAYAT, T. M.; KWON Y.; LEE, E. 4-Fluorophenyl-substituted 5H-indeno[1,2-b]pyridinols with enhanced topoisomerase II α inhibitory activity: synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 116, n. 105349, Nov. 2021.

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

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**, Amsterdam, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar. 2001.

LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; JI, L. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes, **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 91, n. 1, p. 269-276, July 2002.

MAGAR, T. B. T.; SEO, S. H.; SHRESTHA, A.; KIM, J.; KUNWAR, S.; BIST, G.; KWON, Y.; LEE, E. Synthesis and structure-activity relationships of hydroxylated and halogenated 2,4-diaryl benzofuro[3,2-b]pyridin-7-ols as selective topoisomerase II α inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 111, n. 104884, June 2021.

MALININA, L.; SOLER-LÓPEZ, M.; AYMAMÍ, J.; SUBIRANA, J. A. Intercalation of an Acridine– Peptide Drug in an AA/TT Base Step in the Crystal Structure of [d (CGCGAATTCGCG)] 2 with Six Duplexes and Seven Mg²⁺ Ions in the Asymmetric Unit. **Biochemistry**, Washington, v. 41, n. 30, p. 9341-9348, Jul 2002.

MANASA, K. L.; THATIKONDA, S.; SIGALAPALLI, D. K.; SAGAR, A.; KIRANMAI, G.; KALLE, A. M.; ALVALA, M.; GODUGU, C.; NAGESH, N.; BABU, B. N. Design and synthesis of β -carboline linked aryl sulfonyl piperazine derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 101, n. 103983, Aug. 2020.

MARTÍNEZ, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-10, Mar. 2015.

MCGAUGHEY, G. B.; GAGNÉ, M.; RAPPÉ, A. K. π -Stacking interactions. alive and well in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 25, p. 15458–15463, June 1998.

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, June 1974.

MIGNOT, I.; PRESLE, N.; LAPICQUE, F.; MONOT, C.; DROPSY, R.; NETTER, P. Albumin binding sites for etodolac enantiomers. **Chirality**, Hoboken, v. 8, p. 271-280, 1996.

MISRA, R.; DAS, M.; SAHOO, B. S.; SAHOO, S. K. Reversal of multidrug resistance in vitro by co-delivery of MDR1 targeting siRNA and doxorubicin using a novel cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoformulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 372-384, Nov. 2014.

MOLLAZADEH, S.; BABAEI, S.; OSTADHASSAN, M.; YAZDIAN-ROBATIG, R. Concentration-dependent assembly of bovine serum albumin molecules in the doxorubicin loading process: molecular dynamics simulation. **Colloids and Surfaces A: Physico-chemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 640, n. 128429, May 2022.

MONTANARI, F.; ECKER, G. F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – recent advances and future challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 86, p. 17-26, June 2015.

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. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELLEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, Nov. 1998.

MORRIS-ANDREWS, A.; ROTTLE, J.; PLOTKIN, S. S. A systematically coarse-grained model for DNA and its predictions for persistence length, stacking, twist, and chirality. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 132, n. 3, Jan. 2010.

MOURA, R. O. **Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos**. 2009. xxiii, 238 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MOURA, W. C. S. **Estudo *in silico*, síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados acridínicos com possível ação antitumoral**. 2019. 145 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

MUKHAMETOV, A.; RAEVSKY, O. A. On the mechanism of substrate/non-substrate recognition by P-glycoprotein. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 71, p. 227-232, Jan. 2017.

MURRAY, C. W.; ERLANSON, D. A.; HOPKINS, A. L.; KESERÜ, G. M.; LEESON, P. D.; REES, D. C.; REYNOLDS, C. H.; RICHMOND, N. J. Validity of ligand efficiency metrics. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Washington, v. 5, n. 6, p. 616-618, May 2014.

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOOR, S. T. Pharmacokinetic study on the mechanism of interaction of sulfacetamide sodium with bovine serum albumin: a spectroscopic method. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Hoboken, v. 31, n. 2-3, p. 120-128. Jan. 2010.

NAIR, M.; SANDHU, S. S.; SHARMA, A. K. Cancer molecular markers: a guide to cancer detection and management. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 52, p. 39-55, Oct. 2018.

NAMBA, A.M.; DA SILVA, V.B.; DA SILVA, C.H.T.P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química J.**, [São Paulo], v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews**, Amsterdam, v. 14, p. 53-71, Mar. 2013.

NESTL, B.; HAUER, B. engineering of flexible loops in enzymes. **ACS Catalysis**, Washington, v. 4, n. 9, p. 3201-3211, Aug. 2014.

PAULA, G. A. P. **Estudo da estabilidade estrutural em solução aquosa da enzima Acetolactato Sintase (ALS) utilizando dinâmica molecular**. 2019. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

PETERS JR., T.; All About Albumin; **Biochemistry, Genetics and Medical Applications**, Academic Press: [San Diego], 1995.

QI, H.; WANG, Y.; WANG, X.; SU, L.; WANG, Y.; WANG, S. The different interactions of two anticancer drugs with bovine serum albumin based on multi-spectrum method combined with molecular dynamics simulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v. 259, n. 119809, Oct. 2021.

PINA, A. F.; SOUSA, S. F.; AZEVEDO, L.; CARNEIRO, J. Non-B DNA conformations analysis through molecular dynamics simulations. **Biochimica et Biophys Acta - General Subjects**, Amsterdam, v. 1866, n. 12, Dec. 2022.

PITTA, M. G. R. **Novos agentes tiazacridínicos com propriedades anticâncer**. 2012. 190 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

RAHMANIAN, M.; SEYFOORI, A.; GHASEMI, M.; SHAMSI, M.; KOLAHCHI, A. R.; MODARRES, H. P.; SANATI-NEZHAD, A.; MAJIDZADEH-A, K. In-vitro tumor microenvironment models containing physical and biological barriers for modelling multidrug resistance mechanisms and multidrug delivery strategies. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 334, p. 164–177, June 2021.

RAKESH, K. P.; KUMARA, H.K.; MANUKUMAR, H.M.; GOWDA, D. C. Anticancer and DNA binding studies of potential amino acids based quinazolinone analogs: synthesis, SAR and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v. 87, p. 252-264, June 2019.

RANI, P.; KIRANA; CHAHAL, S.; PRIYANKA; KATARIA, R.; KUMAR, P.; KUMAR, S.; SINDHU, J. Unravelling the thermodynamics and binding interactions of bovine serum albumin (BSA) with thiazole based carbohydrazide: multi-spectroscopic, DFT and molecular dynamics approach. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1270, n. 133939, Dec. 2022.

RIBEIRO, A. G.; ALVES, J. E. F.; SOARES, J. C. S.; SANTOS, K. L.; JACOB, I. T. T.; FERREIRA, C. J. S.; SANTOS, J. C.; AZEVEDO, R. D. S.; ALMEIDA, S. M. V.; LIMA, M.

C. A. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 30, p. 1469-1495, June 2021.

RUPAR, J.; DOBRIČIĆ, V.; GRAHOVAC, J.; RADULOVIĆ, S.; SKOK, Ž.; ILAŠ, J.; ALEKSIĆ, M.; BRBORIĆ, J.; ČUDINA, O. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives. **RSC Medicinal Chemistry**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 378-386, 2020.

SALEM, O. M.; VILKOVÁ, M.; JANOCKOVÁ, 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**, Amsterdam, v. 86, p.690-700, May 2016.

SALO-AHEN, O. M. H.; ALANKO, I.; BHADANE, R.; BONVIN, A. M. J. J.; HONORATO, R. V.; HOSSAIN, S.; JUFFER, A. H.; KABEDEV, A.; LAHTELA-KAKKONEN, M.; LARSEN, A. S.; LESCRIER, E.; MARIMUTHU, P.; MIRZA, M. U.; MUSTAFA, G.; NUNES-ALVES, A.; PANTSAR, T.; SAADABADI, A.; SINGARAVELU, K.; VANMEERT, M. Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development, **Processes**, Basel, v. 9, n. 1, Dec. 2020.

SANI, F. D.; SHAKIBAPOUR, N.; BEIGOLI, S.; SADEGHIAN, H.; HOSAINZADEH, M.; CHAMANI, J. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of Luminescence**, Amsterdam, v. 203, p. 599–608, Nov. 2018.

SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 110-115, 2018.

SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Washington, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, Apr. 2017.

SARWAR, T.; ISHQI, H. M.; REHMAN, S. U.; HUSAIN, M A.; RAHMAN, Y.; TABISH, M. Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA: a multispectroscopic, thermodynamics and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 98, p. 319-328, May 2017.

SERT, Y.; EL-HITI, G. A.; GÖKCE, H.; UCUN, F.; ABDEL-WAHAB, B. F.; KARIUKI, B. M. DFT, molecular docking and experimental FT-IR, laser-Raman, NMR and UV investigations on a potential anticancer agent containing triazole ring system. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1211, n. 128077, July 2020.

SHAFI, A.; SATHYAMURTHY, R. D. T.; SEETHARAMAN, J.; SAMBANTHAN, M.; MURUGESAN, R.; SUNDARAM, S.; RAMARATHINAM, R. B. Molecular docking, quantum chemical computational and vibrational studies on bicyclic heterocycle “6-nitro-2,3-dihydro-1,4-benzodioxine”: anti-cancer agent. **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 86, n. 107226, June 2020.

SHEN, H.; GU, Z.; JIAN, K.; QI, J. In vitro study on the binding of gemcitabine to bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 75, p. 86-93. Mar. 2013.

SHU, Y.; XUE, W.; XU, X.; JIA, Z.; YAO, X.; LIU, S.; LIU, L. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. **Food Chemistry**, Oxford, v. 173, p. 31-37, Apr. 2015.

SILVA, J. M. D. **Planejamento e desenvolvimento de novos derivados Acridínicos, Quínilínicos e Piridínicos com potencial atividade antitumoral**. 2018. 211 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

SINGH, A.; JANA, N. K. Discovery of potential Zika virus RNA polymerase inhibitors by docking-based virtual screening. **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 71, p. 144-151, Dec. 2017.

SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Pyrrolo[2,3-b] pyridine derivatives: synthesis and preliminary evaluation of their calf thymus DNA binding properties. **ChemistrySelect**, Weinheim, v. 1, n. 15, p. 4772-4777, Sept. 2016.

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**, Issy-Les-Moulineaux, v. 117, p. 59-69, July 2016.

SILVA, A. W. S.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. **BMC Research Notes**, London, v. 5, n. 367, Jan. 2012.

SILVA, M. M.; MACEDO, T. S.; TEIXEIRA, H. M. P.; MOREIRA, R. M. M.; SOARES, M. B. P.; PEREIRA, A. L. C.; SERAFIM, V. L.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B.; LIMA, M. C. A. L.; MOURA, R. O.; SILVA-JÚNIOR, E. F.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DANTAS, M. D. A.; NASCIMENTO, E. O. O.; MACIEL, T. M. S.; AQUINO, T. M.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 189, p. 165-175, Dec. 2018.

SILVA-JÚNIOR, E. F. The 2022 monkeypox outbreak: how the medicinal chemistry could help us? **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 73, Nov. 2022.

SOLANKI, R.; ROSTAMABADI, H.; PATEL, S.; JAFARI, S. M. Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: A critical review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 193, part A, p. 528-540, Dec. 2021.

SOUSA, G. L. S. **Síntese e avaliação do potencial antitumoral de novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos**. 2019. 240 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

SOUSA, G.; ALMEIDA, M. C. F.; LÓCIO, L. L.; SANTOS, V. L.; BEZERRA, D. P.; SILVA, V. R.; ALMEIDA, S. M. V.; SIMON, A.; HONÓRIO, T. S.; CABRAL, L. M.; CASTRO, R. N.; MOURA, R. O.; KÜMMERLE, A. E. Synthesis and evaluation of antiproliferative activity, topoisomerase II α inhibition, DNA binding and non-clinical toxicity of new acridine–thiosemicarbazone derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1098, Sept. 2022.

TAHA, M.; SULTAN, S.; HERIZAL, M.; FATMI, M. Q.; SELVARAJ, M.; RAMASAMY, K.; HALIM, S. A.; LIM, S. M.; RAHIM, F.; ASHRAF, K.; SHEHZAD, A. Synthesis, anticancer, molecular docking and QSAR studies of benzoylhydrazone. **Journal of Saudi Chemical Society**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 1168-1179, Dec. 2019.

TARGHAZEH, N.; HUTT, K. J.; WINSHIP, A. L.; REITER, R.; YOUSEFI, B. Melatonin as an oncostatic agent: Review of the modulation of tumor microenvironment and overcoming multidrug resistance. **Biochimie**, Issy-Les-Moulineaux, Sept. 2022.

THAMARAI, A.; VADAMALAR, R.; KUMARAN, S.; RAMESH, P.; MUTHU, S.; AAYISHA, S.; RAJA, M.; NARAYANA, B.; IRFAN, A. Investigations on spectroscopic, ADMET properties and drug-likeness, molecular docking, chemical properties of (2E)-3-(biphenyl-4-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-prop-2-en-1-one by combined density-functional theory, **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1262, n. 132973, Aug. 2022.

UPADHYAY, R. K. Drug delivery systems, CNS protection and the blood brain barrier. **Biomed Research International**, London, v. 2014, p. 8692669 – 869305, 2014.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, May 2002.

WANG, Y. R.; CHEN, S. F.; WU, C. C.; LIAO, Y. W.; LIN, T. S.; LIU, K. T.; CHEN, Y.; LI, T.; CHIEN, T.; CHAN, N. L. Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. 18, p. 10861-10871, Oct. 2017.

WANI, T. A.; ALSAIF, N. A.; ALANAZI, M. M.; BAKHEIT, A. H.; KHAN, A. A.; ZARGAR, S. Binding of colchicine and ascorbic acid (vitamin C) to bovine serum albumin: an em vitrointeraction study using multispectroscopic study, molecular docking and molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 342, n. 117542, Nov. 2021.

WOLFE A.; SHIMER JR, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. **Biochemistry**, Washington, v. 26, n. 20, p. 6392-6396, Oct. 1987.

YADAV, S.; SADIQUE, M. A.; PAL, M.; KHAN, R.; SRIVASTAVA, A. K. Cytotoxicity and DNA fragmentation-mediated apoptosis response of hexagonal ZnO nanorods against human prostate cancer cells. **Applied Surface Science Advances**, Amsterdam, v. 9, n. 100237, June 2022.

YICHAO, W.; GUOQING, F.; HONGJUAN, C.; XU, D.; ZILONG, T. Sulfonamide derivatives as potential anti-cancer agents and their SARs elucidation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-Les-Moulineaux, v. 226, n. 113837, Dec. 2021.

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, July 2008.

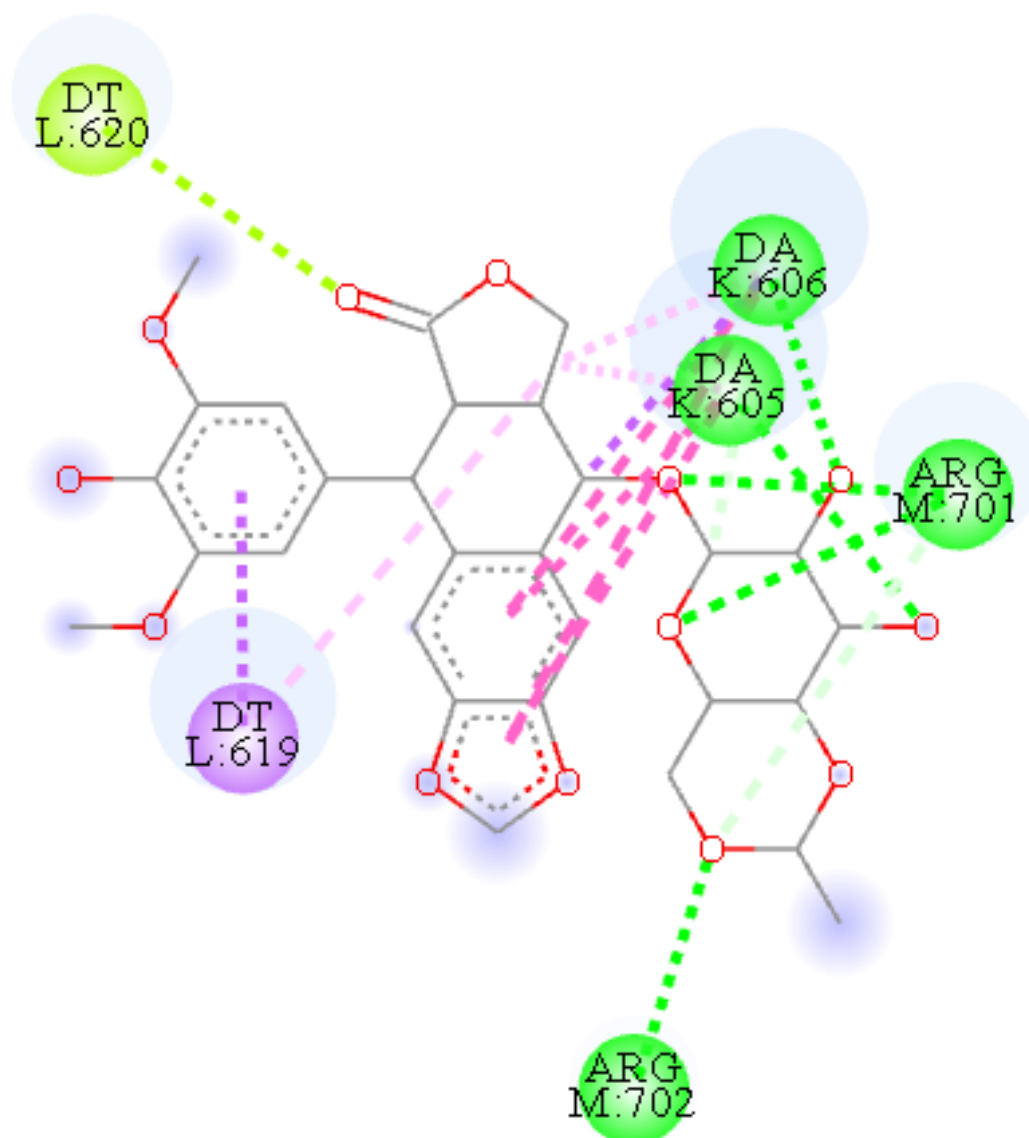
ZANDVLIET, D. W. J.; HANBY, A. M.; AUSTIN, C. A.; MARSH, K. L.; CLARK, I.B.N.; WRIGHT, N. A.; POULSOM, R. Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase α and β mRNAs by in situ hybridisation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1307, p. 239-247, 1996.

ZANGER, U.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 138, n. 1, p. 103-141, Apr. 2013.

ZEFERINO, R. C.; MOTA, N. S. R. S.; GRINEVICIUS, V. M. A. S.; FILIPE, K. B.; SULIS, P. M.; SILVA, F. R. M. B.; FILHO, D. W.; PICH, C. T.; PEDROSA, R. C. Targeting ROS overgeneration by N-benzyl-2-nitro-1-imidazole-acetamide as a potential therapeutic reposition approach for cancer therapy. **Investigational New Drugs**, Dordrecht, v. 38, p. 785-799, July 2020.

ZHOU, Y.; PENG, Z.; SEVEN, E. S.; LEBLANC, R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 270, p. 290-303, Jan. 2018.

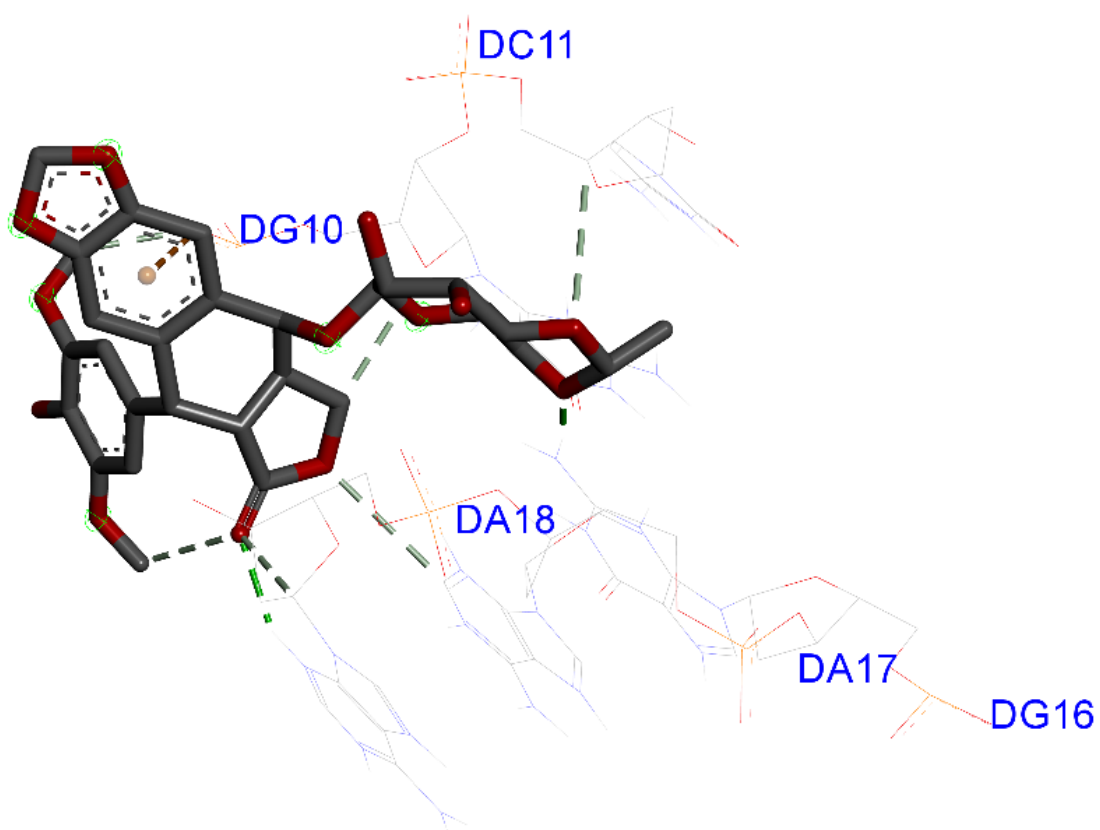
APÊNDICE A – Imagens 2D das interações do etoposídeo no DNA (PDB ID 1G3X)



INTERAÇÕES

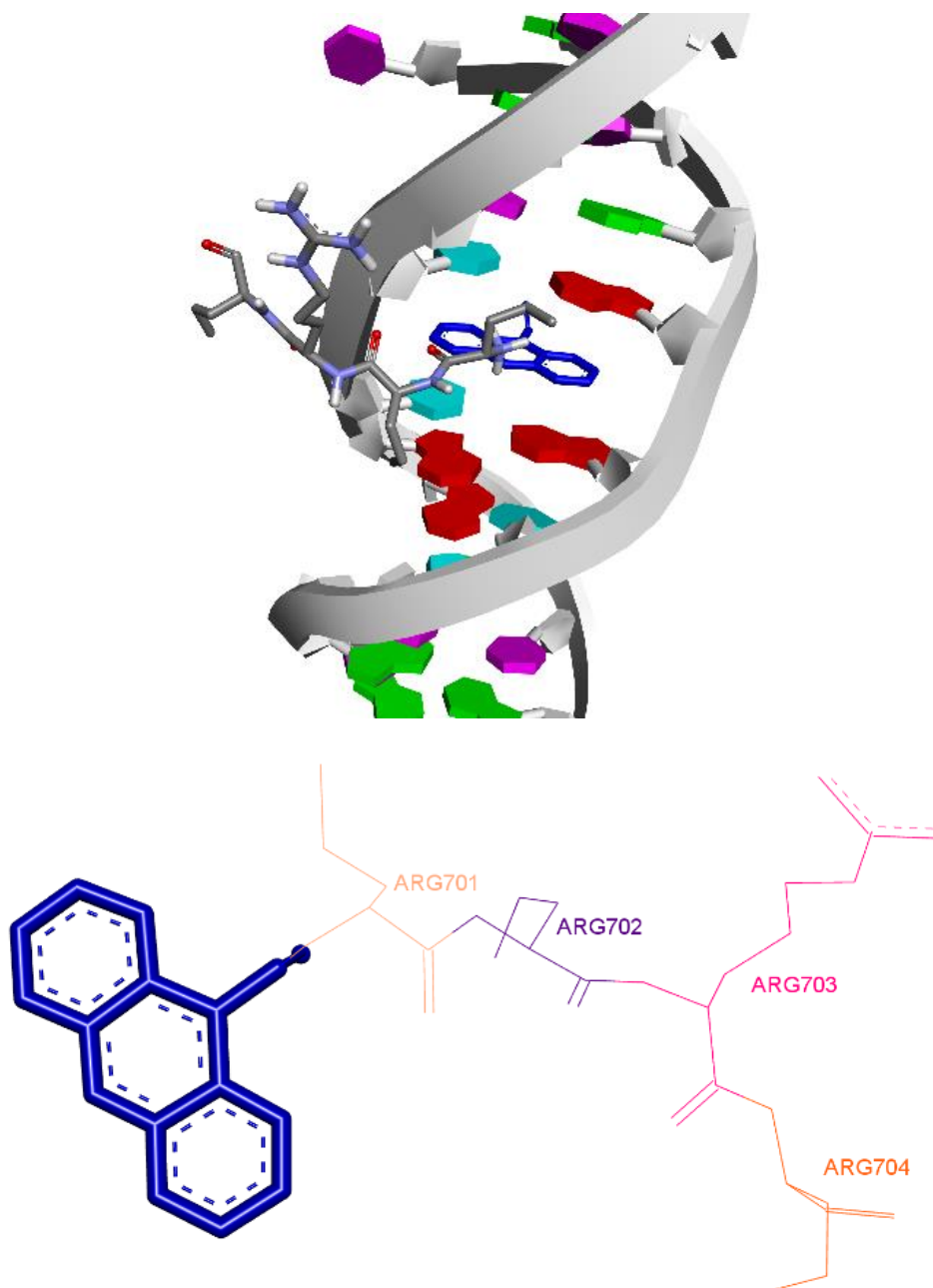
	Ligação de hidrogênio convencional		Pi-Elétrons Livres
	Ligação carbono-hidrogênio		Empilhamento Pi-Pi
	Ligação de hidrogênio Pi-doador		Pi-Pi em forma de T
	Pi-Sigma		Pi-Alquil

Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

APÊNDICE B – Imagens 3D das interações do etoposídeo no DNA (PDB ID 1BNA)

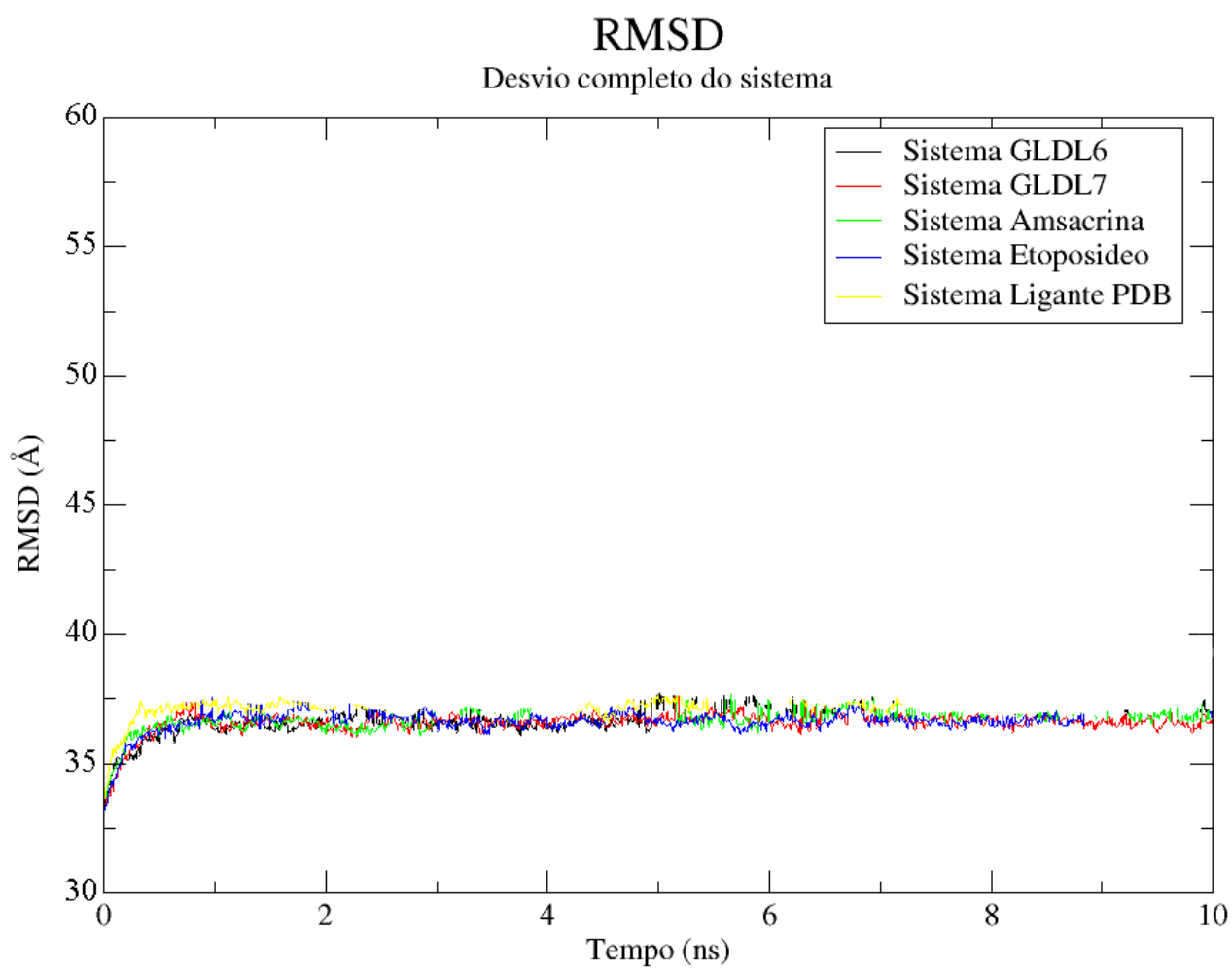
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

APÊNDICE C – Estrutura cristalográfica do DNA (PDB ID 1G3X) e resíduos interagindo com o ligante co-cristalizado



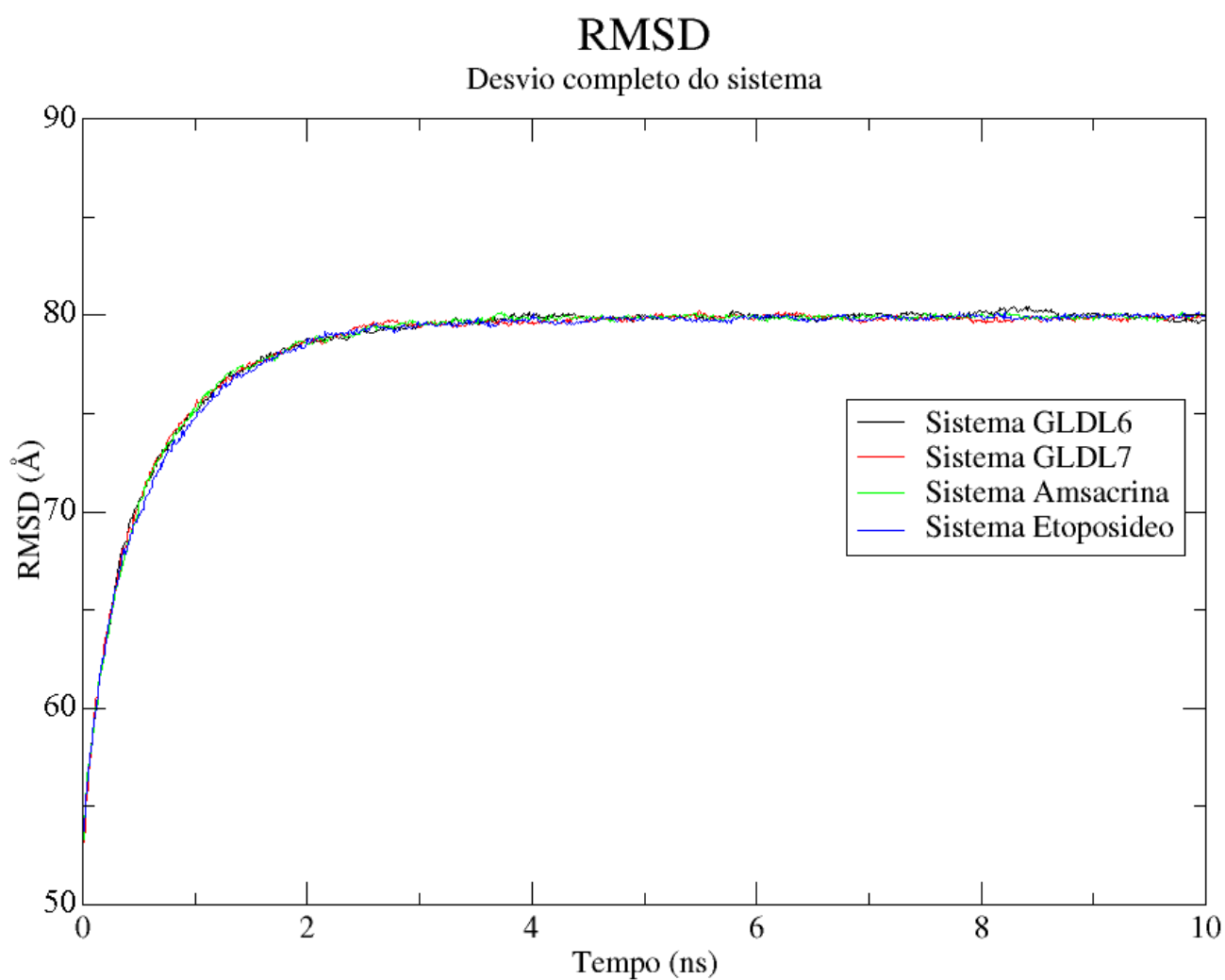
Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

APÊNDICE D – RMSD observado para o desvio completo de cada sistema estudado para DNA e ligantes

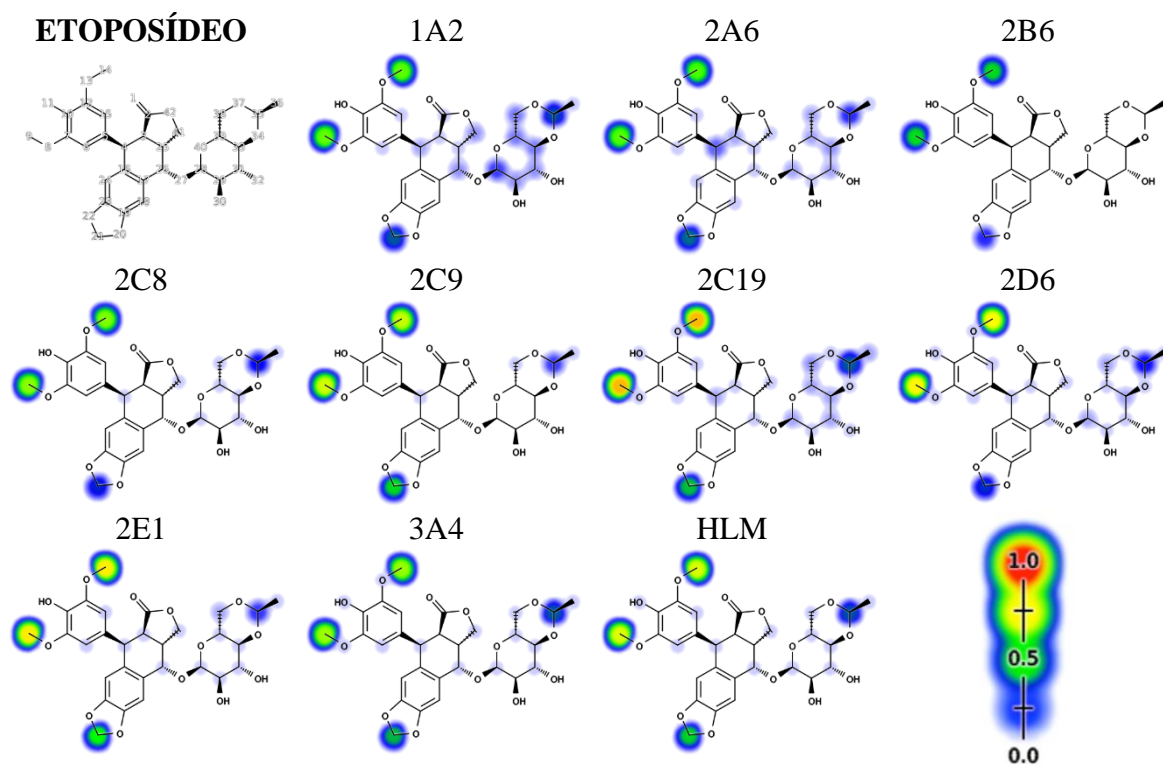


Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

APÊNDICE E – RMSD observado para o desvio completo de cada sistema estudado para topoisomerase, DNA e ligantes



Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

ANEXO A – Predição dos sítios de metabolização do Etoposídeo via *Xenosite*

Fonte: adaptado de *Xenosite* (2022).