



UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CÂMPUS I - CAMPINA GRANDE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MIRELLY BARBOSA SANTOS

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS POR
MEIO DE SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM *SCAFFOLD* COM POTENCIAL
ANTITUMORAL**

CAMPINA GRANDE

2023

MIRELLY BARBOSA SANTOS

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS POR
MEIO DE SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM *SCAFFOLD* COM POTENCIAL
ANTITUMORAL**

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

Área de concentração: Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

CAMPINA GRANDE

2023

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.

S237p Santos, Mirelly Barbosa.
Planejamento e síntese de novos derivados acridínicos por meio de simplificação molecular de um *scaffold* com potencial antitumoral [manuscrito] / Mirelly Barbosa Santos. - 2023.
147 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Departamento de Farmácia - CCBS. "

1. Fenilmetanimina. 2. Diazenilacridina. 3. Atividade antitumoral. 4. Farmacocinética. 5. Câncer. I. Título

21. ed. CDD 615.1

MIRELLY BARBOSA SANTOS

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS POR
MEIO DE SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM SCAFFOLD COM POTENCIAL
ANTITUMORAL**

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

Aprovada em 05/09/2023.

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Vanda Lúcia dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Dedico também os meus pais, Josinalva e Manoel, meu irmão, Carlos Emanuel e meu esposo, Matheus, por todo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus, porque me fortaleceu e me guardou nessa jornada, sem ele nada seria possível.

Agradeço a minha família por todo incentivo, em especial aos meus pais Josinalva e Manoel e ao meu irmão, Carlos Emanuel, por todo amor e carinho.

Á meu esposo Matheus, que esteve ao meu lado durante essa caminhada me apoiando, incentivando e auxiliando. Por todo amor e carinho, obrigada.

Á meu orientador Dr. Ricardo Olímpio, exemplo de profissional e pessoa, obrigada por todo apoio, incentivo, paciência e por todo conhecimento transmitido.

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Sonaly, Karla, Yvnni, Joilly, Misael e especialmente a Jamire, que me transmitiram seus conhecimentos, me auxiliaram, incentivaram e tornaram os dias mais alegres.

Á Igor, pela colaboração nas caracterizações das amostras e por todo conhecimento transmitido.

Sou grata à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB), pelo apoio financeiro para realização desse projeto.

A todos que de forma direta ou indireta estiveram do meu lado e foram fundamentais para minha construção acadêmica.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, cujo tratamento principal é a quimioterapia, que está atrelada a toxicidade e resistência medicamentosa. As topoisomerasas e o DNA são alvos biológicos de muitos antitumorais, incluindo derivados acridínicos, e por isso são promissores para o desenvolvimento de novas drogas. Desse modo, objetivamos desenvolver novos derivados acridínicos a partir de um promissor *scaffold* por meio de simplificação molecular e avaliar suas potencialidades a partir de estudos *in silico* e *in vitro*, visando a proposta de um novo quimioterápico anticâncer. Cinco novos derivados fenilmetanimina (MAC) e três novos diazenilacridina (ACHZ) substituídos foram obtidos partindo-se de uma simplificação estrutural do *scaffold* (composto 3a), que apresentou promissora atividade antitumoral em estudos anteriores. O estudo de *docking* molecular foi realizado como triagem inicial com os alvos topoisomerase II α (PDB ID: 5GWK) e DNA (PDB ID: 1BNA; 1G3X), nos quais as moléculas em sua maioria apresentaram energia livre de ligação e modo de interação semelhante\melhores que o compostos de referência, tendo destaque a molécula MAC-07. A predição farmacocinética *in silico* também foi realizada, evidenciando boa absorção gastrointestinal, permeação a BHE e adequação aos critérios de *druglikeness*. A síntese ocorreu por rota sintética linear, onde foi construído o aldeído de acridina (AC-02) e hidazonometilacridina, seguidos da condensação com diferentes anilinas e aldeídos, obtendo-se rendimentos reacionais variando de 49 e 85%. A análise termogravimétrica realizada para a série MAC, evidenciou que as moléculas são estáveis até 250 °C. A identificação estrutural dos compostos foi realizada por meio de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Nos estudos *in vitro*, as moléculas interagiram com ssDNA, com valores de K_b na faixa típica para complexos de intercalação, sendo evidenciado o composto ACHZ-BE. Elas também interagiram com HSA, com K_b típico de drogas capazes de se acomodar na mesma. Os estudos de atividade antiproliferativa *in vitro* foram realizados em três linhagens tumorais (MCF-7, HeLa, SKMEL-28) nos quais os compostos apresentaram leve citotoxicidade com percentual de inibição máxima de 33,2 %. Em estudo adicional de *docking*, as moléculas apresentaram bom perfil de interação com alvo topoisomerase I (PDB ID: 1K4T). Desse modo, as novas moléculas obtidas demonstraram potencial para fármacos antitumorais, se fazendo necessário a realização de estudos adicionais para melhor compreensão de sua atividade e possíveis mecanismos de ação e citotoxicidade.

Palavras-chave: fenilmetanimina; diazenilacridina; atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is a global public health problem, whose main treatment is chemotherapy, which is linked to toxicity and drug resistance. Topoisomerases and DNA are biological targets of many antitumor drugs, including acridine compounds, and, then, are promising for the development of new drugs. Therefore, we aim to develop new acridine derivatives based on a promising scaffold, through molecular simplification, and evaluate their potential by *in silico* and *in vitro* studies, aiming for the development of a new anticancer chemotherapy drug. Five new phenylmethanimine (MAC) and three new substituted diazenylacridine (ACHZ) compounds were obtained through structural simplification of the scaffold (compound 3a), which showed promising antitumor activity in previous studies. The molecular docking study was carried out as an initial screening with topoisomerase II α (PDB ID: 5GWK) and DNA (PDB ID: 1BNA; 1G3X), in which the molecules mostly showed similar or better free binding energy and interaction mode compared to the reference compound, with emphasis on MAC-07. *In silico* pharmacokinetic prediction was also performed, confirming good gastrointestinal absorption, BBB permeation and compliance with druglikeness criteria. The synthesis was carried out by linear synthetic route, where acridine aldehyde (AC-02) and hydrazonomethyl-acridine were constructed, followed by condensation with different anilines and aldehydes, obtaining reaction yields ranging from 49 to 85%. A thermogravimetric analysis carried out for the MAC series showed that the molecules are stable up to 250 °C. The structural identification of the compounds was carried out using ^1H NMR and ^{13}C NMR. Through *in vitro* studies, the molecules interacted with ssDNA, with K_b values in the typical range for intercalation complexes, highlighting the compound ACHZ-BE. They also interacted with HSA, with K_b typical of drugs capable of accommodating in this protein. *In vitro* antiproliferative activity studies were carried out in three tumor cell lines (MCF-7, HeLa and SKMEL-28) in which the compounds presented a level of cytotoxicity with a maximum inhibition percentage of 33.2%. In additional docking study, the molecules exhibited good interaction profile with topoisomerase I (PDB ID: 1K4T). Thus, the new molecules discovered showed potential for antitumor drugs, requiring additional studies to better understand their activity and possible mechanisms of action and cytotoxicity.

Keywords: phenylmethanimine; diazenylacridine; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de novos casos de câncer no mundo em 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades.....	21
Figura 2 -	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	21
Figura 3 -	Exemplo de bioisómeros clássicos e não clássicos.....	28
Figura 4 -	Exemplo de retroisosterismo.....	28
Figura 5 -	Simplificação molecular para obtenção do Vorinostat.....	29
Figura 6 -	Estrutura química da amsacrina.....	31
Figura 7 -	Estrutura química do composto AC-4.....	32
Figura 8 -	Estrutura química do 11l.....	32
Figura 9 -	Estrutura química dos compostos AMTAC-01, AMTAC-02 e AMTAC-06.....	33
Figura 10 -	Acridinas com diferentes porções tiosemicarbazidas substituídas.....	34
Figura 11 -	Isômeros (E) e (Z) das moléculas da série fenilmetanimina (MAC).....	56
Figura 12 -	Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-08.....	56
Figura 13 -	Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-07	57
Figura 14 -	Redocking com ligante co-cristalizado etoposídeo.....	58
Figura 15 -	Docking molecular da molécula MAC-07 (Z) (A) e de m-AMSA (B) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK).....	59
Figura 16 -	Docking molecular da molécula 3a (A) e etoposídeo (B) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK).....	60
Figura 17 -	Docking molecular da molécula ACHZ-CB no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK).....	61
Figura 18 -	Interação entre a molécula MAC-07 (E) e o alvo DNA (PDB ID: 1BNA)	64
Figura 19 -	Interações dos isômeros MAC-08 (E) (A) MAC-08 (Z) (B) com o DNA (PDB ID: 1BNA).....	65
Figura 20 -	Interações da molécula MAC-07(E) (A) e da amsacrina (B) com o DNA (PDB ID: 1G3X).....	66
Figura 21 -	Interações dos isômeros MAC-08 (E) (A) MAC-08 (Z) (B) com o DNA (PDB ID: 1G3X).....	67
Figura 22 -	Modelo Boiled-Egg das moléculas projetadas.....	69
Figura 23 -	Curvas termogravimétricas dos compostos MAC-01 (A), MAC-02 (B) e MAC-03 (C).....	81
Figura 24 -	Curvas termogravimétricas dos compostos MAC-07 (A) e MAC-08 (B).	82
Figura 25 -	Estrutura geral dos compostos sintetizados e seus H com maior deslocamento químico.....	86

Figura 26 - Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-08.....	87
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula MAC-08.....	87
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula ACHZ.....	89
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula MAC-08.....	92
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula MAC-07.....	93
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C do intermediário ACHZ.....	94
Figura 32- Espectros de absorção do derivado ACHZ-BE (20 µM) com concentrações crescentes de ssDNA.....	96
Figura 33 - Espectros de absorção UV-vis de HSA na ausência e presença de MAC- 02, MAC-07, ACHZ-CB.....	99
Figura 34 - Citotoxicidade das moléculas sintetizadas (20 µM) nas linhagens MCF-7, SK-MEL-28 e HeLa após tratamento por 72 horas, utilizando o ensaio do MTT.....	100
Figura 35 - Redocking com ligante co-cristalizado topotecano.....	103
Figura 36 - Interações das moléculas ACHZ-CB (A) e SN-38 (B), no alvo topoisomerase I (PDB ID: 1K4T).....	105
Figura 37 - Interações do topotecano no alvo topoisomerase I (PDB ID: 1K4T).....	106
Figura 38 - Interações das moléculas 3a (A), MAC-07 (E) (B) e ACHZ-BE (C) com o alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T).....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros utilizados no docking molecular para cada alvo farmacológico.....	37
Tabela 2 -	Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados fenilmetanimina (DE) partindo da 9- aminoacridina.....	45
Tabela 3 -	Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados MB-01 e MB-02 partindo da 9-metilacridina.....	47
Tabela 4 -	Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados MB-03, MB-06, MB-11 e MB-13 partindo da 9-metilacridina.....	48
Tabela 5 -	Resultados do docking molecular frente ao alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK).....	58
Tabela 6 -	Resultados do docking molecular frente ao alvo DNA (PDB ID: 1BNA)	63
Tabela 7 -	Resultados do docking molecular frente ao alvo DNA (PDB ID: 1G3X)	65
Tabela 8 -	Parâmetros de druglikeness estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan....	71
Tabela 9 -	Parâmetros de druglikeness apresentados pelas moléculas projetadas.....	71
Tabela 10 -	Determinação da solubilidade aquosa das moléculas projetados.....	72
Tabela 11 -	Características físico-químicas dos compostos acridínicos.....	75
Tabela 12 -	Características físico-químicas para os compostos da série fenilmetanamina (MAC).....	77
Tabela 13 -	Características físico-químicas para os compostos da série diazenilacridina (ACHZ).....	80
Tabela 14 -	Dados termogravimétricos dos compostos da série fenilmetanimina (MAC).....	82
Tabela 15 -	Resultado das análises de RMN de ^1H e ^{13}C para os núcleos AC-01 e AC-02.....	83
Tabela 16 -	Resultados da análise por RMN de ^1H dos novos derivados acridínicos	85
Tabela 17 -	Resultados da análise por RMN de ^{13}C dos novos derivados acridínicos da série fenilmetanimina (MAC).....	90
Tabela 18 -	Resultados da análise por RMN de ^{13}C dos novos derivados acridínicos da série diazenilacridina (ACHZ).....	91
Tabela 19 -	Dados de absorção UV-Vis para os novos derivados acridínicos na ausência e presença de ssDNA.....	95

Tabela 20 -	Dados de absorção UV-Vis para HSA livre e ligada aos novos derivados acridínicos.....	98
Tabela 21-	Percentual de viabilidade celular das linhagens tumorais após tratamento por 72 horas de tratamento.....	101
Tabela 22-	Resultados do docking molecular frente ao alvo topoisomerase I complexada com o DNA (PDB ID: 5K4T.....	104

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Estratégia de desenvolvimento para os novos derivados acridínicos.....	36
Esquema 2 -	Rota sintética para obtenção dos reagentes AC-01 e AC-02.....	40
Esquema 3 -	Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação do aldeído de acridina (AC-02) a diferentes anilinas.....	41
Esquema 4 -	Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação do aldeído de acridina a hidrazina e posteriormente a diferentes aldeídos.....	43
Esquema 5 -	Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação da 9-aminoacridina a diferentes aldeídos.....	45
Esquema 6 -	Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação da 9-metilacridina a diferentes aldeídos.....	46
Esquema 7 -	Novas moléculas projetadas por simplificação molecular.....	55
Esquema 8 -	Mecanismo reacional para obtenção dos compostos da série fenilmetanimina.....	76
Esquema 9 -	Mecanismo reacional para obtenção dos compostos da série diazenilacridina.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Interação das moléculas projetadas com as isoformas de CYP450	73
Quadro 2 - Moléculas obtidas para a série fenilmetanimina (MAC)	76
Quadro 3 - Solubilidade aparente dos compostos da série fenilmetanimina (MAC)	78
Quadro 4 - Moléculas obtidas para a série diazenilacridina (ACHZ)	79
Quadro 5 - Solubilidade aparente dos compostos da série diazenilacridina (ACHZ)	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
ADT	AutoDockTools
CADD	<i>Computer-Assisted Drug Design</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F.F	Ácido desoxirribonucleico
HSA	Albumina sérica huma
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir de 50% de crescimento
IV	Espectroscopia de infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _i	Constante de inibição estimada
Log P	Coefficiente de partição
<i>m</i> -AMSA	Amsacrina
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Rend.	Rendimento
R _f	Fator de Retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Topo II α	Topoisomerase II α humana
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	Aspectos gerais do câncer	20
3.2	Alvos biológicos para o tratamento do câncer	22
3.2.1	DNA	22
3.2.2	Enzimas topoisomerases	24
3.3	Albumina sérica humana (HSA)	25
3.4	Estratégias Aplicadas ao Desenvolvimento de Fármacos	26
3.4.1	Estratégias de planejamento de fármacos	26
3.4.2	Estratégias de Modificação molecular	27
3.4.2.1	Bioisosterismo e Retroisosterismo	28
3.4.2.2	Simplificação Molecular	28
3.4.3	Estratégias computacionais	29
3.4.3.1	Modelagem molecular: Docking molecular	29
3.4.3.2	Predição farmacocinética in silico	30
3.5	Scaffolds acridínicos com potencial atividade antitumoral	31
4	METODOLOGIA	36
4.1	Estratégia de planejamento	36
4.2	Estudos in silico	37
4.2.1.1	Obtenção e preparação das enzimas	40
4.2.1.2	Síntese do N-(acridina-9-ilmetileno)-N,N-dimetilbenzeno-1,4-diamino (ACN)	40
4.2.1.3	Síntese do produto final: acridina-9-carboxaldeído (AC-02)	41
4.3.2	Síntese da série fenilmetanimina (MAC)	41
4.3.2.1	(E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-metoxifenil)metanimina (MAC-01)	42
4.3.2.2	(E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-clorofenil) metanimina (MAC-02)	42
4.3.2.3	(E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-fluorofenil)metanimina (MAC-03)	42
4.3.2.4	(E)-1-(acridin-9-il)-N-(2,4-diclorofenil)metanimina (MAC-07)	42
4.3.2.5	(E)-1-(acridin-9-il)-N-fenilmetanimina (MAC-08)	43
4.3.3	Síntese da série fenilmetanimina (DE)	43

4.3.3.1	<i>Síntese do intermediário 9-diazenilacridina (ACHZ)</i>	43
4.3.3.2	<i>Síntese de (E)-9-(fenildiazenil)acridina (ACHZ-BE)</i>	44
4.3.3.3	<i>Síntese de (E)-9-((4-clorofenil)diazenil)acridina (ACHZ-CB)</i>	44
4.3.4	<i>Síntese da série fenilmetanimina (DE)</i>	44
4.3.5	<i>Síntese da série estirilacridina (MB)</i>	46
4.3.6	<i>Metodologia de purificação para os compostos sintetizados</i>	49
4.4	<i>Caracterizações físico-químicas dos compostos sintetizados</i>	49
4.4.1	<i>Aparência</i>	49
4.4.2	<i>Solubilidade aparente</i>	49
4.4.3	<i>Faixa de fusão</i>	50
4.4.4	<i>Rendimento da reação</i>	50
4.4.5	<i>Coefficiente de partição</i>	50
4.4.6	<i>Fator de retenção</i>	50
4.4.7	<i>Caracterização térmica</i>	50
4.4.7.1	<i>Termogravimetria (TG)</i>	51
4.5	<i>Caracterização estrutural dos compostos sintetizados</i>	51
4.5.1	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	51
4.6	<i>Estudos Biológicos</i>	51
4.6.1	<i>Espectroscopia de absorção UV-vis com DNA</i>	51
4.6.2	<i>Espectroscopia de absorção UV-vis com a HSA</i>	52
4.6.3	<i>Avaliação da citotoxicidade em células tumorais</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	<i>Docking molecula</i>	55
5.1.1	<i>Docking molecular realizado com o alvo topoisomerase IIa complexada com DNA</i>	57
5.1.2	<i>Docking molecular realizado com o alvo DNA</i>	62
5.2	<i>Predições farmacocinéticas</i>	68
5.3	<i>Síntese e caracterização físico-química</i>	74
5.3.1	<i>Caracterização físico-química do núcleo acridina-9-carboxaldeído</i>	74
5.3.2	<i>Mecanismo reacional e caracterização físico-química dos compostos da série fenilmetanimina (MAC)</i>	75
5.3.3	<i>Mecanismo reacional e caracterização físico-química dos compostos da série ACHZ</i>	78
5.4	<i>Análise térmica: termogravimetria (TG)</i>	80
5.5	<i>Caracterização estrutural dos compostos sintetizados</i>	83

5.5.1	<i>Identificação dos compostos por ressonância magnética nuclear.....</i>	83
5.6	Estudo de interação com DNA.....	95
5.7	Estudo de interação com HSA.....	97
5.8	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais.....	100
5.9	Docking molecular para avaliação de possível mecanismo de ação.....	102
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
7	PERSPECTIVAS.....	109
	REFERÊNCIAS.....	110
	ANEXOS A -DOCKING MOLECULAR.....	119
	ANEXOS B - ESPECTROS DE RMN DE ¹H.....	136
	ANEXOS C - ESPECTROS DE RMN DE ¹³C.....	139
	ANEXOS D - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS MOLÉCULA COM ssDNA.....	142
	ANEXOS E - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS MOLÉCUÇAS COM HSA.....	145
	ANEXOS F – PRODUÇÃO INTELECTUAL.....	147

1 INTRODUÇÃO

O câncer é compreendido como um grande grupo de doenças que podem invadir diferentes partes do corpo, caracterizado pelo desenvolvimento de células anormais que crescem além dos limites usuais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e alcançar outros órgãos, processo esse, denominado de metástase e que representa a principal causa de morte pela doença. Estimativas apontam o câncer como a principal causa de morte no mundo, ocasionando em média 10 milhões de mortes em 2020, com maiores índices de mortalidade observados para o câncer de pulmão, cólon e reto e fígado (World Health Organization, 2023).

O tratamento quimioterápico anticâncer é preferível quando o processo de metástase já está instalado. As drogas quimioterápicas atuam promovendo a inibição da proliferação rápida das células cancerosas, mas devido à falta de seletividade, eles também inibem o rápido crescimento celular que é necessário para a manutenção de folículos capilares, medula óssea e células do trato gastrointestinal, cominando no surgimento dos efeitos colaterais que muitas vezes são limitantes para o tratamento do câncer e evidencia a necessidade na descoberta de novos fármacos que possam se mostrar mais efetivos e seguros (Pérez-Herrero; Fernández-Medarde, 2015).

No processo de descoberta de um novo candidato a fármaco, busca-se inicialmente a identificação e otimização de moléculas pequenas com potencial de desenvolvimento clínico. Diferentes estratégias de modificação molecular, como bioisosterismo, retroisosterismo e simplificação molecular, podem ser utilizadas para obtenção de novos compostos com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas desejadas, bem como, com a atenuação ou ausência de efeitos tóxicos (Guido; Andricopulo; Oliva, 2010; Jayashree; Nikhil; Paul, 2022; Lima, L. M., 2007; Nepali *et al.*, 2014).

As abordagens *in silico* tem permitido a triagem virtual de inúmeros compostos em um tempo acessível, reduzindo assim os custos e melhorando as chances de encontrar os candidatos a medicamentos desejados. Dentre os métodos *in silico* baseados em estruturas, o *docking* molecular está entre os mais populares e bem-sucedidos, amplamente utilizado na descoberta de compostos *lead*. Esse método permite a compreensão do modo de interação entre o ligante e o alvo e uma estimativa de sua energia livre de ligação, sendo fundamental para um planejamento racional de compostos biologicamente ativos (Cavasotto; Aucar, 2020; Pinzi; Rastelli, 2019).

Na busca por novos agentes quimioterápicos anticâncer mais seletivos e menos tóxicos, os derivados acridínicos tem sido amplamente explorados. Os derivados acridínicos são

compostos heterocíclicos planares com amplas propriedades biológicas, cuja planaridade destes permite a alta intercalação ao DNA, bem como a interação e inibição de enzimas como topoisomerases tipo I e II. A inibição das enzimas topoisomerase I e II ocasiona danos ao DNA e interrompe seu reparo e replicação, induzindo a morte celular, tornando essas enzimas alvos promissores para o tratamento do câncer (Gouveia *et al.*, 2018).

Conhecendo o potencial anticâncer dos derivados acridínicos, investimos nesse *scaffold* e utilizando a estratégia de simplificação molecular, novos compostos com diferentes substituintes foram projetados, sintetizados e avaliados *in silico* e *in vitro*, objetivando a compreensão de possíveis mecanismo de ação, bem como, a obtenção de um novo composto *lead* com potencial para tornar-se um quimioterápico anticâncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver novos derivados acridínicos a partir de um promissor *scaffold* por meio de simplificação molecular e avaliar suas potencialidades a partir de estudos *in silico* e *in vitro*, visando a proposta de um novo quimioterápico anticâncer.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a. planejar e delinear os novos derivados acridínicos a partir do *Scaffold 3a*;
- b. realizar estudos de *docking* molecular e predição farmacocinética *in silico* dos novos compostos previamente planejados;
- c. promover a síntese química dos novos derivados acridínicos mais promissores, caracterizar suas propriedades físico-químicas e realizar a elucidação estrutural por diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- d. verificar as propriedades de ligação ao ssDNA através da espectroscopia de absorção em UV-visível;
- e. verificar as propriedades de ligação a HSA através da espectroscopia de absorção em UV-visível;
- f. avaliar a atividade antiproliferativa dos derivados obtidos frente à diferentes linhagens de células tumorais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

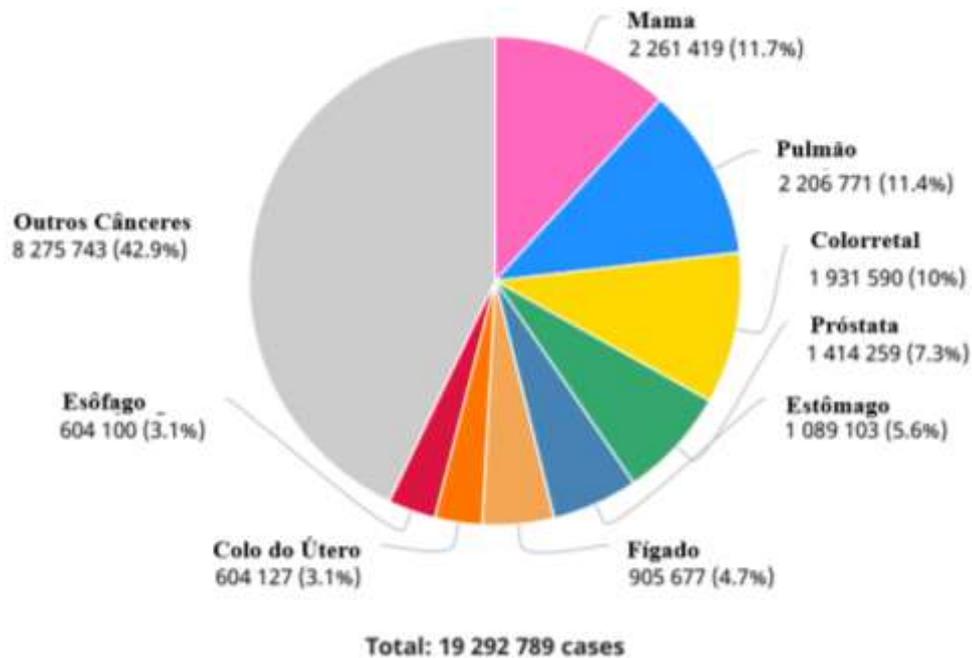
3.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer representa um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado, imortalidade replicativa e resistência à morte celular, sendo considerada uma das principais causas de morte no mundo. As células cancerígenas crescem em uma massa celular anormal denominada tumor, exceto nos cânceres hematológicos, onde o crescimento e a disseminação celular ocorrem através do sistema sanguíneo, linfáticos e da medula óssea. Outra característica do câncer é a capacidade de promover metástase, fenômeno que ocorre quando o câncer se espelha além do local de crescimento original, afetando outros órgãos (Pérez-Herrero; Fernández-Medarde, 2015; Wang, J. J.; Lei, K. F.; Han, 2018).

As alterações observadas nas células cancerígenas resultam da interação entre fatores genéticos e externos. Dentre os agentes externos temos os carcinógenos físicos, como radiação ultravioleta e ionizante, cancerígenos químicos, como amianto, e carcinógenos biológicos, como algumas infecções virais. Como os mecanismos de reparo celular tornam-se menos eficazes à medida que a pessoa envelhece, a incidência de câncer também aumenta com a idade (Patel; Boland, 2020; Starrett, Gabriel j.; Buck, 2019; World Health Organization, 2023).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Segundo estimativas, em 2020, ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo. O câncer de mama feminina é o mais incidente, seguido pelo câncer de pulmão, câncer colorretal, de próstata, e pele não melanoma, conforme observado na figura 1. O número estimado de mortes em 2020 correspondeu a 9 milhões, destas 1,79 milhões (18%) foram de câncer de pulmão, seguido pelo câncer colorretal 935 mil (9,4%) e de fígado 830 mil (8,3%) (World Health Organization, 2023).

Figura 1 - Número de novos casos de câncer no mundo em 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades



Fonte: World Health Organization (2023).

Para o Brasil, são estimados para cada ano do triênio de 2023-2025, 704 mil novos casos de câncer, apresentando maior incidência o câncer de pele não melanoma, cânceres de mama; próstata e cólon e reto. O câncer de mama é o mais incidente em mulheres, o de próstata é o mais incidente em homens, já o de cólon e reto é o segundo mais incidente para ambos os sexos (Figura 2). Em termos de mortalidade no Brasil, em 2020, ocorreram 2.653 óbitos de câncer de pele não melanoma, 15.841 por câncer de próstata, 17.825 por câncer de mama e 20.245 óbitos por câncer de cólon e reto (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2023).

Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2023).

O tratamento do câncer pode ocorrer por meio de cirurgia, radioterapia e terapias sistêmicas, que compreende a terapia hormonal, direcionada, imunológica e a quimioterapia. A cirurgia é realizada especialmente em estágios iniciais da doença e pode em alguns casos ser suficiente para promover a cura, porém em muitos casos é necessário a combinação de tratamentos. Nos casos de cânceres metastáticos, as terapias sistêmicas são indispensáveis, pois a entrega através da corrente sanguínea permite o acesso aos locais de disseminação do câncer (Fernando; Jones, 2015; Wang, J.; Lei, K.; Han, 2018).

As drogas quimioterápicas são baseadas em compostos tóxicos que atuam inibindo principalmente a rápida proliferação das células cancerígenas, entretanto elas inibem o rápido crescimento celular necessário para a manutenção dos folículos pilosos, da medula óssea e das células do trato gastrointestinal, ocasionando efeitos colaterais indesejáveis (Pérez-Herrero; Fernández-Medarde, 2015). Outro ponto negativo é o surgimento de resistências aos quimioterápicos anticâncer, que ocorre por mecanismos como: inativação da droga, efluxo do fármaco, alterações qualitativas e quantitativas do alvo da droga; reparo aprimorado do dano ao DNA, sequestro da droga em lisossomos ou vesículas longe do seu alvo e inibição da morte celular (Nussinov; Tsai; Jang, 2021).

Na busca por novas opções terapêuticas mais eficazes e seguras, as topoisomerasas e o DNA vem sendo amplamente discutidos e utilizados como alvos farmacológicos para novos quimioterápicos anticânceres (Baglini *et al.*, 2021; Wang, J.; Lei, K.; Han, 2018).

3.2 Alvos biológicos para o tratamento do câncer

Os quimioterápicos anticânceres desempenham sua atividade farmacológica por meio de diferentes mecanismos de ação. Nesse contexto, podemos citar o DNA e as enzimas topoisomerasas, alvos farmacológicos de muitos fármacos utilizados clinicamente e que despertam o interesse durante o processo de desenvolvimento de drogas direcionadas ao câncer.

3.2.1 DNA

As células tumorais apresentam características que as diferem das células saudáveis. Dentre essas, está a habilidade de sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético, destruição imunológica e mutação do genoma. Muitas dessas características estão relacionadas ao DNA, tornando as

células cancerígenas mais suscetíveis a agentes direcionados ao mesmo (Almeida, L. C. de *et al.*, 2021).

Muitos medicamentos anticâncer desempenham sua atividade farmacológica por meio da interação com o DNA, essa interação pode ocorrer de forma covalente ou não, por meio de interações hidrofóbicas, polares e eletrostática de intercaladores catiônicos com bases polianiônicas, respectivamente. Essas drogas são geralmente classificadas em dois grandes grupos. O primeiro grupo corresponde as drogas que interagem de forma covalente com o DNA. As drogas pertencentes ao segundo grupo são aquelas capazes de formar complexos não covalentes com o DNA por intercalação ou ligação ao sulco (ranhura) (Almeida, L. C. de *et al.*, 2021; Hajian *et al.*, 2017).

Os ligantes covalentes são conhecidos como agentes alquilantes e incluem fármacos antitumorais como a ciclofosfamida e procarbazina. Os mesmos podem se transformar em espécies altamente reativas capazes de formar fortes ligações químicas com centros ricos em elétrons, como átomos de nitrogênio e enxofre. Os agentes alquilantes, interagem com o DNA formando adutos monofuncionais e/ou bifuncionais. Os monofuncionais, ocorre quando apenas uma única reação de alquilação ou platinação é permitida, já os bifuncionais, ocorrem quando ligações covalentes são formadas em centros nucleofílicos de duas bases diferentes no DNA induzindo ligações cruzadas ou formando adutos monofuncionais e/ou bifuncionais (Siddik, 2017).

Os intercaladores de DNA interagem de modo não covalente no espaço entre os pares de base do ácido nucléico e são caracterizados por apresentar uma estrutura molecular aromática policíclica planar. Eles se inserem entre os pares de base do DNA por meio da combinação de empilhamento π - π e interações hidrofóbicas. Outros tipos de interação como forças de Van der Waals, interação por ligação de hidrogênio e processo de transferência de carga, são fundamentais para manter a estabilidade do complexo agente-DNA. Os agentes intercaladores distorcem o ângulos de torção açúcar-fosfato do DNA, provocando o alongamento, enrijecimento e desenrolamento da hélice de DNA. Esses por sua vez, são classificados como antibióticos antraciclínicos, conhecidos também como venenos de topoisomerase, a amsacrina é um dos fármacos pertencente a esta classe (Almeida, L. C. de *et al.*, 2021; Sharma, V. *et al.*, 2020).

Os fármacos não intercalativos também são capazes de interagir com o DNA de modo não covalente, através da ligação aos sulcos maiores e menores presentes no mesmo. Essa interação ocorre principalmente por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou por reconhecimento estrutural de um local de ligação ao DNA . A trabectedina é um exemplo de

agente de ligação ao sulco, utilizado no tratamento do sarcoma de Ewing e câncer de ovário avançado (Almeida, L. C. de *et al.*, 2021; Jain; Bhattacharya, 2011).

3.2.2 *Enzimas topoisomerases*

As topoisomerases são enzimas nucleares envolvidas na regulação do estado topológico do DNA, sendo também responsáveis por outras funções relacionados ao DNA, como o processo de replicação, recombinação, transcrição, reparação, condensação cromossômica e segregação da cromatina. Em organismos eucariontes, as topoisomerases podem ser classificadas principalmente em topoisomerase tipo I (topo I) e tipo II (topo II) (Almeida, S. M. V. de *et al.*, 2017; Baglini *et al.*, 2021).

A topo I é classificada em topo IA e topo IB, ela é responsável por cortar uma fita de DNA e, usando a energia da torção helicoidal, transferir a outra vertente antes da religação. A topo II é representada pelas isoformas topo II α e topo II β . Ela provoca uma dupla quebra da fita de DNA e permite a passagem de um segundo DNA de fita dupla através da interrupção transitória. Ela atua como um multímero simétrico, ligando-se a ambas extremidades do DNA, e dessa forma pode relaxar o DNA superenrolado positivamente e negativamente (Ceramella *et al.*, 2020).

As topoisomerases são fundamentais para a manutenção do DNA e consequente viabilidade celular e sua expressão pode se encontrar aumentada durante os processos proliferativos carcinogênicos. Dependendo da linhagem celular do câncer, as enzimas Topo I e Topo II podem apresentar uma expressão diferenciada. Por exemplo, em linhagens celulares de câncer de cólon, há uma superexpressão de isoformas Topo I, enquanto em linhas celulares de câncer de mama e ovário, há uma superexpressão de Topo II (Gomes *et al.*, 2022). Um estudo realizado com 24.262 pacientes com diversos tipos de câncer, demonstrou que a proteína Topo I se encontrava superexpressa em 51% dos tumores, incluindo câncer de pulmão, intestino, cervical e retal. E 4% dos tumores tinham amplificação de Topo II α , incluindo câncer de vesícula, gastroesofágico, bexiga e mama invasivo (Heestand *et al.*, 2017).

Os inibidores das enzimas topoisomerases podem atuar de maneiras distintas, porém o mecanismo conhecido como “veneno de topoisomerase” é o de maior relevância clínica para quimioterápicos antitumorais. Esse mecanismo compreende a formação um complexo ternário formado por proteína-DNA-fármaco, onde os agentes se ligam ao complexo DNA clivado/proteína, impedindo a religação do DNA e bloqueando a enzima em um “complexo de clivagem” que se acumula e causa o efeito citotóxico. Esse mecanismo é exemplificado por

derivados da camptotecina que atuam sobre as topoisomerases tipo I β , e fármacos como amsacrina e doxorubicina, que atuam sobre topo II (Delgado *et al.*, 2018; Hevener *et al.*, 2018).

Um segundo mecanismo de veneno a topoisomerase ocorre por meio da formação covalente dependente de redox de um complexo droga-enzima, onde um composto se liga a um local distal do sítio ativo do DNA e trabalha para estabilizar o complexo de clivagem enzima-DNA, resultando em um acúmulo e morte celular final, esse mecanismo pode ser observado para o fármaco etoposídeo (Delgado *et al.*, 2018; Hevener *et al.*, 2018)

As características estruturais das drogas, demonstram ser um fator importante para inibição das diferentes isoformas da topoisomerase. Um estudo recente contendo diferentes inibidores de topoisomerase com atividade *in silico* e *in vitro*, observou que a maioria dos inibidores da Topo I apresentaram estruturas de médio a grande porte, contendo uma porção rígida essencial para característica intercalativa e outra flexível que permitiu interação com aminoácidos do sítio ativo. Já os inibidores da Topoisomerase II α apresentaram estruturas médias e grandes, além da planaridade dos anéis aromáticos, que são atenuados devido aos anéis flexíveis, podendo também apresentar elementos que restringem a conformação. Inibidores duais, exibiram em sua maioria cadeias relativamente longas, além de uma porção plana e rígida sugestiva de afinidade por Topo I e uma região flexível característica de fármacos seletivos para Topo II (Gomes *et al.*, 2022).

3.3 Albumina sérica humana (HSA)

A albumina sérica humana (HSA) é uma proteína de cadeia simples formada por 585 aminoácidos. Sua estrutura secundária é altamente flexível e formada por 67% de α -hélice e 17 pontes dissulfeto com 6 voltas que atuam como reticuladores para os três domínios homólogos (I, II e II), cada um dos quais é subdividido em dois subdomínios, A e B. Ela é produzida no fígado e corresponde a proteína plasmática mais encontrada na corrente sanguínea, mesmo assim, a maior parte da albumina não está no sangue (cerca de 60%), mas armazenada no espaço intersticial (Aseman *et al.*, 2019; Rabbani *et al.*, 2017; Spada *et al.*, 2021).

A HSA está associada a vários processos fisiológicos importantes, como no metabolismo, distribuição de fluidos teciduais, nutrição, regulação do potencial redox, manutenção da pressão osmótica do sangue e transporte de substratos. Ela possui a capacidade de ligação a várias pequenas moléculas, atuando como transportador de compostos endógenos e exógenos (Rabbani *et al.*, 2017).

Em células tumorais, elas estão presentes em níveis relativamente mais altos do que nas células normais, portanto, drogas que interagem com HSA podem ser transportadas com eficiência para as células cancerígenas. No câncer, ela representa uma proteína versátil podendo ser usada como um sistema transportador a fim de fornecer especificidade tumoral, reduzir a toxicidade medicamentosa, manter a concentração terapêutica de medicamentos, além de poder atuar no tempo de meia-vida da droga (Kudarha; Sawant, 2017; Lakshmi *et al.*, 2017).

Logo, a ligação das drogas á HSA pode influenciar na absorção, transporte, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade de produtos farmacêuticos (Aseman *et al.*, 2019; Guhathakurta *et al.*, 2017). Os principais sítios de ligação das drogas em HSA estão localizados em bolsas hidrofóbicas nos subdomínios IIA e IIIA, como resíduos de triptofano (Trp-214) e tirosina (Tyr-411) (Aseman *et al.*, 2019). Ânions heterocíclicos volumosos, ligam-se ao sítio I e os carboxilatos aromáticos, ligam-se ao sítio II. Além desses, a albumina também contém outros sítios de ligação como Cys34, onde podem conjugar pequenas moléculas, bem como drogas baseadas em proteínas e peptídeos e sítios de ligação de ácidos graxos (Kudarha; Sawant, 2017).

3.4 Estratégias Aplicadas ao Desenvolvimento de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas inclui a identificação do alvo farmacológico, identificação de um composto hit, otimização do hit, estudos e avaliação pré-clínica e clínica dos novos candidatos a medicamentos. Esse processo é complexo, demorado e custoso, levando cerca de 12 anos desde o início até a comercialização, com um custo médio de US\$ 1,8 bilhão. Diferentes estratégias de planejamento e modificação molecular podem ser utilizadas para obtenção e otimização de candidatos a fármacos, as quais, associadas à utilização de técnicas computacionais, são imprescindíveis para o êxito na obtenção de novas drogas (Crampon *et al.*, 2021; Lima, L. M., 2007; Wang, S.; Dong; Sheng, 2019a).

3.4.1 Estratégias de planejamento de fármacos

A compreensão do arranjo topológico de alvos biológicos permite o planejamento de um novo fármaco baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Quando a estrutura do alvo farmacológico é desconhecida, um fármaco também pode ser planejado baseando-se na estrutura de ligantes bioativos (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*). Nesse contexto, algumas moléculas pequenas com baixo peso molecular e pouca

complexidade, chamadas de “fragmentos”, capazes de se ligarem a alvos farmacológicos específicos, também podem ser utilizadas como *scaffolds* (do inglês, Fragment-Based Drug Design) (Bissaro; Sturlese; Moro, 2020; Guido; Andricopulo; Oliva, 2010; Kirsch *et al.*, 2019).

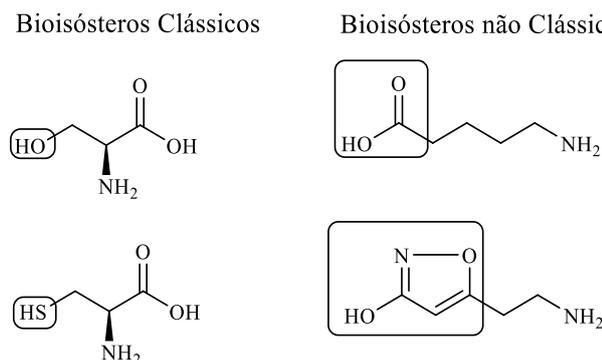
3.4.2 Estratégias de Modificação molecular

Dentre as estratégias de modificação molecular, podemos destacar o bioisosterismo e a simplificação molecular, como sendo fundamentais no processo de desenvolvimento e otimização de um composto *lead* (Lima, L. M., 2007).

3.4.2.1 Bioisosterismo e Retroisosterismo

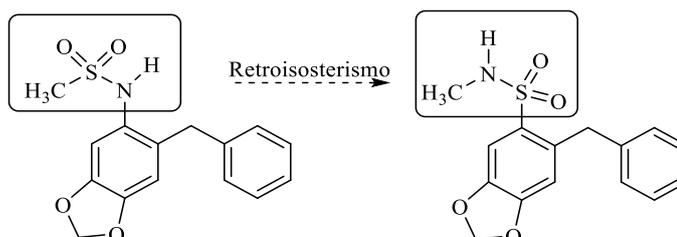
O bioisosterismo envolve a identificação de fragmentos moleculares que são intercambiáveis sem qualquer perturbação significativa na atividade biológica. Essa técnica permite a modificação racional de um composto e é importante tanto no processo de descoberta de um *lead*, como no processo de otimização. A utilização dessa técnica, pode promover benefícios como: aumento de potência, melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, melhor seletividade e menor toxicidade (Jayashree; Nikhil; Paul, 2022; Kumari *et al.*, 2020).

Os bioisósteros podem ser classificados em clássicos e não clássicos. Os clássicos, correspondem a grupos funcionais que satisfazem a lei de deslocamento de hidretos de Grimm, bem como os conceitos de isósteros de Erlenmeyer e podem ser subdivididos em cinco categorias: (a) átomos ou grupos monovalentes, (b) átomos ou grupos divalentes, (c) átomos ou grupos trivalentes, (d) átomos ou grupos tetravalentes, e (e) equivalentes de anel. Os bioisósteros não clássicos não preenchem os critérios de fatores estéricos e eletrônicos necessários para os isósteros clássicos, podendo diferir significativamente em distribuição eletrônica, propriedades físico-químicas, estéricas e topológicas (figura 3) (Dick; Cocklin, 2020; Kumari *et al.*, 2020).

Figura 3 - Exemplo de bioisósteros clássicos e não clássicos

Fonte: Adaptado de Lima L. e Barreiro E. (2005).

O retroisosterismo, pertence a categoria do bioisosterismo não clássico, e se baseia na inversão de um grupo funcional presente na estrutura do composto *lead*, produzindo um isótero com a mesma função (figura 4). Essa estratégia é muito utilizada para otimização de compostos *lead*, por permitir, dentre outros fatores, a otimização do perfil de interação com o biorreceptor (Lima, L.; Barreiro, E., 2005).

Figura 4 - Exemplo de retroisosterismo

Fonte: Adaptado de Lima L. e Barreiro E. (2005).

3.4.2.2 Simplificação Molecular

A simplificação molecular ocorre pela remoção de grupos não essenciais presentes na estrutura química de um composto, como anéis ou centros quirais, reduzindo assim sua complexidade. Para realizar a simplificação molecular de um composto é necessário análise criteriosa de sua estrutura, determinação de subestruturas essenciais para a atividade biológica, compreensão das relações estrutura química-atividade biológica (SARs) e conhecimento de seus farmacóforos (Wang, S.; Dong; Sheng, 2019a).

Essa estratégia permite obter novos compostos mais simples, com rotas sintéticas mais acessíveis, melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico. A simplificação molecular é

muito utilizada na obtenção de derivados de produtos naturais, que geralmente apresentam complexidade estrutural. Como exemplo, temos o vorinostat, aprovado em 2006 para o tratamento de linfoma cutâneo primário avançado de células T, obtido a partir da simplificação molecular do produto natural Tricostatina A (figura 5) (Wang, S.; Dong; Sheng, 2019b).

Figura 5 - Simplificação molecular para obtenção do Vorinostat



Fonte: Adaptado de Wang, S., Dong e Sheng (2019b)

3.4.3 Estratégias computacionais

Os estudos computacionais têm sido essenciais para a descoberta de novas drogas, pois têm facilitado a identificação de *leads* para testes experimentais *in vitro* e *in vivo*. O *docking* molecular, a simulação de dinâmica molecular e a modelagem ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), são os três componentes mais amplamente usados da modelagem computacional (Adelusi *et al.*, 2022).

3.4.3.1 Modelagem molecular: Docking molecular

A modelagem molecular pode ser compreendida como um conjunto de ferramentas que permite a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (Barreiro, E. J. *et al.*, 1997). O *docking* molecular é um dos métodos computacionais mais utilizados no processo de descoberta de novas drogas, pois permite compreender o modo de interação entre uma molécula (ligante) e seu alvo biológico. A interação entre um ligante e seu alvo pode ocorrer de diferentes formas e a compreensão desse fenômeno é fundamental no processo de descoberta e otimização de um composto *lead*. A aplicação de métodos computacionais como o *docking* molecular além de melhorar as chances de êxito no processo de descoberta, também possibilita a redução de custos no desenvolvimento de um novo candidato a fármaco (Cavasotto; Aucar, 2020; Pinzi; Rastelli, 2019).

Essa abordagem *in silico* permite explorar a conformação que o ligante adota no local de ligação do alvo molecular e estimar a energia livre de ligação do complexo receptor-ligante, permitindo a compreensão de fenômenos que estão envolvidos no processo de reconhecimento intermolecular. Através do *docking* molecular é possível prever e diferenciar as interações entre o ligante e seu alvo, como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interação hidrofóbicas, e dessa forma observar quais fragmentos químicos dos ligantes são essenciais para a atividade biológica (Naqvi *et al.*, 2019).

Para que o *docking* seja realizado de modo correto, é necessária a alta resolução de estruturas cristalográficas de raios X, RMN ou estruturas modeladas por homologia com um sítio de ligação conhecido. Milhares de estrutura 3D de proteínas determinadas experimentalmente, podem ser obtidas através do banco de dados de proteínas (PDB). Algumas estruturas de proteínas mais complexas não estão disponíveis no PDB, entretanto, sua estrutura tridimensional pode ser modelada usando servidores de modelagem por homologia. Entre os *softwares* de *docking*, podemos citar o Autodock, DockVina 1.0.3, GOLD 3.1 (Adelusi *et al.*, 2022).

Atualmente, o *docking* molecular é empregado na triagem virtual baseada em estrutura, para identificar séries de alvos para os quais os ligantes apresentam boa complementariedade (*target fishing* e *profiling*), identificação de ligantes que se ligam simultaneamente a um pool de alvos de interesse selecionados (polifarmacologia) e para identificar novas aplicações para compostos químicos com perfis de segurança já otimizados (Pinzi; Rastelli, 2019; Wu, D. *et al.*, 2018).

3.4.3.2 Predição farmacocinética *in silico*

Propriedades farmacocinéticas indesejáveis e toxicidades inaceitáveis, representam as principais causas do insucesso de candidatos a fármacos na fase de ensaios clínicos. Um candidato a fármaco apropriado, deve apresentar um bom equilíbrio de propriedades farmacodinâmicas, além de alta potência e perfil desejável de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade tolerável (ADMET) (Jia *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2021).

As previsões *in silico* de ADMET permitem avaliar simultaneamente vários parâmetros farmacocinéticos, e excluir prontamente compostos inadequados, reduzindo o número de falhas em estágios avançados de desenvolvimento de medicamentos e conseqüentemente reduzindo custos. A estimativa de propriedades farmacocinéticas durante as fases iniciais da descoberta

de medicamentos tem sido fundamental para orientar a otimização de compostos *hit-to-lead* (Ferreira, L. L. G.; Andricopulo, 2019).

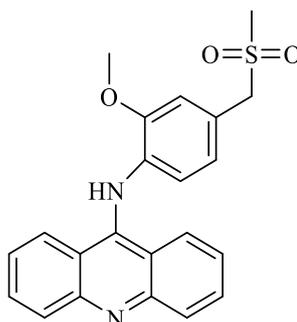
Diversas ferramentas estão disponíveis para a previsão de ADMET, dentre as quais podemos citar: QikProp, DataWarrior, pk-CSM, admetSAR, SwissADME, MetaSite, StarDrop, etc. Importantes parâmetros podem ser analisados por meio destas ferramentas, como lipofilicidade (Log P), solubilidade em água, absorção gastrointestinal, permeação da barreira hemato encefálica, parâmetros de *druglikeness*, interação com glicoproteína-P (substrato ou inibidor) e capacidade de ser substrato ou inibidor de diferentes isoformas do citocromo P450 (Daina; Michielin; Zoete, 2017; Ferreira, L. L. G.; Andricopulo, 2019).

3.5 Scaffolds acridínicos com potencial atividade antitumoral

Na busca por novos agentes quimioterápicos anticâncer, os derivados da acridina são amplamente explorados. Os derivados acridínicos são compostos heterocíclicos planares com amplas propriedades biológicas e sua planaridade permite a alta intercalação ao DNA, bem como a interação e inibição de enzimas fundamentais como topoisomerases tipo I e II, telomerasas e proteínas quinases (Almeida, S. M. V. de *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2018).

O derivado acridínico amsacrina (m-AMSA) (figura 6), foi o primeiro inibidor de topoisomerase aprovado clinicamente e vem sendo utilizado para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda. Apesar de ser um intercalador e inibidor da topoisomerase II, este medicamento apresenta limitações. O metabolismo da amsacrina tem sido associado à produção de radicais livres, podendo causar sérios danos aos tecidos normais (Barros *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017).

Figura 6 - Estrutura química da amsacrina

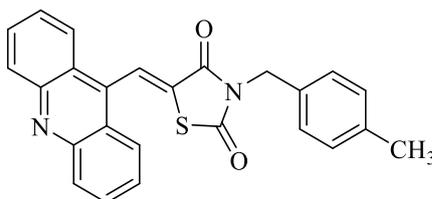


Fonte: Adaptado de Zigao Yuan *et al.* (2017)

Reconhecendo o potencial do núcleo acridínico e a necessidade de novas drogas antitumorais, Barros *et al.* (2013) sintetizaram uma nova série de agentes citotóxicos derivados de tiazacridina (ATZD), que acoplam o núcleo de acridina e tiazolidina. Para avaliação da atividade citotóxica dos compostos obtidos, foram utilizadas células HCT-8 de carcinoma do cólon humano, tratadas com 2,5, 5 e 10 µg/ml por 12 e/ou 24 horas. Os resultados foram analisados em três diferentes ensaios (exclusão de corante azul tripan, exclusão de iodeto de propídio e incorporação da BrdU), amsacrina (0,3 µg/ml) foi utilizada como controle positivo.

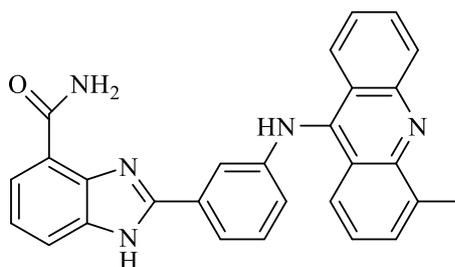
Os compostos sintetizados reduziram a proliferação de células HCT-8 em 12 e 24 horas de forma dependente da dose em todos os ensaios. O composto AC-4 (figura 7) foi aquele que apresentou melhor atividade citotóxica, especialmente no método de exclusão do corante azul de tripan após incubação de 24 horas, onde foi capaz de provocar considerável inibição nas concentrações de 5 e 10 µg/ml. Adicionalmente, a atividade inibitória para topoisomerase I foi analisada em ensaio de relaxamento de DNA, o AC-4 (50 µg/ml) apresentou promissora atividade quando comparado ao controle positivo camptotecina (100 µM) (Barros *et al.*, 2013).

Figura 7 - Estrutura química do composto AC-4



Fonte: Adaptado de Barros *et al.* (2013).

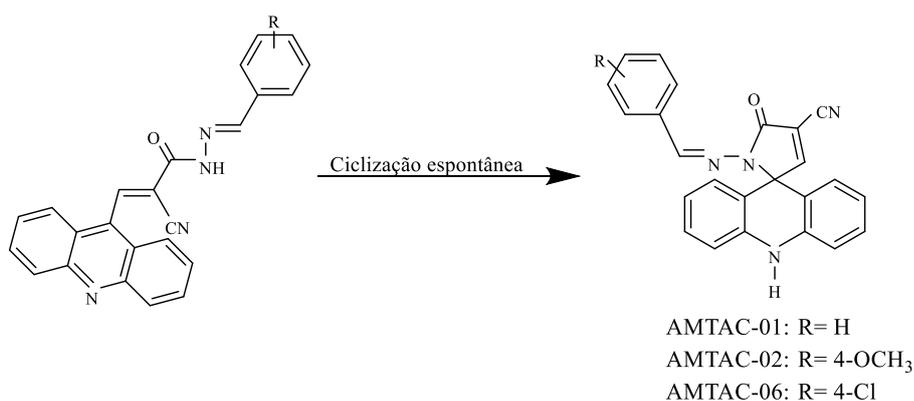
Uma nova série de acridinas 4-amidobenzimidazólicas foi sintetizada por Zigao Yuan *et al.* (2017), com o objetivo de obter inibidores duplos de Topo e PARP-1. Dentre os compostos obtidos, o 111 (figura 8) demonstrou atividade inibitória contra PARP-1 com IC₅₀ de 0,45 ± 0,03, apesar do valor ser inferior ao apresentado para o controle positivo Olaparib (C₅₀ = 0,02 ± 0,01). O 111 também apresentou atividade inibitória contra Topo I comparável com a camptotecina a 100 µM, além de apresentar boa atividade inibitória de Topo I em concentrações mais baixas (2 µM).

Figura 8 - Estrutura química do 111

Fonte: Adaptado de Zigao Yuan *et al.* (2017)

Quanto a atividade citotóxica, o 111 apresentou potencial citotóxico frente diferentes linhagens celulares (MCF-7, HCC1937, HCT116), além de suprimir significativamente *in vivo* o crescimento do tumor de xenoinxerto MCF-7, sem toxicidade adversa. Na linhagem celular de câncer de cólon humana HCT116, conhecida por expressar níveis elevados de expressão de Topo I, o 111 apresentou um IC_{50} de $1,43 \pm 0,37$, enquanto que a m-AMSA apresentou IC_{50} de $3,89 \pm 0,76$. Esse composto também provocou a interrupção da fase G0/G1 estável, em ensaio de western blot. Estudos farmacocinéticos preliminares indicaram que 111 exibiu estabilidade metabólica em microsomas de fígado humano / camundongo / coelho e podem ser metabolizados por CYP2C9 e CYP3A4. Dessa forma o composto em questão demonstra potencial para o tratamento do câncer (Yuan, Zigao *et al.*, 2017).

Conhecendo o potencial dos derivados acridínicos, Almeida *et al.* (2016) sintetizaram dois novos derivados espiroacridínicos denominadaos AMTAC-01 e AMTAC-02 (figura 9), e avaliaram seu potencial atitumoral. Em ensaio de inibição de topoisomerase, os mesmos não apresentaram atividade sobre Topo I, porém apresentaram atividade inibitória sobre Topo II de modo semelhante a m-AMSA, estando todos na concentração de 100 μ M.

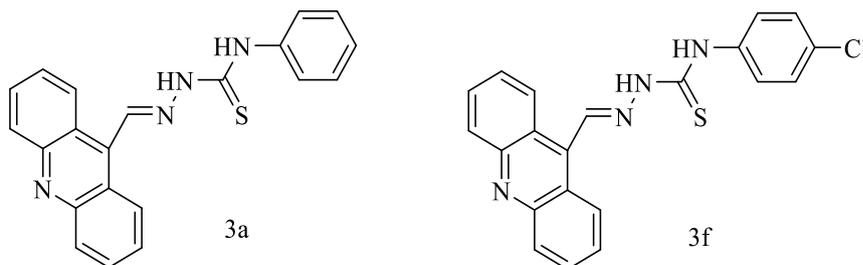
Figura 9 - Estrutura química dos compostos AMTAC-01, AMTAC-02 e AMTAC-06

Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2016) e Gouveia *et al.* (2018)

Estudos de ligação ao DNA de timo de bezerro (ctDNA) avaliados através da absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS) revelaram que AMTAC-01 (50 μM) e AMTAC-02 (100 μM) foram capazes de formar complexos com o DNA. Os compostos AMTAC-01 e AMTAC-02 apresentaram constantes de ligação (K_b) típicas para a formação de complexos entre corantes orgânicos e DNA de $2,3 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$, respectivamente. As propriedades de ligação ao ctDNA também foram investigadas por espectroscopia de fluorescência, onde os compostos foram capazes de provocar a extinção de emissão da fluorescência, confirmando a interação com o ctDNA. Os novos derivados foram ativos na faixa de μM frente diferentes linhagens celulares tumorais *in vitro*, com atividade semelhante a m-AMSA, especialmente o AMTAC-02 (Almeida *et al.*, 2016).

Tomando por base o estudo de Almeida *et al.* (2016), novos derivados espiro-acridínicos com diferentes substituintes no anel fenil foram sintetizados e avaliados por Gouveia *et al.* (2018). Dentre os compostos estudados, a 1-(4-clorobenzilidenoamino)-5-oxo-1,5-diidro-10H-spiro-[acridina-9,2-pirrol]-4-carbonitrila (AMTAC-06) (figura 9) apresentou inibição da topoisomerase II de 84,34% em comparação aos controles positivos e foi capaz de intercalar os pares de bases de DNA no local ativo da topoisomerase II α . De tal modo, AMTAC-06 revelou-se um composto promissor por apresentar tanto capacidade de interagir com o DNA e proteínas plasmáticas, como também inibindo a topoisomerase II humana.

Almeida *et al.* (2015) também utilizou o núcleo acridínico como *scaffold* e realizou modificações em sua estrutura a partir da adição de diferentes porções tiosemicarbazidas substituídas. Dentre os compostos obtidos, o 3a (figura 10) foi o mais ativo em ensaio antiproliferativo, com valores de GI_{50} inferiores a 10 μM para as seguintes linhagens de células tumorais: glioma (U251), leucemia (K-562), mama (MCF7), mama resistente (NCI-ADR), rim (786-O), pulmão (NCI-460), ovário (OVCAR), próstata (PC-3) e cólon (HT-29). O 3a na concentração de 50 μM foi testado na ausência e na presença de DNA de timo de bezerro (ctDNA) (0 – 120 μM), onde foi capaz de produzir significativa hiperchromia (92,58 % a 120 μM de ctDNA) e ligeiro deslocamento batocrômico com o aumento da concentração de ctDNA, indicando formação de complexo 3a-DNA.

Figura 10 - Acridinas com diferentes porções tiosemicarbazidas substituídas

Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2015).

O composto 3f (figura 10), também sintetizado por Almeida *et al.* (2015), apresentou melhor interação com ctDNA *in vitro*, com valor de constante de ligação $K_b = 1,6 \times 10^6$. Sugerindo forte ligação do composto ao ctDNA.

Em estudo desenvolvido por Silva Filho *et al.* (2019), o composto 3a sintetizado por Almeida *et al.* (2015) foi avaliado *in silico* através do *docking* molecular frente ao alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK), no qual apresentou valor de $\Delta G = -9,12 \text{ kcal mol}^{-1}$ e a amsacrina $\Delta G = -10,34 \text{ kcal mol}^{-1}$. Em estudo *in vitro* frente DNA plasmidial pUC19, a molécula 3a foi capaz de inibir a topoisomerase de forma semelhante a amsacrina, ambas na concentração de $100 \mu\text{M}$.

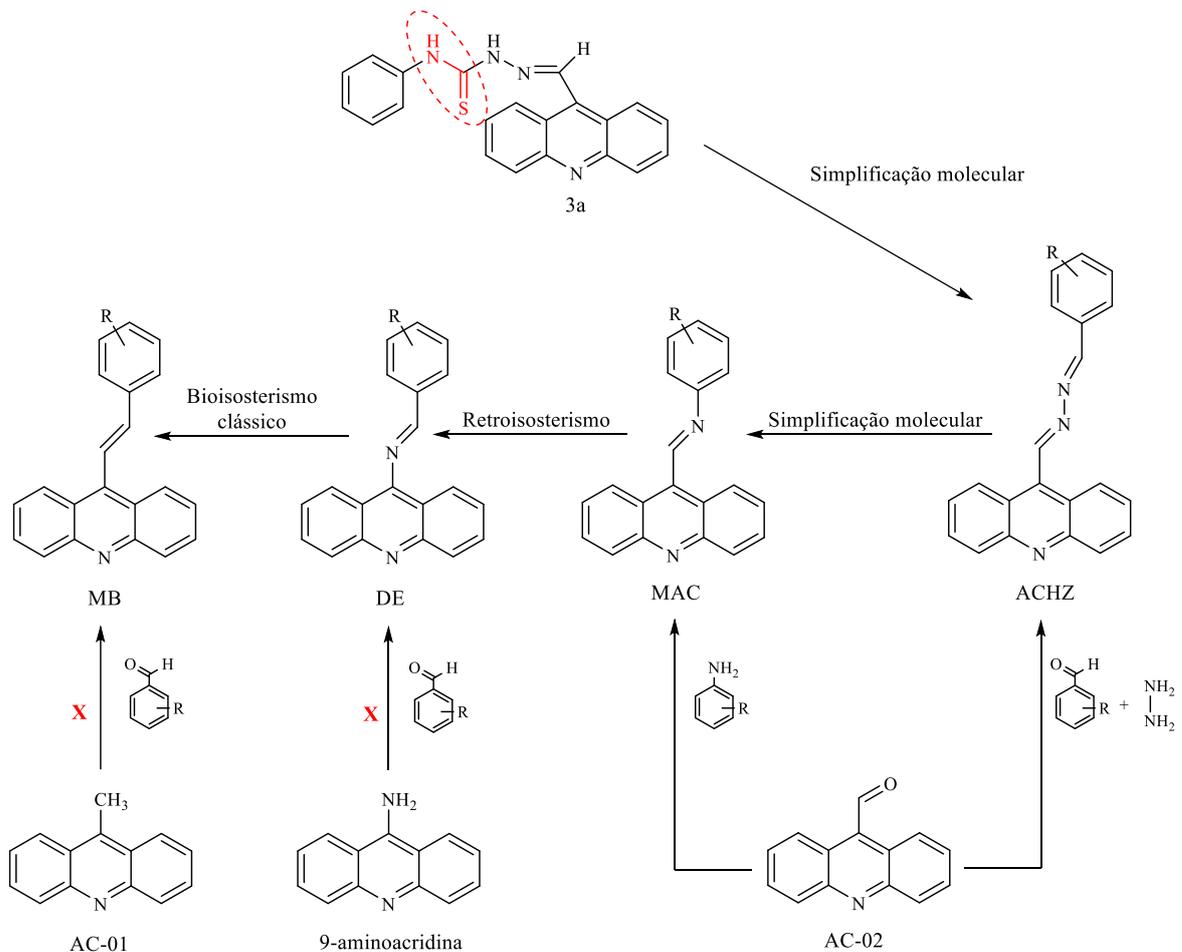
Considerando o potencial antitumoral do composto 3a, o mesmo será utilizado em nosso estudo como protótipo para o desenvolvimento de uma nova série de derivados acridínicos com diferentes substituintes, porém sem apresentar a porção tioamida, também direcionados para o tratamento do câncer, atendendo uma proposta de simplificação molecular.

4 METODOLOGIA

4.1 Estratégia de planejamento

O composto 3a desenvolvido por Almeida *et al.* (2015) foi utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novas séries de derivados acridínicos. Conforme observado no esquema 1, planejamos uma simplificação molecular na estrutura de 3a (remoção da porção tioamida) para obtenção da série diazenilacridina (ACHZ), a partir da qual foi realizada mais uma simplificação para obtenção da série fenilmetanimina (MAC), desta, utilizando retroisosterismo para obtenção da série fenilmetanimina (DE), a partir da qual, foi realizado um bioisosterismo clássico para obtenção da série estililacridina (MB).

Esquema 1 - Estratégia de desenvolvimento para os novos derivados acridínicos



Fonte: Autoria própria (2023).

4.2 Estudos *in silico*

4.2.1 Docking molecular

Para realização do estudo *in silico* de *docking* molecular, as estruturas cristalográficas da topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK), topoisomerase I complexada com DNA (PDB ID: 1K4T) e DNA (PDB ID: 1BNA; 1G3X) foram obtidas do *research collaboratory of structure bioinformatics protein data bank* (<https://www.rcsb.org/>) para triagem inicial das moléculas. O *docking* molecular dos compostos no sítio ativo dos alvos foi realizado através do programa AutoDock Tools (ADT) 1.5.6.

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 os centros do grid, dimensões e espaçamento dispostas na tabela 1 para o respectivo alvo cristalizado:

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no *docking* molecular para cada alvo farmacológico

PDB ID	Centro do Gridbox	Dimensões	Espaçamento
5GWK	30,938; -23,214 e - 58,15 Å	60 x 60 x 60 Å	0,375 Å
1K4T	21,543; -3,919; 28,328 Å	40 x 40 x 40 Å	0,375 Å
1BNA	14,780; 20,976 e 8,807 Å	96 x 96 x 126 Å	0,375 Å
1G3X	59,818; 52,032 e 58,995 Å	16 x 16 x 20 Å	1,000 Å

Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida foram gerados os cálculos de interação utilizando o algoritmo genérico 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).

Os resultados do *docking* foram analisados através do programa Discovery Studio 2017 R2 Client, o qual pode-se identificar as regiões onde ocorrem as interações, os tipos de

interação, energia e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima envolvidos nessas interações (Singh, A.; Jana, 2017).

Em geral, a confiabilidade dos resultados de *docking* depende da similaridade entre o modo de ligação experimental e a solução de menor energia. Um valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) $\leq 2,0$ Å é amplamente aceito como a distinção entre o sucesso e o fracasso em reproduzir um modo de ligação conhecido (Yusuf *et al.*, 2008). Neste trabalho, foi aceito como metodologia validada, todo resultado que apresentasse valor de RMSD $\leq 2,0$ Å.

4.2.1.1 Obtenção e preparação das enzimas

Os ligantes co-cristalizados, as moléculas de solvente e os cofatores foram removidos através do PyMol para realização do *docking*. Usando o ADT, átomos de hidrogênio polares foram adicionados geometricamente à estrutura do receptor proteico e os átomos de hidrogênio não-polares foram mesclados com os respectivos átomos de carbono, e cargas atômicas parciais foram adicionadas utilizando o método de Gasteiger Marsili (Gasteiger; Marsili, 1980; Morris *et al.*, 1998).

4.2.1.2 Preparação dos ligantes

As estruturas dos ligantes foram desenhadas no programa Marvin e, em seguida, submetidas 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.

As estruturas dos ligantes tiveram a adição dos hidrogênios polares no PyMol. Em seguida as estruturas foram carregadas no ADT e aplicadas à função de ligante as quais o ADT atribuiu automaticamente a mesclagem dos hidrogênios não-polares e adição das cargas atômicas parciais pelo método de Gasteiger (Kumar, A.; Bora, 2014).

4.2.1.3 Estudos de *docking* molecular para validação (*redocking*)

Visto que a estrutura cristalográfica da topoisomerase II α (PDB ID: 5GWK), é co-cristalizada com o ligante etoposídeo, foi realizada a redocagem como método de validação. Este método consiste em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão aos estudos de ancoramento molecular e observar se as interações com os resíduos de

aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante são preservados, ou seja, que o RMSD (*root-mean-square deviation*) entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico*.

4.2.2 *Predição farmacocinética*

As predições farmacocinéticas se deram com a utilização da plataforma online SwissADME e de acesso gratuito em: <http://www.swissadme.ch/>. A mesma foi desenvolvida pela *Swiss Institute of Bioinformatics* na Suíça, com referências disponibilizadas no artigo de Daina, Michielin e Zoete (2017).

As moléculas foram desenhadas na plataforma SwissADME, gerando posteriormente seus respectivos SMILES (do inglês, *simplified molecular input line entry specification*) e por fim obtendo acesso a diferentes parâmetros farmacocinéticos. Os seguintes parâmetros foram escolhidos para análise neste trabalho: capacidade de absorção gastrointestinal e permeação da barreira hemato encefálica; interação com a glicoproteína P; log P, log S, parâmetros de *druglikeness* e potencial inibição de isoformas da CYP450.

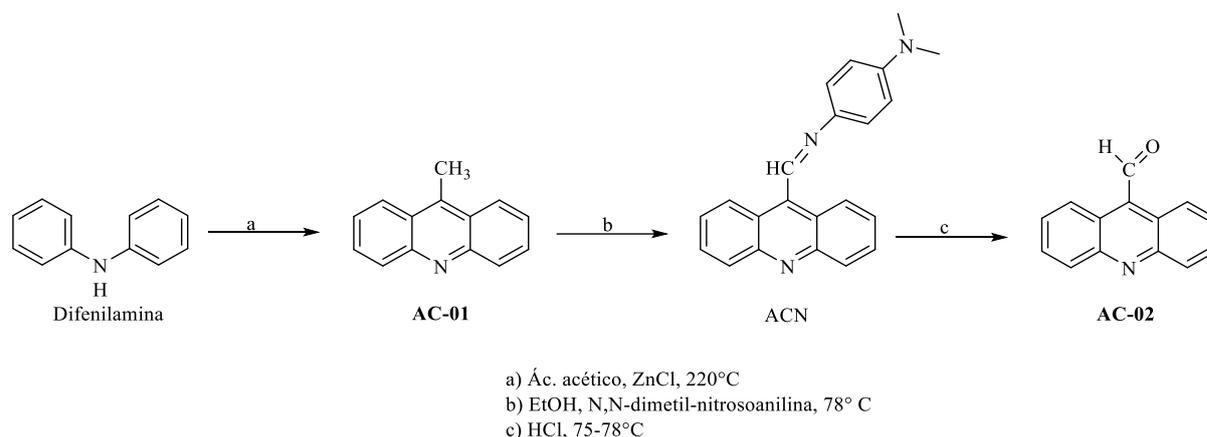
4.3 **Síntese Orgânica**

A síntese orgânica ocorreu no Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). A rota sintética empregada para obtenção dos derivados acridínicos, ocorreu por via linear e através da reação de obtenção do aldeído de acridina (AC-02) seguido da condensação aos diferentes compostos orgânicos: Anilinas e Hidrazina seguida de nova condensação a Aldeídos. A metodologia de síntese utilizada para obtenção dos intermediários, bem como dos produtos finais, está detalhada nas sessões abaixo. Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

4.3.1 *Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-02)*

A rota sintética empregada para a obtenção dos produtos de partida AC-01 e AC-02, está representada no esquema 2, e detalhada nas sessões abaixo.

Esquema 2 - Rota sintética para obtenção dos reagentes AC-01 e AC-02



Fonte: Autoria própria (2023).

4.3.1.1 Síntese da 9-metilacridina (AC-01)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 5 g de difenilamina (0,02958 mols), 50 g (0,36686 mols) de cloreto de zinco e 5 mL de ácido acético. A reação foi mantida sob agitação magnética e refluxo, a uma temperatura de aproximadamente 210°C, durante 8 horas. Após esse período, a reação aquecida foi tratada com 100 mL de uma solução recém-preparada de ácido sulfúrico a 20% e, em seguida, alcalinizada com a adição de hidróxido de amônio concentrado até pH 8. Em seguida foi adicionado acetato de etila ao meio e posteriormente foi realizada a separação de fases.

Na fase orgânica (acetato de etila) foi então adicionado sulfato de sódio anidro. Posteriormente a solução foi filtrada e rotoevaporada (50°C). O precipitado obtido foi solubilizado em água, e na solução foi adicionado ácido clorídrico até alcançar pH 2. A solução em questão foi filtrada e posteriormente adicionada aos poucos em uma solução de NaHCO₃ com pH 8, se obtendo o precipitado final que passou por mais um processo de filtração e posteriormente foi deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 2).

4.3.1.2 Síntese do N-(acridina-9-ilmetileno)-N,N-dimetilbenzeno-1,4-diamino (ACN)

Em um balão redondo de 250 mL, foram adicionados 0,9 g (0,00467 mols) do produto obtido na etapa anterior, o AC-01, e 1,7646 g (0,01168 mols) de N,N-dimetil-4-nitrosoanilina, na presença de 20 mL de EtOH. O sistema reacional foi deixado em agitação magnética e aquecimento, a uma temperatura de 78°C, durante 8 horas. Ao fim da reação, essa foi filtrada e

lavada três vezes com etanol aquecido, 5 ml para cada lavagem, obtendo-se o ACN-01 (esquema 2).

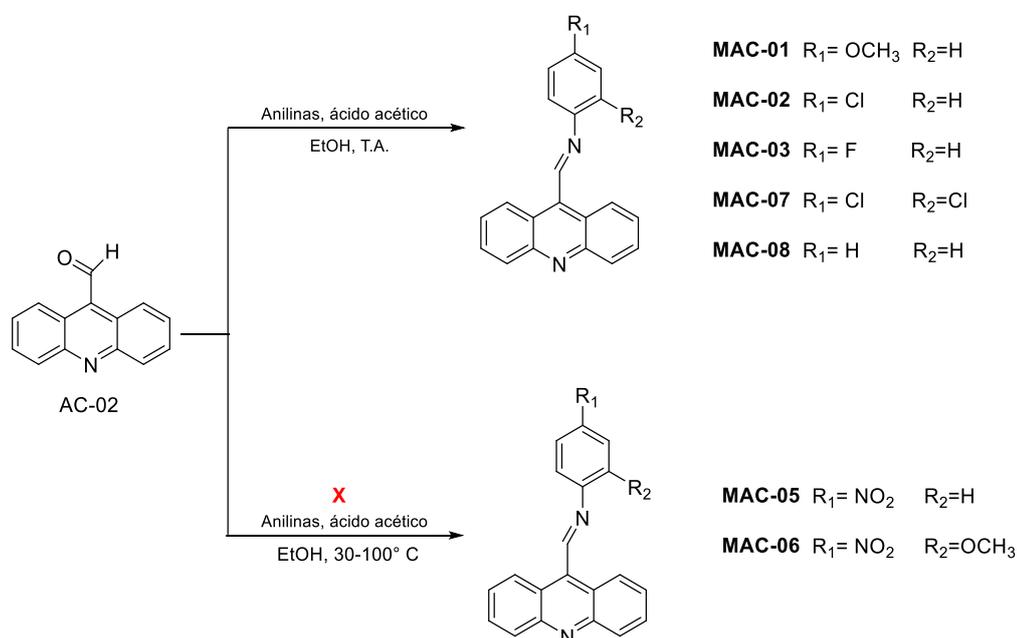
4.3.1.3 Síntese do produto final: acridina-9-carboxaldeído (AC-02)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 3 g (0,00923 mols) do produto obtido na etapa anterior, o ACN-01 e 60 mL de ácido clorídrico a 6 M, mantida por 6 horas, em agitação magnética e aquecimento, a uma temperatura de 75-78°C. O produto AC-02 (esquema 2) foi resfriado a temperatura ambiente, filtrado e o seu precipitado lavado com 50 mL de uma solução de ácido clorídrico a 2M, sendo novamente o precipitado solubilizado em uma solução de HCl/H₂O até pH 2. A solução foi filtrada e na fase aquosa foi adicionado NaHCO₃ até obter pH 8, ocorrendo a precipitação dos cristais de AC-02. Os cristais obtidos apresentaram aparência amarela.

4.3.2 Síntese da série fenilmetanimina (MAC)

No esquema 3, está apresentado a metodologia geral de síntese para os derivados acridínicos da série fenilmetanimina.

Esquema 3 - Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação do aldeído de acridina (AC-02) a diferentes anilinas



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

4.3.2.1 (E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-metoxifenil)metanimina (MAC-01)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 0,0500 g (0,00024 mols) de AC-02, 0,0297 g (0,00024 mols) de 4-metoxianilina, 4 mL de EtOH e 4 gotas de ácido acético. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 16 horas, até sua finalização. Posteriormente, o precipitado formado no meio reacional foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 3).

4.3.2.2 (E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-clorofenil) metanimina (MAC-02)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,1000 g (0,00048 mols) de AC-02, 0,0616 g (0,00048 mols) de 4-cloroanilina, 5 mL de EtOH e 4 gotas de ácido acético. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 17:30 horas, até sua finalização. Posteriormente, o precipitado formado no meio reacional foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 3).

4.3.2.3 (E)-1-(acridin-9-il)-N-(4-fluorofenil)metanimina (MAC-03)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,1000 g (0,00048 mols) de AC-02, 0,042 mL (0,00048 mols) de 4-fluoroanilina, 5 mL de EtOH. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 3 horas, até sua finalização. Posteriormente, foi adicionado água destilada ao meio reacional para favorecer a precipitação dos cristais. O precipitado obtido foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 3).

4.3.2.4 (E)-1-(acridin-9-il)-N-(2,4-diclorofenil)metanimina (MAC-07)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,1000 g (0,00048 mols) de AC-02, 0,07825 g (0,00048 mols) de 2,4-dicloroanilina, 5 mL de EtOH e 4 gotas de ácido acético. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 96 horas, até sua finalização. Posteriormente, foi adicionado água destilada ao meio reacional para aumentar a formação de precipitado. O precipitado obtido foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 3).

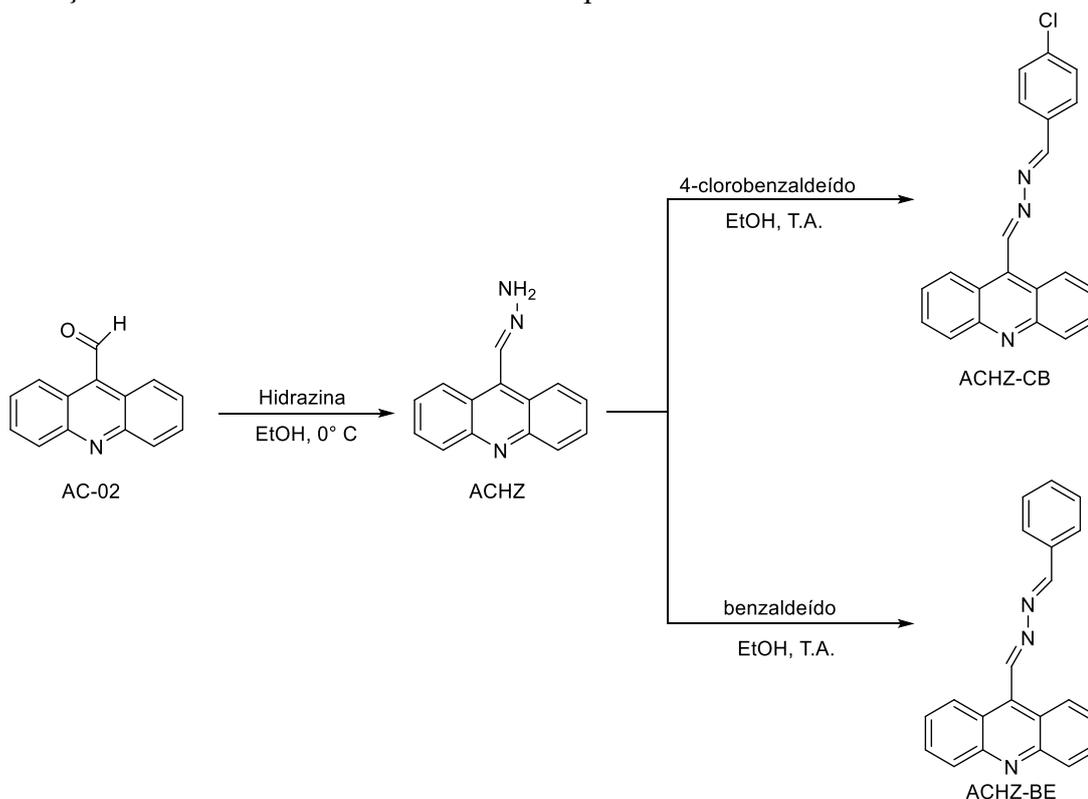
4.3.2.5 (E)-1-(acridin-9-il)-N-fenilmetanimina (MAC-08)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionado 0,1000 g (0,00048 mols) de AC-02, 0,044 mL (0,00048 mols) de anilina, 5 mL de EtOH e 4 gotas de ácido acético. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 16 horas, até sua finalização. Posteriormente, foi adicionado água destilada ao meio reacional para favorecer a precipitação dos cristais. O precipitado obtido foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e deixado para secar a temperatura ambiente (esquema 3).

4.3.3 Síntese da série diazenilacridina (ACHZ)

No esquema 4, está apresentado a metodologia geral de síntese para os derivados acridínicos da série diazenilacridina.

Esquema 4 - Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação do aldeído de acridina a hidrazina e posteriormente a diferentes aldeídos



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

4.3.3.1 Síntese do intermediário 9-diazenilacridina (ACHZ)

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 0,0500 g (0,00024 mols) de AC-02 em 4 mL de EtOH, a solução foi deixada em agitação e temperatura ambiente até completa solubilização do AC-02. Posteriormente ela foi mantida em um sistema a 0° C e agitação constante. Em recipiente a parte, 0,09 mL (0,00289 mols) de hidrazina foram dissolvidos em 1 mL de EtOH, essa solução foi então gotejada (1 gota por minuto) no meio reacional contendo AC-02 já solubilizado e nas condições descritas acima. A reação foi deixada em agitação constante e 0° C por 26 horas, até sua finalização.

Para obtenção dos precipitados, a reação foi rotoevaporada a temperatura ambiente até redução significativa do volume, logo após, foi adicionado água destilada ao balão contendo a reação, e o mesmo foi mantido dentro de um becker com gelo e dentro da geladeira por um período de 1 hora. Depois desse processo, foi realizada a filtração e os precipitados foram deixados para secar a temperatura ambiente (esquema 4).

4.3.3.2 Síntese de (E)-9-(fenildiazenil)acridina (ACHZ-BE)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 0,030 g (0,00013 mols) de ACHZ, 4 mL de EtOH e 0,013 mL (0,00013 mols) de benzaldeído. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 19 horas, até sua finalização. Para favorecer a precipitação foi adicionado água destilada ao meio. Os cristais foram filtrados e deixados para secar a temperatura ambiente (esquema 4).

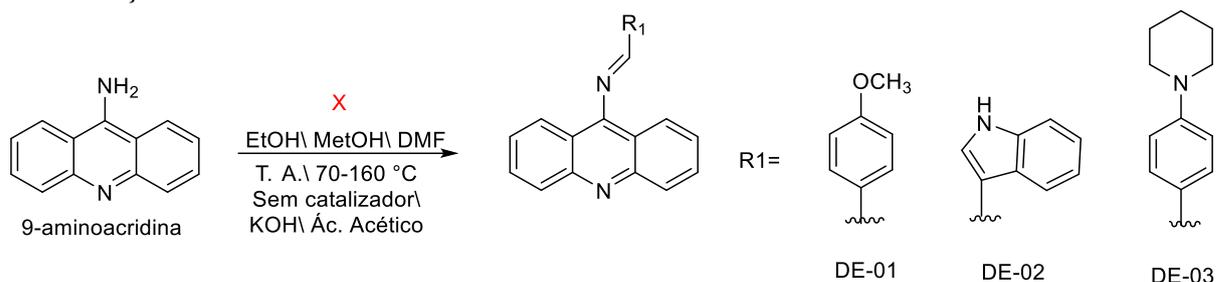
4.3.3.3 Síntese de (E)-9-((4-clorofenil)diazenil)acridina (ACHZ-CB)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 0,050 g (0,00022 mols) de ACHZ, 5 mL de EtOH e 0,0317 g (0,00022 mols) de 4-clorobenzaldeído. A reação foi deixada em agitação e temperatura ambiente por 23 horas, até sua finalização. Para favorecer a precipitação foi adicionado água destilada ao meio. Os cristais foram filtrados e deixados para secar a temperatura ambiente (esquema 4).

4.3.4 Síntese da série fenilmetanimina (DE)

No esquema 5, está apresentado a metodologia geral de síntese para os derivados acridínicos da série fenilmetanimina (DE)

Esquema 5 - Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação da 9-aminoacridina a diferentes aldeídos



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos diferentes derivados fenilmetanimina (DE), estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados fenilmetanimina (DE) partindo da 9- aminoacridina

Reagentes	Solvente	Catalisador	Temperatura	Duração
(E)-N-(acridin-9-il)-1-(4-metoxifenil)metanimina (DE-01)				
Anisaldeído	EtOH (10 mL)	Ác. acético (5 gotas)	75 °C	3 h e 30 m
(E)-N-(acridin-9-il)-1-(4-(piperidin-1-il)fenil)metanimina (DE-02)				
4-(1-piperidinil)- benzaldeído	EtOH (10 mL)	Ác. acético (5 gotas)	70 °C	96 h
4-(1-piperidinil)- benzaldeído	DMF (10 mL)	NaHCO ₃ (0,00051 mols)	70 °C	24 h
4-(1-piperidinil) benzaldeído	Metanol (5 mL)	KOH (0,00005 mols)	70 °C	24h
(E)-N-(acridin-9-il)-1-(1H-indol-3-il)metanimina (DE-03)				
indol-3-carboxaldeído	EtOH (10 mL) e depois 5 ml de propanol	Ácido acético (20 gotas)	75 °C	48h

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: ETOH: Etanol; DMF: Dimetilformamida; NaHCO₃: Bicarbonato de sódio; KOH: Hidróxido de potássio.

De modo geral, os diferentes aldeídos (0,00056 mols) foram adicionados em um balão de fundo redondo de 250 mL, juntamente com 5 mL de solvente e o catalizador, ficando sob agitação constante e aquecimento por período de 30 minutos. Em um becker de 25 mL, a 9-aminoacridina (0,00051 mols) foi previamente solubilizada em 5 mL de solvente utilizado para

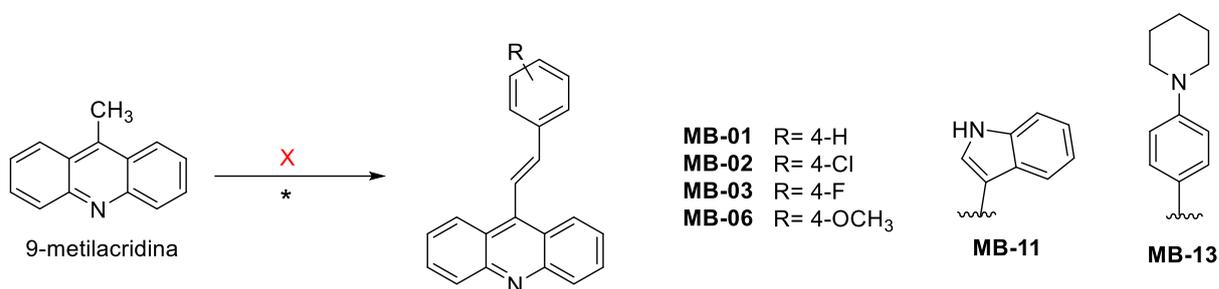
a respectiva reação e decorrido os 30 minutos citados anteriormente, a solução contendo a 9-aminoacridina foi adicionada ao balão de fundo redondo de 250 mL.

As reações foram acompanhadas por CCDA, sendo possível observar que não ocorreu a formação de novos produtos, procedendo então, com o descarte das reações listadas acima na tabela 2.

4.3.5 Síntese da série estirilacridina (MB)

No esquema 6, está apresentado a metodologia geral de síntese para os derivados acridínicos da série estirilacridina (MB)

Esquema 6 - Esquema reacional para obtenção dos derivados acridínicos através da condensação da 9-metilacridina a diferentes aldeídos



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: *As condições reacionais estão descritas na tabela 3 e tabela 4.

As condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos diferentes derivados estirilacridina (MB), estão descritas na tabela 3 e tabela 4.

Tabela 3 - Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados MB-01 e MB-02 partindo da 9-metilacridina

Reagentes	Solvente	Catalisador	Temperatura	Duração
(E)-9-estirilacridina (MB-01)				
Benzaldeído	ETOH (10 mL)	NaOH (0,5 eq)	T. A. e 62 °C	72 h
Benzaldeído	Propanol (13 mL)	Trietilamina (10 gotas)	80 e 110 °C	96 h
Benzaldeído	DMF (15 mL)	K ₂ CO ₃ (0,5 + 0,5 eq)	140 °C	72 h
(E)-9-(4-cloroestiril)acridina (MB-02)				
4- clorobenzaldeído	AC ₂ O (2 mL)	-	125 °C	24 h
4- clorobenzaldeído	AC ₂ O (3 mL)	-	T. A. e 120 °C	24 h
4- clorobenzaldeído	AC ₂ O (2mL) Dioxano (1 mL)	-	T. A. e 130 °C	24 h

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: ETOH: Etanol; DMF: Dimetilformamida; NaOH: hidróxido de sódio; K₂CO₃: Carbonato de potássio; AC₂O: Anidrido acético; T. A.: Temperatura ambiente.

Tabela 4 - Condições reacionais utilizadas para possível obtenção dos derivados MB-03, MB-06, MB-11 e MB-13 partindo da 9-metilacridina

Reagentes	Solvente	Catalisador	Temperatura	Duração
(E)-9-(4-fluoroestiril)acridina (MB-03)				
4- fluorbenzaldeído	DMF (10 mL)	K ₂ CO ₃ (0,00051 mols)	150 °C	24 h
4- fluorbenzaldeído	AC ₂ O (2 mL) Ác. Acético (2 ml)	-	75 °C e 100 °C	24 h
4- fluorbenzaldeído	AC ₂ O (4 mL)	-	T. A., 75 °C e 130 °C	96 h
(E)-9-(4-metoxiestiril)acridina (MB-06)				
Anizaldeído	DMF (15 mL)	K ₂ CO ₃ (0,00025)	160 °C	24 h
Anizaldeído	DMF (10 mL)	K ₂ CO ₃ (0,00051 mols)	160 °C	24 h
Anizaldeído	EtOH (5 mL)	NaOH (Solução aquosa a 20 %)	T. A.	24 h
Anizaldeído	Dioxano (5 mL)	NaOH (0,00051 mols)	160 °C	120 h
Anizaldeído	AC ₂ O (5 mL)	-	125 °C	24 h
(E)-9-(2-(1H-indol-3-il)vinil)acridina (MB-11)				
4-(1-piperidini)- benzaldeído	DMF (15 mL)	K ₂ CO ₃ (0,00051 mols)	160 °C	24 h
(E)-9-(4-(piperidin-1-il)estiril)acridina (MB-13)				
4-(1-piperidini)- benzaldeído	DMF (15 mL)	K ₂ CO ₃ (0,00025)	160 °C	24 h

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: EtOH: Etanol; DMF: Dimetilformamida; NaOH: hidróxido de sódio; K₂CO₃: Carbonato de potássio; AC₂O: Anidrido acético; T. A.: Temperatura ambiente.

De modo geral, em um balão de fundo redondo de 250 mL foi adicionado a 9-metilacridina (0,00051 mols), o solvente e o catalizador, quando utilizado. A mistura ficou em

agitação e temperatura constante por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado ao meio reacional o aldeído respectivo para cada reação química.

As reações foram acompanhadas por CCDA e a finalização ocorreu primordialmente por rotoevaporação do solvente, seguido de adição de água destilada ao meio reacional. Para todas as reações, a formação de produto desejado\majoritário foi incerta, com aparente formação de muitos subprodutos.

4.3.6 Metodologia de purificação para os compostos sintetizados

A purificação foi realizada para os derivados acridínicos obtidos, com exceção de MAC-02, MAC-03, MAC-07 e ACHZ e se deu da seguinte forma: Inicialmente cerca de 100 mg dos derivados foram adicionados a cerca de 20 ml de uma solução aquosa á 10 ou 20% de etanol, em seguida, a solução era aquecida até 100 °C e filtrada. Com o aquecimento os produtos se tornavam solúveis no meio, desse modo o resíduo retido no papel filtro era impureza e o produto puro precipitava novamente na solução mãe, após a mesma voltar a temperatura ambiente.

4.4 Caracterizações físico-químicas dos compostos sintetizados

As moléculas sintetizadas foram avaliadas quanto à aparência, solubilidade aparente, faixa de fusão (F.F.), rendimento (%), peso molecular (P.M.), coeficiente de partição (log P), fator de retenção (RF) e caracterização térmica.

4.4.1 Aparência

A avaliação da aparência dos compostos sintetizados foi realizada de forma macroscópica dando-se enfoque a cor e textura apresentada pelas moléculas.

4.4.2 Solubilidade aparente

Realizou-se a avaliação da solubilidade aparente para as moléculas sintetizadas frente a solventes orgânicos, em especial: clorofórmio (Dinâmica), acetato de etila (Química Moderna), metanol (REATEC), acetonitrila (Êxodo) e dimetilsulfóxido (Dinâmica).

4.4.3 Faixa de fusão

As faixas de fusão das moléculas sintetizadas foram estabelecidas por meio da utilização de uma pequena amostra do produto, em um capilar, analisadas através do aparelho Quimis® Modelo Q-340M.

4.4.4 Rendimento da reação

Realizou-se o cálculo do rendimento da reação por intermédio da pesagem dos compostos em uma balança analítica, obtendo-se o valor em gramas, com seguinte conversão do valor para número de mols. A partir desse, realizou-se a relação entre o número de mols do produto em relação ao número de mols do reagente de partida, dando-se o resultado em porcentagem. Seguem as fórmulas utilizadas:

$$(1) \text{ Número de mols do produto} = \frac{m \text{ produto}}{MM \text{ produto}}$$

$$(2) \frac{\text{número de mols do produto obtido}}{\text{número de mols do reagente de partida}} \times 100 = \text{rendimento (\%)}$$

4.4.5 Coeficiente de partição

Calculou-se o coeficiente de partição teórico pelo programa Marvin, por meio do desenho das respectivas moléculas.

4.4.6 Fator de retenção

A mensuração do fator de retenção dos compostos sintetizados foi realizada por intermédio de CCDA em placas FLUKA Analytical Sílica Gel com espessura de 0,2mm, a partir da comparação das medidas obtidas para os compostos com o sistema eluente predeterminado. As revelações foram realizadas por meio de câmara de emissão de radiação ultravioleta, Boitton®, em comprimentos de onda ultravioleta 254 e 365 nm.

4.4.7 Caracterização térmica

4.4.7.1 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico modelo Pyris1 TGA (Perkin Elmer®, Boston, Massachusetts, EUA). Foram utilizadas amostras de $5,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinhos de alumina para cada amostra, utilizando uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $900 \text{ }^\circ\text{C}$, sob uma atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min^{-1} . Utilizou-se a derivada da curva termogravimétrica para auxiliar na interpretação do número de etapas. A presente análise foi realizada em parceria com o Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.5 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

Realizou-se a caracterização estrutural para os compostos sintetizados através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C).

4.5.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em equipamento Brüker®, modelo Avance DRX 600 e 400 MHz – UltraShield®, como solvente deuterado foi utilizado DMSO-*d*₆ (Sigma-Aldrich®). Os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm), onde foi empregado tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As constantes de acoplamento (*J*) inerentes aos sinais de RMN de ^1H foram computadas em Hertz (Hz). Os espectros foram plotados e interpretados através do software Mestre Nova 12.0. As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t), multiplete (m) e duplo-duplo duplete (ddd). A avaliação foi realizada em parceria com o Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.6 Estudos Biológicos

4.6.1 Espectroscopia de absorção UV-vis com DNA

As titulações dos espectros UV-Vis foram realizadas usando tampão Tris 0,01 M, pH 7,6. DNA de esperma de salmão (ssDNA) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) e usado sem purificações adicionais. A solução de ssDNA em tampão Tris foi sonicada por 5 min e a concentração de DNA foi determinado usando o coeficiente de extinção molar $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 260 nm. A pureza do DNA foi determinada monitorando o valor da relação A260/A280. A concentração de DNA foi expressa como equivalentes micromolares dos pares de bases. Derivados acridínicos foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 1 mM (solução estoque) a partir da qual as soluções de trabalho das concentrações de 20 μM foram preparados por diluição usando tampão Tris. Após a concentração dos compostos serem otimizadas, a titulação do ssDNA foi realizada com concentrações constantes dos derivados acridínicos. Todas as medições foram realizadas a 25 °C em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de caminho de 1 cm. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida ajustando os dados à equação (1) (McGhee; Von Hippel, 1974):

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (1)$$

Onde ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes aparentes, ligados ao DNA e de extinção livre de compostos, respectivamente. ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são todos calculados a partir da lei de Lambert-Beer ($\epsilon = A/[\text{composto}]$). Os gráficos da $[\text{Composto}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{Composto}]$ e $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ foram utilizados para obtenção dos valores K_b s a partir da razão entre a inclinação e o intercepto, utilizando o software SigmaPlot 10.0. A avaliação foi realizada em parceria com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Pernambuco (UPE).

4.6.2 Espectroscopia de absorção UV-vis com a HSA

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1mM (solução estoque). As soluções-teste foram preparadas em duplicata, fixando-se a concentração da HSA em 10 μM e variando-se a concentração dos derivados nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 20 μM . A mistura dos compostos-teste com a HSA foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização e, posteriormente, submetidas a análise absortiva em UV-vis. Os espectros de absorbância foram registrados por varredura na faixa de comprimento de onda entre 200-600nm. As amostras foram analisadas no espectrofotômetro de UV-vis Thermo Scientific™ 51119200, em placa de 96 poços.

A partir dos dados espectroscópicos foram calculados os valores relativos às constantes de ligação, revelando uma maior ou menor afinidade da biomolécula pelo composto-teste. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida por meio da equação de McGhee e Von Hippel (1974):

$$\frac{[\text{Derivado}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)}{(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)} = \frac{[\text{Derivado}] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) [\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f) [\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Onde, ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da $[\text{Composto}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{Composto}]$ e $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ foram utilizados para obtenção dos valores K_b s a partir da razão entre a inclinação e o intercepto, utilizando o software SigmaPlot 10.0. As alterações no pico máximo absorptivo ($\lambda_{\text{máx}}$) dos espectros gerados da HSA livre e ligada aos compostos foram também analisadas. Os percentuais relativos ao efeito hipercrômicos observados foram calculados a partir de uma relação entre os valores dos picos máximos absorptivos da HSA livre e ligada aos compostos obtida em função da maior concentração utilizada no experimento. A avaliação foi realizada em parceria com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Pernambuco (UPE).

4.6.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade de compostos frente a linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma mamário (MCF-7), melanoma (SK-MEL-28) e carcinoma cervical (HeLa). O método do MTT consiste na avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora de enzimas mitocondriais (Mosmann, 1983).

O MTT é um corante amarelo solúvel em água e a atividade de desidrogenases, principalmente succinato desidrogenase, de células viáveis converte o composto pela clivagem do anel tetrazólico à cristais insolúveis de formazan de cor azul-púrpura que precipitam no citosol celular (Mosmann, 1983). A lise permite a liberação do sal que, quando solubilizado, pode ser quantificado por espectrofotometria. Para o ensaio do MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 3×10^5 células/mL e tratadas 24 horas após o plaqueamento. Após os tratamentos as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 , à 37 °C por 72 horas.

Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado uma solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 4 horas adicionais, então 100 µL de 10% de uma solução de dodecil sulfato de sódio e ácido clorídrico (SDS-HCl) foram adicionados e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

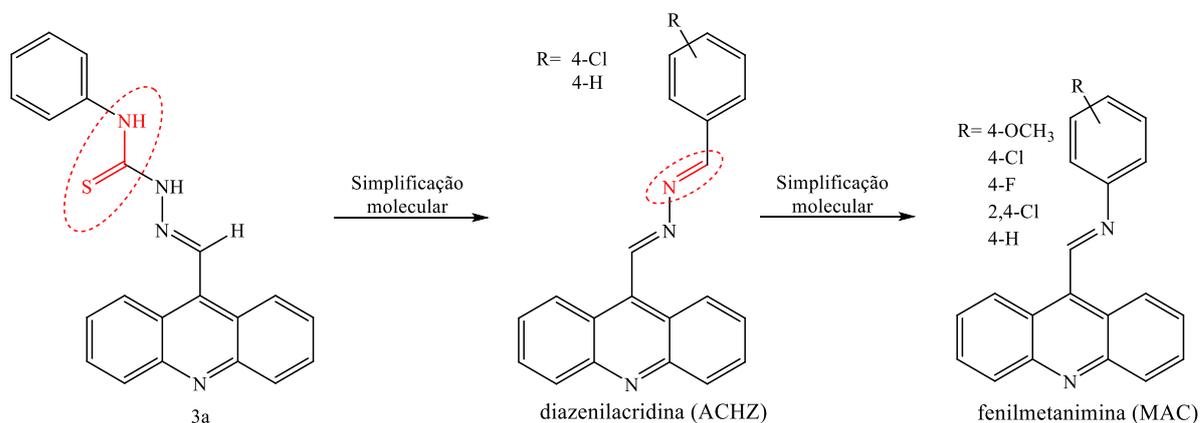
Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os dados estão expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm E.P.M (erro padrão da média) e foram comparados por análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,01$. A avaliação foi realizada em parceria com o Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Docking molecular

Para triagem inicial da provável atividade anticâncer das moléculas projetadas e avaliação das estratégias aplicadas no desenvolvimento das mesmas (esquema 7), o *docking* molecular foi realizado com alvos farmacológicos para o câncer. Para tal, se utilizou as estruturas cristalográficas da topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK) e o DNA (PDB ID: 1BNA; 1G3X).

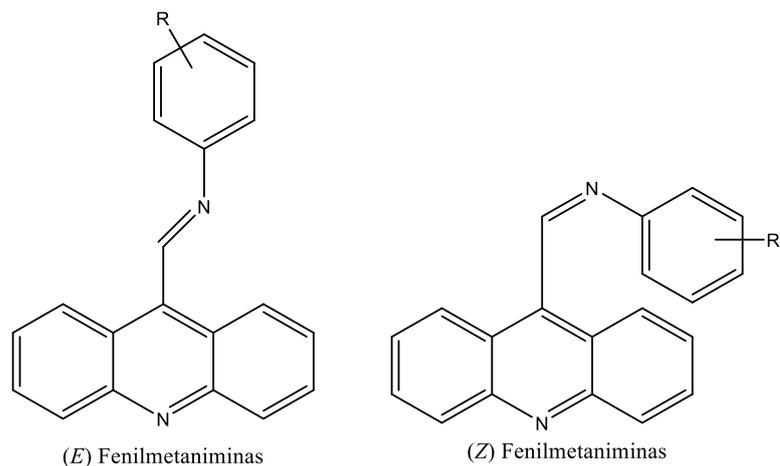
Esquema 7 - Novas moléculas projetadas por simplificação molecular



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Foi observado que as moléculas da série fenilmetanimina (MAC) poderiam ocorrer na forma de seus isômeros (*E*) e (*Z*), conforme figura 11, porém, sendo o isômero (*E*) energeticamente mais favorecido, este seria o mais provável de obtenção sintética. Então, o *docking* molecular foi realizado inicialmente apenas para os isômeros (*E*) das moléculas da série MAC.

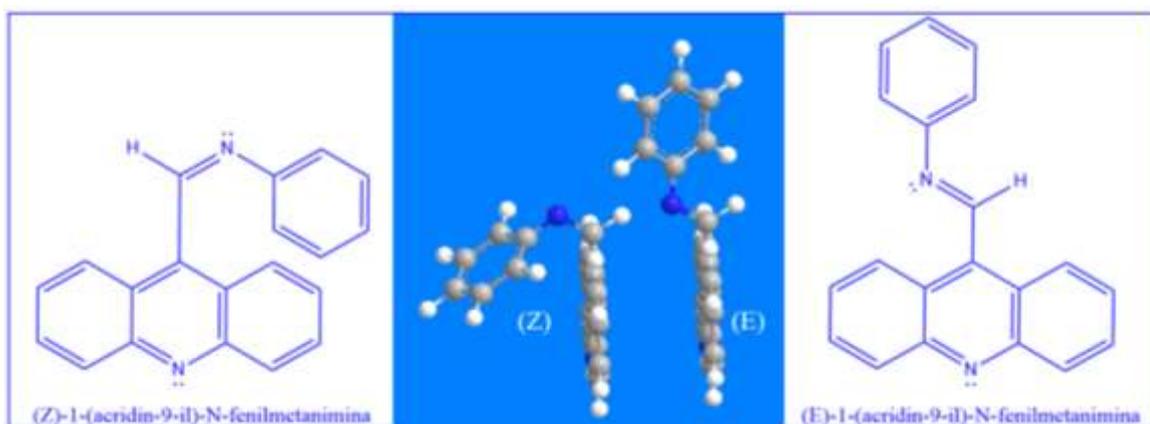
Figura 11-Isômeros (E) e (Z) das moléculas da série fenilmetanimina (MAC)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

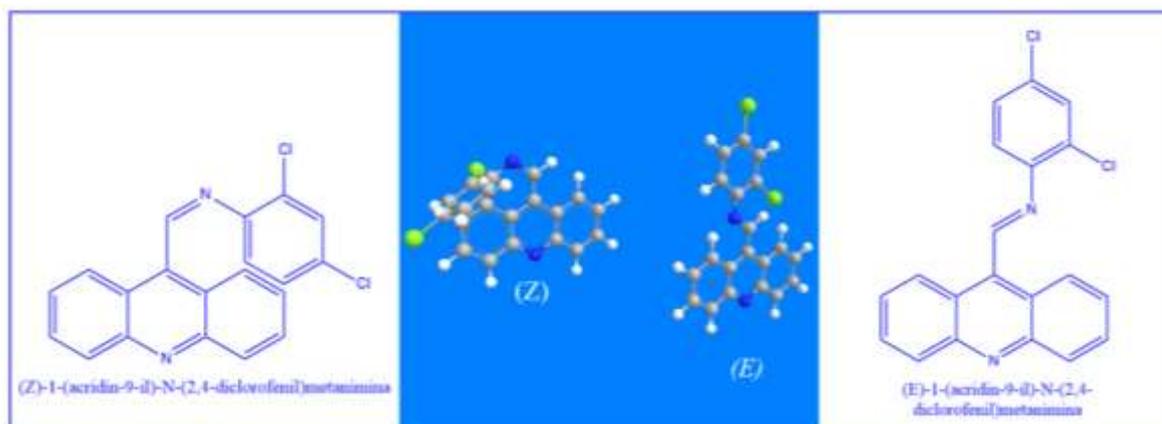
Entretanto, após caracterização estrutural por meio de RMN de ^1H e ^{13}C , discutido posteriormente na subseção 5.5, foi observado que as moléculas MAC-08 e MAC-07 foram obtidas como uma mistura de seus diastereoisômeros (E) e (Z) e por isso foi acrescentado aos dados iniciais de *docking* molecular os resultados referentes aos *dockings* dos isômeros (Z) das referidas moléculas. Na figura 12, é possível observar a isômeros (E) e (Z) das moléculas MAC-08 e na figura 13, os isômeros (E) e (Z) das moléculas MAC-07.

Figura 12 - Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-08



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 13 - Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-07



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.1.1 Docking molecular realizado com o alvo topoisomerase II α complexada com DNA

Tendo em vista que a molécula 3a, utilizada como protótipo para o desenvolvimento das séries obtidas neste trabalho, demonstrou inibição *in silico* e *in vitro* da topoisomerase II α , escolheu-se a estrutura cristalográfica da topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK) para avaliação inicial de possível mecanismo de ação antitumoral para as moléculas propostas. As figuras apresentadas a seguir correspondem a representação em 2D das moléculas com o alvo, para melhor visualização do posicionamento dos isômeros (Z) no alvo é necessário observar as figuras com representação em 3D que estão contidas nos anexos deste trabalho.

Como ligantes de referência foram utilizados os fármacos etoposídeo (ligante co-cristalizado), amsacrina e a molécula 3a. Para validação do método utilizado, foi realizado o *redocking* com o ligante co-cristalizado etoposídeo, conforme visualizado na figura 14. Esse procedimento permite obter, a partir da realização do *docking* entre o ligante co-cristalizado e o bioreceptor em questão, a preservação da orientação espacial do ligante. O valor do RMSD de referência, utilizado como parâmetro para validação, foi de 0.8 Å, sendo 2.0 Å o valor máximo desejável, como descrito na metodologia.

Figura 14 - Redocking com ligante co-cristalizado etoposídeo

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Após a validação do método, foi realizado o *docking* para as novas moléculas planejadas, cujos resultados estão expostos na tabela 5. A Energia Livre de Ligação (ΔG), e a Constante de Inibição Estimada (Ki), foram os parâmetros utilizados para avaliar a afinidade entre os compostos projetados e seu alvo. Ambos parâmetros fornecem valores inversamente proporcionais à afinidade, de modo que, quanto menor o resultado em kcal mol⁻¹ (ΔG) e nM (Ki), mais favorecida e mais estável é a interação entre o ligante e o alvo.

Tabela 5 - Resultados do *docking* molecular frente ao alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)

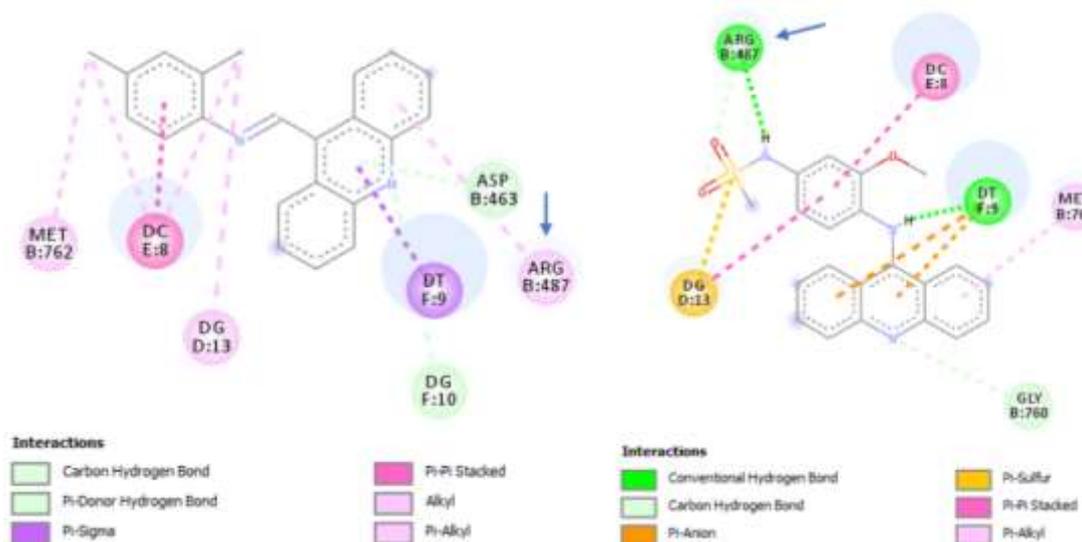
MOLÉCULA	Energia Livre de Ligação (ΔG) (kcal mol ⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
Etoposídeo	-11.22	5.97
Amsacrina	- 9.85	60.03
3 a	-8.72	407.39
MAC-01	-8.59	504.82
MAC-02	-8.49	596.59
MAC-03	-7.93	1570.0
MAC-07 (E)	-8.98	261.72
MAC-07 (Z)	-9.37	6880.00
MAC-08 (E)	-8.09	1.170
MAC-08 (Z)	-8.37	727.72
ACHZ	-7.6	2700.00
ACHZ-BE	-8.59	503.94
ACHZ-CB	-9.05	231.46

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Dentre os compostos analisados, MAC-07 (Z) apresentou melhor resultado frente a enzima topoisomerase II α , com valores de (ΔG) de $-9.37 \text{ kcal mol}^{-1}$ e (K_i) de 6880.00 nM , respectivamente. O mesmo, foi comparável ao resultado observado para a amsarina ($\Delta G= -9.85 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i= 60.03$) e melhor que o apresentado para a molécula 3a ($\Delta G= -8.72 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i= 407.39 \text{ nM}$), demonstrando êxito na estratégia de planejamento aplicada a MAC-07.

A amsacrina (*m*-AMSA) é um conhecido veneno de topoisomerase II α e intercalador de DNA, deste modo, resultados semelhantes aos seus são indicativos de um provável mecanismo de ação anticâncer. Na figura 15 é possível destacar as interações da molécula MAC-07 (Z) (A) e de *m*-AMSA (B) com o alvo. Interações em comum são observadas com o aminoácido arginina 487 (Arg B:487), metionina 762 (Met B:762) e os pares de bases nitrogenadas timina-9 (DT F:9), citosina-8 (DC C:8) e guanosina-13 (DG D:13). Outras interações são visualizadas entre MAC-07 (Z) e o ácido aspártico (ASP B:463) e a base nitrogenada guanosina-10 (DG F:10). Já a *m*-AMSA interagiu adicionalmente com glicina-760 (GLY B:760). Segundo Gomes *et al.* (2022), Arg 487 é um aminoácido essencial para interação com o alvo topo II α .

Figura 15 - Docking molecular da molécula MAC-07 (Z) (A) e de *m*-AMSA (B) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



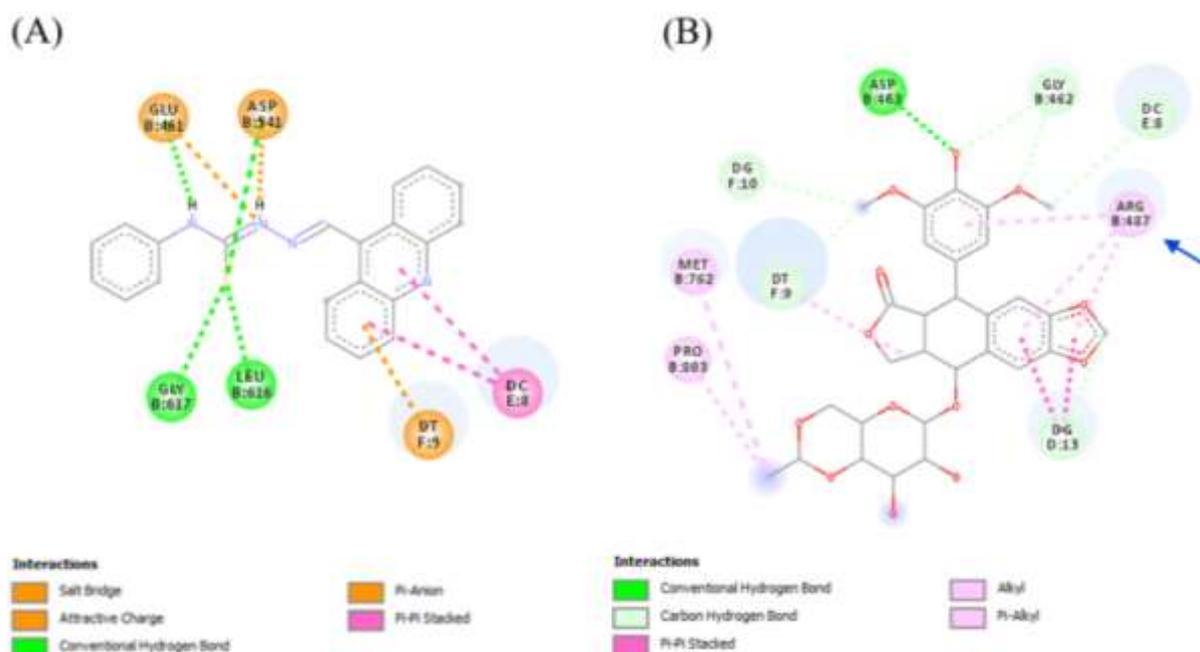
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

É também possível observar que, a molécula MAC-07 (Z) realiza menor número de interações com o alvo quando comparada a amsacrina, podendo justificar sua menor energia livre de ligação (ΔG). Suas interações com o alvo se dão especialmente por interações do tipo π , realizadas entre os anéis aromáticos do núcleo acridínico e fenil e os átomos de cloro com o

alvo. Esse tipo de interação é característico de compostos intercaladores de DNA, capazes de estabilizar o complexo ligante-DNA se interpondo na estrutura coplanar das bases nitrogenadas (Albino, 2020).

A figura 16 mostra o resultado do *docking* molecular da molécula 3a (A) e do etoposídeo (B), sendo possível notar que o mesmo apresentou maior número de interações com maior variabilidade de aminoácidos e bases nitrogenadas do sítio ativo que a molécula 3a e que os compostos MAC-07 e amsacrina, discutidos anteriormente. Isso poderia justificar o melhor resultado do etoposídeo frente ao alvo Topo II α . Também é importante destacar que o mesmo é capaz de estabilizar os complexos covalentes Topo II-DNA de forma mais eficiente do que os inibidores Topo II intercaladores de DNA, como *m*-AMSA (Bailly, 2023). E, justamente por ser um intercalador de baixa potência, suas interações com o alvo se deram principalmente por ponte de hidrogênio e não por empilhamento π - π , como observado anteriormente para os compostos MAC-07 e *m*-amsa.

Figura 16 - *Docking* molecular da molécula 3a (A) e etoposídeo (B) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



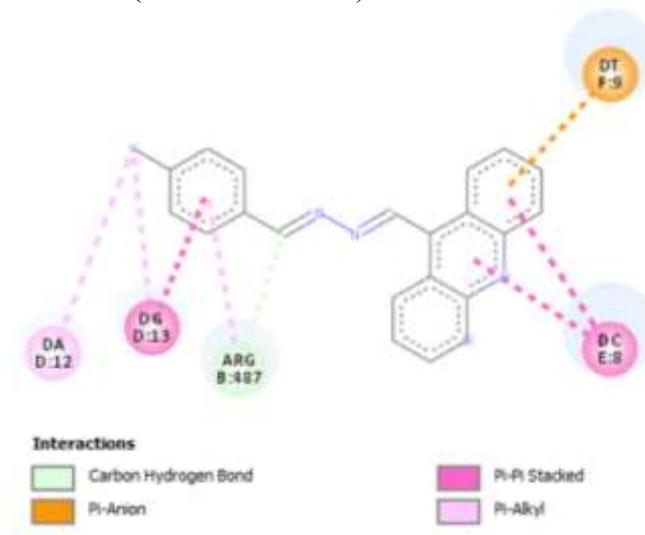
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A molécula 3a apesar de apresentar maior número de interações com o alvo, apresenta menor número de interações do tipo π quando comparada a MAC-07, bem como não realiza interação com o aminoácido Arg 487, como observado para os compostos MAC-07, amsacrina

e etoposídeo, podendo justificar sua menor energia livre de ligação (ΔG) quando comparada aos mesmos.

A molécula ACHZ-CB, cujo *docking* pode ser observado na figura 17, também apresentou melhor resultado que a molécula 3a, tanto ela quanto MAC-07 (Z) contêm em suas estruturas átomos de cloro que interagem com o alvo por meio de interações π -alquil com a base nitrogenada guanosina-13 (DG D:13), não observados nas interações de 3a. ACHZ-CB também realizou interações com o resíduo de aminoácido Arg 487 e as bases nitrogenadas citosina-8 (DC E:08) e timidina-9 (DT F:09) e adenosina-12 (DA D:012). Desse modo, se observa que a remoção da porção tioamida para as moléculas MAC-07 (Z) e ACHZ-CB melhorou a interação com o alvo topoisomerase II α , uma vez que, as mesmas realizaram interações com importante aminoácidos e bases nitrogenadas no sítio ativo do alvo em questão não observadas para seu protótipo 3a.

Figura 17 - *Docking* molecular da molécula ACHZ-CB no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Apesar das moléculas obtidas apresentarem inibição da enzima Topo II inferior aos fármacos de referência amsacrina e etoposídeo, a maioria dos compostos apresentaram inibição enzimática comparável ao seu protótipo 3a, que demonstra inibição para topo II em estudos *in silico* e *in vitro*. Já as moléculas cloradas ACHZ-CB e os diastereoisomêros (E) e (Z) da molécula MAC-07, apresentaram resultado superiores a 3a. Desse modo, é possível inferir que a simplificação molecular realizada para a série MAC não diminui sua atividade frente ao alvo

Topo II α quando comparada a série ACHZ, sendo a presença do átomo de cloro fator fundamental para melhor interação com o alvo para ambas as séries.

Apesar dos métodos *in silico* não refletirem com acurácia as condições intrínsecas e extrínsecas envolvidas na interação entre um ligante e seu biorreceptor, ele é um indicativo da potencialidade da molécula frente a determinado alvo (Albino, 2020). De tal modo, os resultados obtidos podem ser indicativos de um possível mecanismo de ação anticâncer, que precisa ser validado por meio de estudos *in vitro*.

5.1.2 Docking molecular realizado com o alvo DNA

Para analisar a interação dos compostos com o DNA isolado, o *docking* molecular foi realizado utilizando-se duas estruturas cristalizadas de DNA distintas: a estrutura do B-DNA dodecâmero (PDB ID: 1BNA), utilizada para avaliação do perfil de interação das moléculas aos sulcos do DNA; e a estrutura o DNA dodecâmero intercalada com aldeído de acridina (PDB ID: 1G3X), utilizado como modelo de avaliação de perfil intercalador de DNA.

Os resultados obtidos pelo *docking* das moléculas propostas com estrutura de DNA modelo para interação aos sulcos maior e menor (PDB ID: 1BNA) seguem na tabela 6. O alvo em questão não apresenta um ligante co-cristalizado e por isso não foi realizado o *redocking* para validação desse método, entretanto a amsacrina foi utilizada como composto controle. Para esse, utilizaram-se como parâmetros de avaliação os mesmos usados anteriormente na avaliação dos resultados do *docking* com topoisomerase II α /DNA.

Tabela 6 - Resultados do *docking* molecular frente ao alvo DNA (PDB ID: 1BNA)

MOLÉCULA	Energia Livre de Ligação (ΔG) (kcal mol ⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
Amsacrina	-10.36	25.52
3 a	-9.45	118.06
MAC-01	-9.76	70.56
MAC-02	-10.06	41.96
MAC-03	-8.78	368.19
MAC-07 (E)	-10.51	19.58
MAC-07 (Z)	-8.62	480.0
MAC-08 (E)	-9.25	165.04
MAC-08 (Z)	-8.31	806.31
ACHZ	-8.02	1320.00
ACHZ-BE	-10.08	40.85
ACHZ-CB	-9.94	51.56

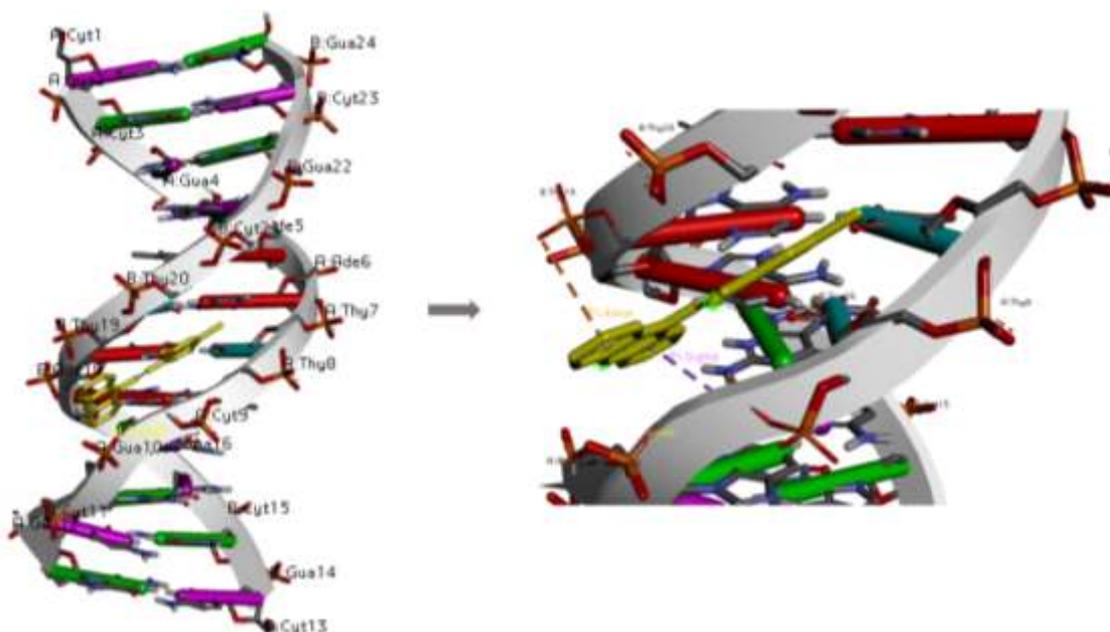
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

De modo geral, as moléculas obtidas para a série MAC e ACHZ apresentaram energia livre de ligação (ΔG) semelhantes entre si e semelhantes ou próximas da obtida para a amsacrina. Algumas delas, apresentaram energia livre de ligação e constante de inibição melhores que as observadas para a molécula 3a (MAC-01, MAC-02, MAC-07, ACHZ-BE e ACHZ-CB), que demonstrou forte interação com ctDNA em estudos *in vitro* no trabalho de Almeida *et al.* (2015), demonstrando assim o potencial de tais moléculas interagirem com o DNA. Essa característica pode ser atribuída às moléculas devido as mesmas apresentarem estrutura química relativamente grande e com regiões flexíveis, podendo então se adaptar a curvatura do DNA e, neste caso, a remoção da porção tioamida não parece afetar a interação com o alvo DNA (PDB ID: 1BNA) por meio de interações com os sulcos.

A molécula diclorada MAC-07 (E) demonstrou melhor resultado frente ao alvo DNA (PDB ID: 1BNA) com valores de (ΔG) de -10.51 kcal mol⁻¹ e (Ki) de 19.58 nM. Esse resultado foi melhor que o observado para a amsarina (ΔG = -10.36 kcal mol⁻¹ e Ki= 25.52 nM) e para a molécula 3a (ΔG = -9.45 kcal mol⁻¹ e Ki= 118.06 nM). Ela também apresentou melhor resultado que a molécula monoclorada MAC-02 (ΔG = -10.06 kcal mol⁻¹ e Ki= 41.96 nM) pertencente a mesma série (fenilmetanimina), indicando que a inserção de mais um átomo de cloro no anel

fenil foi importante para interação com o alvo. Na figura 18, é possível visualizar as interações de MAC-07 (*E*) com o sulco maior do DNA, onde sua porção acridínica interage com o alvo por meio de ligações π -ânion com o resíduo de aminoácido Try19 e π -sigma com o resíduo de citosina-9 (DC-9).

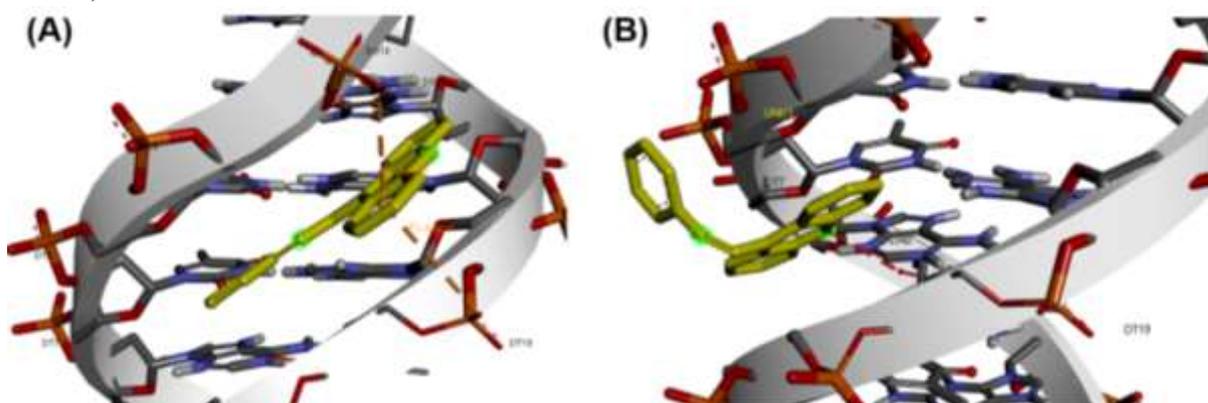
Figura 18 - Interação entre a molécula MAC-07 (*E*) e o alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Também foi possível observar que o isômero (*E*) quando comparado com o isômero (*Z*) da molécula MAC-08, apresentou melhor energia livre de ligação ΔG com valores de -9.25 e -8.31, respectivamente. Isso pode ser justificado devido ao fato de que a MAC-08 (*E*) apresenta uma estrutura menos curvada que a MAC-08 (*Z*), facilitando sua adaptação aos sulcos do DNA (figura 19), reafirmando que, provavelmente a atividade intercalativa esteja mais associada ao tamanho da molécula do que necessariamente os grupos funcionais presentes nas mesmas.

Figura 19 - Interações dos isômeros MAC-08 (*E*) (A) MAC-08 (*Z*) (B) com o DNA (PDB ID: 1BNA)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Para avaliar o perfil intercalador das moléculas projetadas, as mesmas foram avaliadas frente ao alvo de DNA para intercalação (PDB ID: 1G3X), cujos resultados estão expostos tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do *docking* molecular frente ao alvo DNA (PDB ID: 1G3X)

MOLÉCULA	Energia Livre de Ligação (ΔG) (kcal mol ⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
Amsacrina	- 6.25	26160.0
3 a	-5.59	79830.0
MAC-01	-7.94	1520.0
MAC-02	-8.21	956.56
MAC-03	-7.48	3280.0
MAC-07 (<i>E</i>)	-8.49	594.15
MAC-07 (<i>Z</i>)	-5.5	93700.00
MAC-08 (<i>E</i>)	-7.96	1.460
MAC-08 (<i>Z</i>)	-6.31	23640.00
ACHZ	-6.56	15550.0
ACHZ-BE	-7,4	3770.0
ACHZ-CB	-7.7	2030.0

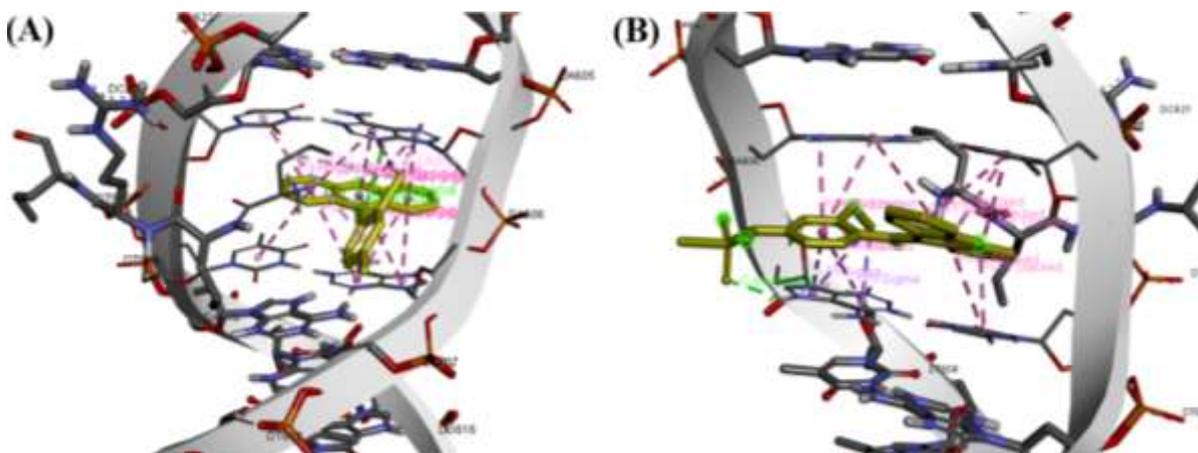
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Como demonstrado na tabela 7, todas as moléculas, com exceção de MAC-07 (Z), demonstraram potencial intercalação do DNA, com resultados superiores à amsacrina e ao protótipo 3a, demonstrando que a remoção da porção tioamida não acarretou perda na atividade, mas sim, os derivados obtidos apresentaram melhor perfil de intercalação do DNA. A maior parte das moléculas pertencentes à série MAC, demonstrou melhor interação com o alvo DNA (PDB ID:1G3X) que as da série ACHZ e também melhor que o protótipo 3a, demonstrando que as simplificações estruturais foram vantajosas para o alvo em questão.

Novamente, a molécula MAC-07 (E) demonstrou melhor resultado frente ao alvo DNA (PDB ID: 1G3X) com valores de (ΔG) de $-8.34 \text{ kcal mol}^{-1}$ e (K_i) de 594.15 nM , resultado melhor que o observado para a amsacrina ($\Delta G= -6.25 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i= 26160.0 \text{ nM}$) e para a molécula 3a ($\Delta G= -5.59 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i= 79830.0 \text{ nM}$).

Conforme demonstrado na figura 20, a molécula MAC-07 (E) foi capaz de interagir com o alvo por meio de oito interações do tipo empilhamento π - π com os resíduos timidina-619 (DT L:619), timidina-620 (DT L:620), adenosina-605 (DA K:605) e adenosina-606 (DA K:606). Ela também foi capaz de interagir com o alvo por meio de ligações de hidrogênio e alquil com o resíduo de aminoácido arginina-701 (ARG M:701) e por ligações de hidrogênio e π -alquil com adenosina-606 (DA K:606). A amsacrina também apresenta oito interações do tipo empilhamento π - π com os resíduos timidina-619 (DT L:619), timidina-620 (DT L:620), adenosina-605 (DA K:605) e adenosina-606 (DA K:606), entretanto, apresenta apenas uma interação por ligação de hidrogênio e outra π -sigma com o resíduo adenosina-606 (DA K:606) (figura 20).

Figura 20 - Interações da molécula MAC-07(E) (A) e da amsacrina (B) com o DNA (PDB ID: 1G3X)

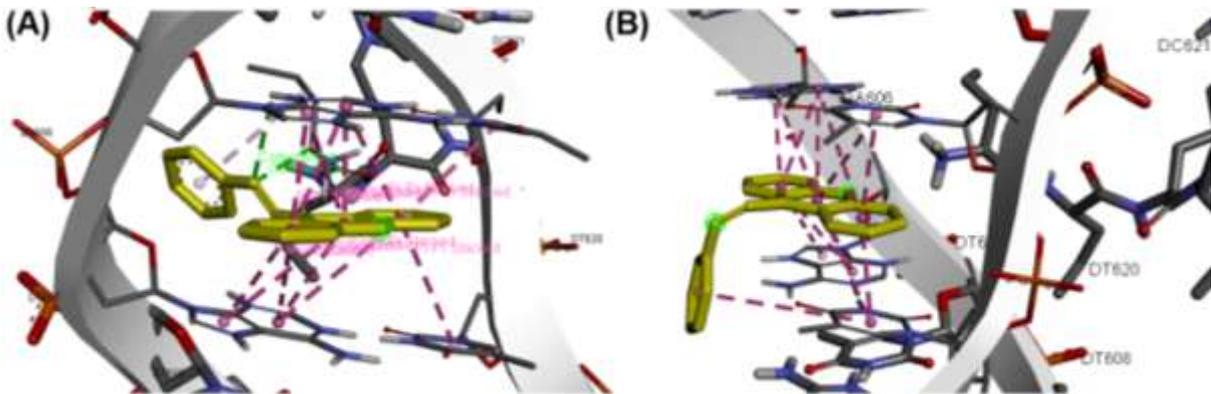


Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

O maior número de interações de MAC-07 (*E*) com o alvo pode justificar o melhor resultado obtido para o *docking* molecular realizado para o DNA (PDB ID: 1G3X), quando comparada a amsacrina. Assim como discutido anteriormente, as interações do tipo empilhamento π - π demonstram ser fundamentais para o perfil intercalador de DNA, o núcleo acridínico e os anéis fenil presentes nas moléculas projetadas foram fundamentais para interagir com o alvo por meio deste tipo de interação.

É interessante citar que, diferente do observado para o alvo preditivo para ligação aos sulcos DNA (PDB ID: 1BNA), no alvo preditivo para intercalação, o melhor resultado foi observado para o isômero (*Z*) e não o isômero (*E*) da molécula MAC-08, apresentando energia livre de ligação (ΔG) com valores de -7.96 e -6.31, respectivamente. Isso pode ser justificado, porque a estrutura mais curvada da MAC-08 (*E*) propicia melhor intercalação ao DNA, especialmente por interações do tipo π (figura 21).

Figura 21 - Interações dos isômeros MAC-08 (*E*) (A) MAC-08 (*Z*) (B) com o DNA (PDB ID: 1G3X)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

De modo geral, as novas moléculas projetadas demonstraram perfil de interação com o DNA tanto por ligação aos sulcos como por intercalação, podendo ser justificado pelo fato das mesmas apresentarem em sua estrutura química o núcleo acridínico que é mais planar e permite melhor perfil intercalador, bem como uma região mais flexível que permite que as mesmas se moldem aos sulcos do DNA.

Quando analisado os resultados obtidos no *docking* para todos os alvos estudados, se observou que os derivados MAC-07 (*Z*) e MAC-07 (*E*) apresentaram melhores resultados frente aos alvos Topoisomerase II α e DNA (PDB ID: 1BNA e 1G3X), respectivamente. Tanto MAC-07 como ACHZ-CB apresentam boa interação com os alvos estudados, ambos contêm em sua

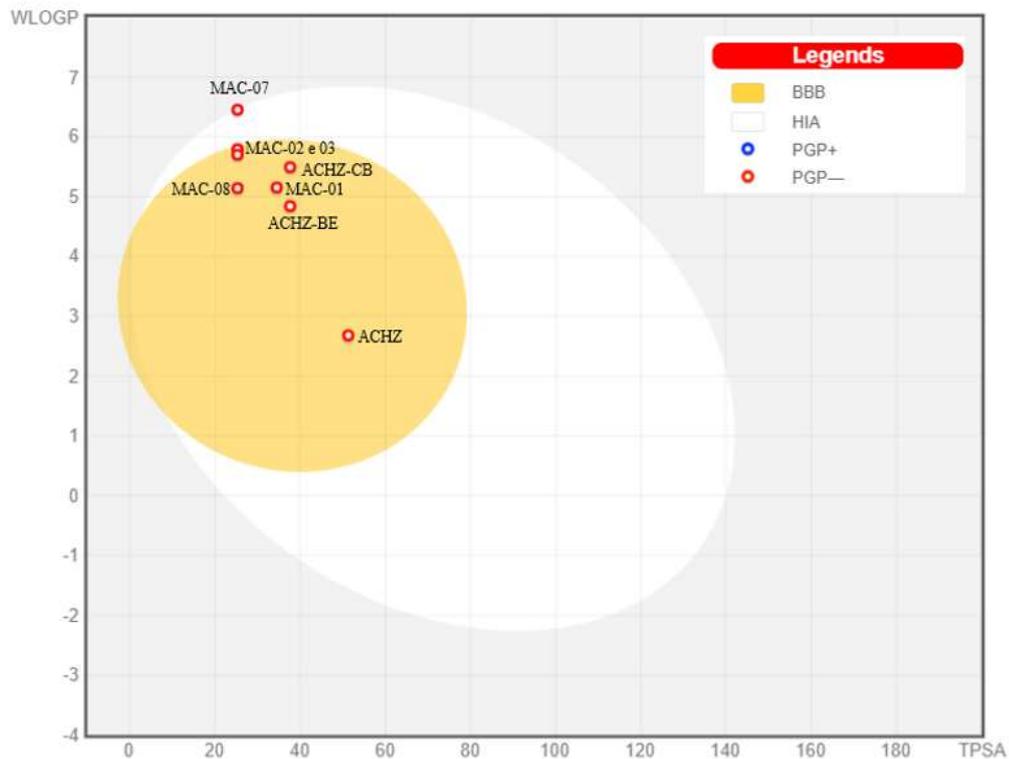
estrutura química átomos de cloro que participaram da interação com os alvos analisados por meio de diferentes interações com diferentes aminoácidos, demonstrando ser essenciais. Para o alvo DNA (PDB ID: 1BNA), ACHZ-BE também demonstrou resultado interessante. Portanto, todos os derivados acridínicos projetados apresentaram bons resultados frente aos alvos testados, indicando potencial para atuar como inibidores de topoisomerase II α ou como agentes capazes de interagir com o DNA, desse modo viabilizando as suas obtenções sintéticas.

5.2 Predições farmacocinéticas

Uma droga eficaz e segura deve apresentar uma combinação afinada de farmacodinâmica e farmacocinética, juntamente com absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade tolerável (ADMET) adequados (Ferreira, L. L. G.; Andricopulo, 2019). Desse modo, também foi realizada a predição farmacocinética *in silico* ADME como triagem inicial dos derivados projetados, utilizando a plataforma online SwissADME.

Para investigar a absorção gastrointestinal e permeação na barreira hematoencefálica (BHE) das moléculas, foi utilizado o modelo *Boiled-Egg*. O método de permeação Brain OrIntestinaLEstimateD (BOILED)-Egg é um modelo preditivo que funciona com velocidade, precisão e facilidade conceitual ao calcular a polaridade e a lipofilicidade dos produtos químicos, gerando saídas gráficas claras. Esse modelo permite a estimativa de dois comportamentos farmacocinéticos: a absorção passiva gastrointestinal e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Arulanandam *et al.*, 2022). Na figura 22 é possível observar o modelo obtido para as moléculas projetadas.

Figura 22 - Modelo *Boiled-Egg* das moléculas projetadas



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: BBB (BHE) = barreira hematoencefálica; HIA (TGI) = trato gastrointestinal; PGP+ = substrato da glicoproteína P; PGP- = não substrato da glicoproteína P.

Como observado na figura 22, os compostos apresentaram alta probabilidade de serem absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI), representado no gráfico pela área branca, esta é uma característica extremamente importante para fármacos destinados a administração por via oral (Chowdhury; Hossain; Rafe, 2020).

Todas as moléculas, com exceção MAC-07, apresentaram potencial para permear a BHE, representado no gráfico como a área amarela. A barreira hematoencefálica corresponde à monocamadas dinâmicas, adaptáveis e interativas de células, que participam da proteção, nutrição e homeostase do sistema nervoso central (SNC). Sua complexidade justifica a dificuldade no desenvolvimento de drogas que podem atravessá-la (Banks, 2016). Desse modo, moléculas capazes de permear a BHE, podem ser uma alternativa, se ativas, pra tratamento de tumores intracranianos.

O modelo *Boiled-Egg* também permite identificar se os compostos são potenciais substratos para a Glicoproteína P (P-gp). A glicoproteína de permeabilidade (P-gp) é um transportador de efluxo na membrana e faz parte dos transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC). Ele é expresso em vários tecidos saudáveis e também superexpresso em tecido de câncer humano, onde atua removendo agentes quimioterápicos das células e diminuindo o

acúmulo intracelular de drogas, representando uma das principais proteínas associadas a multirresistência a drogas anticancerígenas (Braconi *et al.*, 2022; Shah; Ajazuddin; Bhattacharya, 2023).

Desse modo, identificar substratos da P-gp durante os estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos aumenta as taxas de sucesso durante os estágios posteriores e reduz custos financeiros. Os substratos da P-gp são estruturalmente variados, na natureza eles são conhecidos por serem lipofílicos, básicos, geralmente contendo nitrogênio, capazes de formar várias ligações de hidrogênio. Substratos P-gp conhecidos incluem vários medicamentos utilizados clinicamente, entre eles os antineoplásicos (Ahmed Juvale *et al.*, 2022).

Segundo os dados obtidos no *SwissADME*, nenhuma das moléculas foram consideradas potenciais substratos da glicoproteína P e, portanto, apresentariam menor susceptibilidade a resistência a múltiplas drogas por parte de células cancerígenas, que atuam por tal mecanismo.

O coeficiente de partição entre *n*-octanol e água ($\log P_{o/w}$), usado para descrever a lipofilicidade de um composto, representa uma propriedade físico-química importante para a descoberta de drogas, uma vez que a lipofilicidade está associada as interações droga-alvo e fora do alvo por meio de interações hidrofóbicas, bem como, lipofilicidade relativamente alta resulta em solubilidade aquosa reduzida e maior probabilidade de instabilidade metabólica (Bergazin *et al.*, 2021).

O $\log P_{o/w}$ é obtido por meio da média aritmética dos valores preditos por cinco métodos propostos: iLogP, xLogP3, WLogP, MLogP, Silicos-IT (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Dentre esses modelos, podemos ressaltar o WLogP, apresentado por Wildman e Crippen (1999) e utilizado para determinação de *druglikeness* por Ghose e Egan e o MLogP apresentado por Moriguchi *et al.* (1994), utilizada na determinação de *druglikeness* por Lipinski. A tabela 8, apresenta critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan, dentre os quais está o Log P. Os valores consensuais de Log P, WLogP, MLogP e outros parâmetros considerados de *druglikeness* como peso molecular o número de aceptores de ligações de hidrogênio e doadores de ligações de hidrogênio obtidos para as moléculas analisadas estão contidos na tabela 9 onde é possível observar que maior parte dos compostos foram condizentes com todos critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan, apenas as moléculas MAC-02, MAC-03 e MAC-07 apresentaram WLogP e MLogP levemente superiores aos estabelecidos.

Tabela 8 - Parâmetros de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan

<i>Druglikeness</i>	Parâmetros
Lipinski	Peso molecular ≤ 500 MLogP $\leq 4,15$ Aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 Doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5
Ghose	$160 \leq$ Peso molecular ≤ 480 $-0,4 \leq$ WLogP $\leq 5,6$ $40 \leq$ Refratividade molar ≤ 130 $20 \leq$ Átomos ≤ 70
Egan	WLogP $\leq 5,88$ Área de superfície polar topológica $\leq 131,6$

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 9 - Parâmetros de *druglikeness* apresentados pelas moléculas projetadas

Moléculas	Log P o/w	WLogP	MLogP	PM	ALH	DLH
MAC-01	4.41	5.15	3.43	312.36	3	0
MAC-02	4.97	5.79	4.31	316.78	2	0
MAC-03	4.74	5.70	4.20	300.33	3	0
MAC-07	5.48	6.45	4.80	351.23	2	0
MAC-08	4.41	5.14	3.82	282.34	2	0
ACHZ	2.53	2.68	2.26	221.26	2	1
ACHZ-BE	4.44	4.84	3.64	309.36	3	0
ACHZ-CB	4.41	5.15	3.43	343.81	3	0

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: PM: Peso Molecular (g/mol); ALH: Aceptores de ligações de hidrogênio; DLH: Doadores de ligações de hidrogênio

Com a utilização dos métodos *in silico* ESOL, Ali e SILICOS-IT disponíveis no SwissADME é possível determinar a provável solubilidade em água (Log S) de compostos nas fases iniciais do desenvolvimento da droga. Esse também é um importante parâmetro a ser analisado durante o desenvolvimento de uma droga, pois, a baixa solubilidade aquosa pode ocasionar biodisponibilidade oral baixa e altamente variável, exposição menos proporcional à

dose, além de ocasionar concentrações abaixo do nível terapêutico em ensaios *in vitro* podendo interromper o processo de desenvolvimento de um fármaco (Fink *et al.*, 2020).

Segundo os métodos citados no parágrafo anterior, os compostos podem ser definidos como insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < solubilidade moderada < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente solúvel conforme o resultado de Log S. Segundo os resultados de solubilidade aquosa obtidos para as moléculas projetadas (tabela 10), elas se apresentaram principalmente como moderadamente solúveis ou pouco solúveis, com exceção da molécula ACHZ que se apresentou solúvel em água de acordo com o Log S (ESOL) e (Ali). A molécula MAC-07 foi a única que se apresentou como pouco solúvel nos métodos analisados, entretanto, muitas drogas anticancerígenas utilizadas clinicamente também apresentam pouca solubilidade em água (Fink *et al.*, 2020).

Tabela 10 - Determinação da solubilidade aquosa das moléculas projetadas

Compostos	Log S (ESOL)	Log S (Ali)	Log S (SILICOS-IT)	Classificação
MAC-01	-5.15	-5.14	-8.10	MS\MS\PS
MAC-02	-5.69	-5.63	-8.58	MS\MS\PS
MAC-03	-5.25	-5.08	-8.25	MS\MS\PS
MAC-07	-6.33	-6.39	-9.18	PS\PS\PS
MAC-08	-5.10	-4.98	-7.98	MS\MS\PS
ACHZ	-3.53	-3.54	-5.12	S\S\MS
ACHZ-BE	-5.20	-5.32	-8.06	MS\MS\PS
ACHZ-CB	-5.78	-5.97	-8.66	MS\MS\PS

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: S= Solúvel; MS= Moderadamente Solúvel; PS= Pouco solúvel

Com intuito de compreender a possível metabolização das moléculas projetadas, bem como a capacidade que as mesmas apresentam de interferir no metabolismo de outras drogas, elas foram avaliadas *in silico* frente cinco isoformas das enzimas citocromo P450 (CYP) quanto sua capacidade de inibição.

As enzimas do citocromo P450 (CYP) representam o sistema enzimático mais importante para o metabolismo de fase 1 de produtos farmacêuticos e outros xenobióticos. Existem cerca de 57 CYPs funcionais, as isoformas pertencentes às famílias CYP1, CYP2 e CYP3 são responsáveis por cerca de 80% do metabolismo oxidativo e aproximadamente 50%

da eliminação geral de drogas clínicas. Portanto, inibição e indução de CYPs são causas comuns de interações farmacocinéticas entre drogas (Hakkola *et al.*, 2020; Zhao, M. *et al.*, 2021).

As principais CYPs codificadas em humanos correspondem a CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, sendo esta última, responsável por aproximadamente 50% de todas as proteínas CYPs presentes no fígado humano, metabolizando aproximadamente 60% dos fármacos disponíveis comercialmente (Edamatsu *et al.*, 2020). Essas enzimas são capazes de realizar diferentes reação químicas, entre elas: hidroxilação de ligações C–H, epoxidação de ligação dupla C=C, descarboxilação, dessulfuração, desaminação, peroxidações, N-, S- e O-desalquilações e sulfoxidações (Di Nardo; Gilardi, 2020).

Conforme demonstrado no quadro 1, todas as moléculas demonstraram potencial inibição das isoformas CYP1A2 e CYP2C19 (com exceção de ACHZ) e, portanto, podem interferir no metabolismo de drogas que são substratos destas isoformas gerando toxicidade. Entretanto, apenas MAC-01 e MAC-08 apresentaram potencial inibição de CYP3A4, principal isoforma envolvida na metabolização de drogas.

Quadro 1- Interação das moléculas projetadas com as isoformas de CYP450

MOLÉCULAS	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
MAC-01	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
MAC-02	Sim	Sim	Não	Não	Não
MAC-03	Sim	Sim	Não	Não	Não
MAC-07	Sim	Sim	Não	Não	Não
MAC-08	Sim	Sim	Não	Não	Sim
ACHZ	Sim	Não	Não	Não	Não
ACHZ-BE	Sim	Sim	Sim	Não	Não
ACHZ-CB	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

De modo geral, as moléculas projetadas apresentaram bons resultados nos estudos farmacocinéticos, demonstrando boa absorção gastrointestinal, permeação na BHE, podendo ser utilizadas para tratamentos de cânceres intracranianos, majoritariamente respeitaram os parâmetros de *druglikenes* e não inibiram a principal isoforma do citocromo P450 envolvida na metabolização de drogas de uso clínico. Apesar das moléculas não demonstrarem alta

solubilidade, muitos fármacos de uso clínico também não apresentam. Os dados expressos nesse tópico 5.2 devem ser mais bem avaliados por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

5.3 Síntese e caracterização físico-química

As estratégias de modificação molecular utilizadas no presente trabalho, foram realizadas com o intuito de obter novas moléculas estruturalmente mais simples conforme cada série fosse sendo obtida, considerando a sequência explícita anteriormente no subtópico estratégia de desenvolvimento (esquema 1), desse modo seria possível avaliar a importância da porção tioamida para a atividade biológica, bem como importância dos átomos de nitrogênios presentes nas estruturas. Entretanto, foi apenas possível a obtenção da série diazenilacridina (ACHZ) e fenilmetanimina (MAC).

Como apresentado anteriormente na tabela 2, tabela 3 e tabela 4, diferentes condições reacionais foram utilizadas para possível obtenção dos produtos da série fenilmetanimina (DE) e estirilacridina (MB), porém não se obteve êxito. As reações químicas para obtenção destes produtos só ocorriam em temperaturas maiores que 100 °C e apresentavam a formação de muitos subprodutos\produtos de degradação, e prováveis traços do produto desejado, comprometendo o processo de purificação e ocasionando baixos rendimentos reacionais inviabilizando a obtenção dos mesmos.

5.3.1 Caracterização físico-química do núcleo acridina-9-carboxaldeído

Os núcleos 9-metil-acridina e acridina-9-carboxaldeído foram utilizados como intermediários para obtenção dos novos derivados acridínicos. A rota sintética empregada foi adaptada de Albino (2020) e Song, D. *et al.* (2021) e ocorreu de forma linear, em três etapas como descrito na metodologia: (1°) síntese da 9-metil-acridina (AC-01); (2°) síntese do ACN-01; e (3°) síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-02). Os mecanismos reacionais para obtenção das moléculas AC-01, ACN e AC-02 estão detalhados nos trabalhos de Albino (2020) e Silva (2018).

Para avaliar se os compostos obtidos se encontravam apropriados para posteriores reações sintéticas, os mesmos foram caracterizados físico-quimicamente e os resultados estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Características físico-químicas dos compostos acridínicos

Compostos	Aparência	P.M.	Ren. (%)	F.F. (°C)	R_f	F.M.	LogP
AC-01	Pó amarelo	193,09	68	115-118	0.68	C ₁₄ H ₁₁ N	4,03
ACN-01	Pó vermelho	325,16	74	271-272	0.64	C ₂₂ H ₁₉ N ₃	5,69
AC-02	Pó amarelo	207,23	90	144-147	0.74	C ₁₄ H ₉ NO	3,29

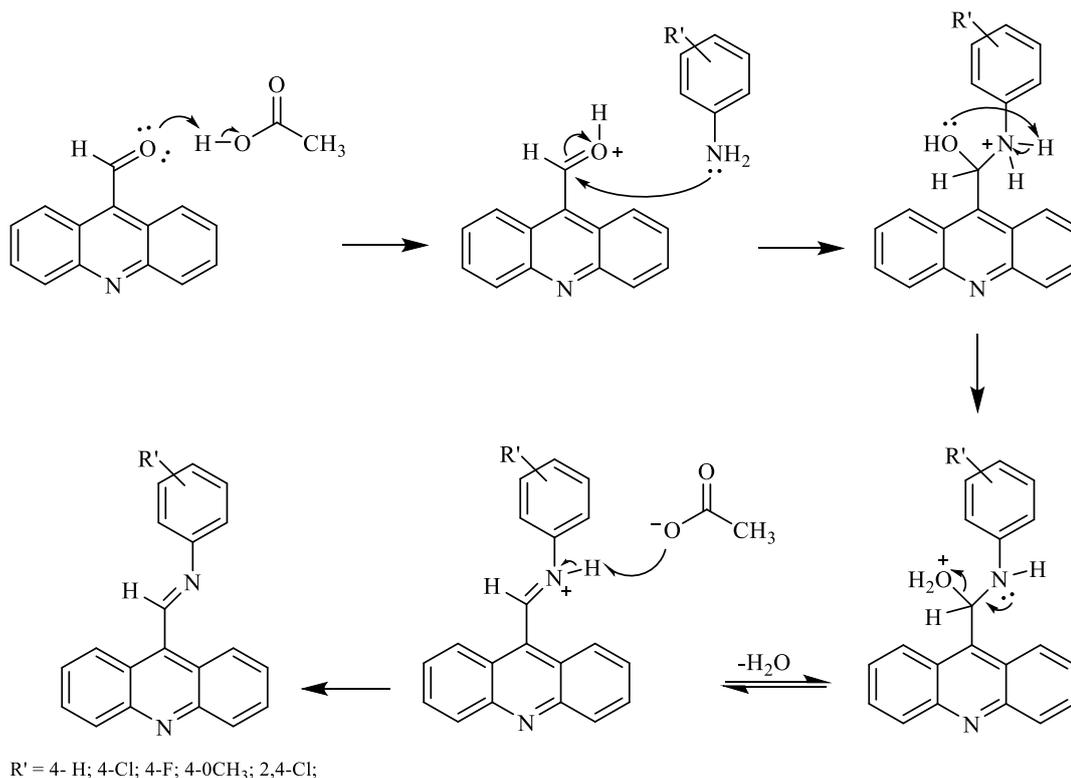
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: PM – Peso molar (g mol⁻¹), Ren. % – Rendimento (%). F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção (Hexano/Acetato 6:4), FM – Fórmula molecular, LogP – Coeficiente de partição octanol-água.

5.3.2 Mecanismo reacional e caracterização físico-química dos compostos da série fenilmetanimina (MAC)

Para obtenção dos compostos da série fenilmetanimina (MAC), foi realizada uma reação de condensação no núcleo acridina-9-carboxaldeído com diferentes anilinas, na presença de ácido acético (esquema 8). O ácido acético foi utilizado como catalizador da reação, sendo responsável por doar um próton para o oxigênio carbonílico, tornando o mesmo protonado e favorecendo o rompimento da ligação dupla com o carbono da carbonila. O carbono da carbonila torna-se então deficiente de elétrons e mais susceptível ao ataque nucleofílico do N anilínico. Após a formação da ligação C-N, o oxigênio da hidroxila captura um próton do N e é liberado para o meio reacional na forma de água e o outro próton do N é capturado para restaurar o catalizador presente no meio reacional, favorecendo então a formação da imina (C=N) e obtenção dos respectivos produtos finais.

Esquema 8 - Mecanismo reacional para obtenção dos compostos da série fenilmetanimina



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Foram obtidas com sucesso cinco moléculas diferentes para a série fenilmetanimina, que podem ser visualizadas no quadro 2. Destas, quatro são inéditas (MAC-01, MAC-02, MAC-03 e MAC-07). A molécula MAC-08 foi previamente descrita por Tsuge, Nishinohara e Tashiro (1963).

Quadro 2 - Moléculas obtidas para a série fenilmetanimina (MAC)

MAC-01	MAC-02	MAC-03	MAC-07	MAC-08

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A síntese da molécula MAC-05 não foi finalizada com sucesso, pois para que ocorresse a formação do produto desejado, a reação foi exposta a temperaturas mais altas (até 80°C), ocasionando também a formação de muitos subprodutos, provavelmente devido ao forte efeito

desativador do grupo nitro ou à degradação dos produtos do meio reacional. De modo semelhante, a molécula MAC-06 foi exposta a temperaturas mais altas (até 100°C), porém a formação de um produto majoritário foi incerta, com aparente formação de muitos subprodutos. Tal dificuldade na síntese da MAC-06 pode ter ocorrido devido ao impedimento estérico ocasionado pelo grupo metóxi na posição 2 do anel, que dificultou a condensação da 2-metoxi-4-nitroanilina com o AC-02, além da também presença do grupo 4-NO₂.

As características físico-químicas para os compostos obtidos da série MAC foram avaliadas e estão descritas na tabela 12. Os parâmetros de fórmula molecular, peso molecular e LogP, são teóricos e foram obtidos pelo programa Marvin. Conforme demonstrado, todos apresentaram bons rendimentos reacionais, com valores variando entre 53 e 85%, demonstrando a viabilidade da rota sintética utilizada. Adicionalmente, não houve variação no ponto de fusão, indicando pureza dos compostos e demonstrando que o método de purificação, quando empregado, foi adequado e satisfatório, além de ser simples e rápido.

Tabela 12 - Características físico-químicas para os compostos da série fenilmetanamina (MAC)

Composto	Aparência	Rend. %	R _f	F.F. (°C)	F.M.	P.M.	LogP
MAC-01	Pó amarelo	53	0,69	>300	C ₂₁ H ₁₆ N ₂	312,13	5,29
MAC-02	Pó amarelo	80	0,57	188	C ₂₀ H ₁₃ ClN ₂	316,08	5,96
MAC-03	Pó amarelo	60	0,65	182	C ₂₀ H ₁₃ FN ₂	300,11	5,56
MAC-07	Pó amarelo	66	0,61	190	C ₂₀ H ₁₂ Cl ₂ N ₂	351,23	6,52
MAC-08	Pó amarelo	85	0,61	189	C ₂₀ H ₁₄ N ₂	282,35	5,41

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: PM – Peso molar (g mol⁻¹), Rend% – Rendimento (%). F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção (Hexano/Acetato 7:3), F.M. – Fórmula molecular.

Os compostos obtidos também foram avaliados frente diferentes solventes orgânicos com diferentes polaridades. Eles foram escolhidos de acordo com a disponibilidade do laboratório no qual foi realizada a análise, o LDSF, e foi dada prioridade aos solventes mais comumente utilizados em diferentes processos e análises químicas. Para tal, utilizaram-se os solventes: metanol, acetonitrila, acetato de etila, dimetilsulfóxido, diclorometano e clorofórmio e os resultados estão expostos no quadro 3. Como a precipitação dos compostos ocorreu na presença da água, a solubilidade na mesma não foi avaliada.

Quadro 3 - Solubilidade aparente dos compostos da série fenilmetanimina (MAC)

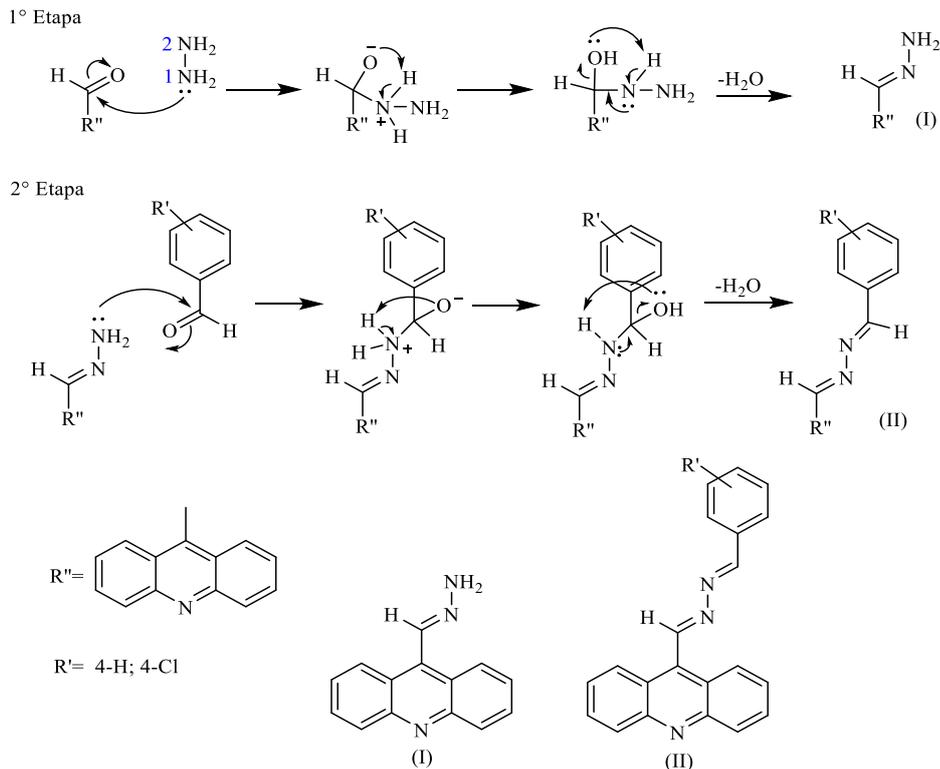
Compostos	Metanol	Acetonitrila	EtOAc	DMSO	Diclorometano	Clorofórmio
MAC-01	PS	PS	S	S	S	S
MAC-02	PS	PS	S	S	S	S
MAC-03	S	S	S	S	S	S
MAC-07	I	I	PS	S	S	S
MAC-08	PS	S	S	S	S	S

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: S; solúvel; PS: parcialmente solúvel; I:insolúvel. EtOAc: Acetato de Etila; DMSO: Dimetilsulfóxido

5.3.3 Mecanismo reacional e caracterização físico-química dos compostos da série ACHZ

Os compostos da série ACHZ foram obtidos por meio de rota sintética linear, onde inicialmente foi realizada a condensação do núcleo acridina-9-carboxaldeído com a hidrazina, para obtenção do intermediário ACHZ, correspondendo a primeira etapa descrita no esquema 9. Posteriormente, foi realizada a condensação do intermediário ACHZ com diferentes aldeídos, correspondendo a segunda etapa descrita no esquema 9.

Esquema 9 - Mecanismo reacional para obtenção dos compostos da série diazenilacridina

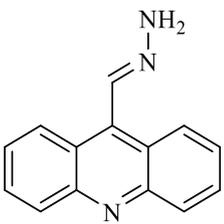
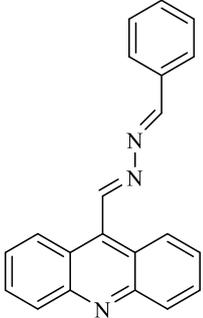
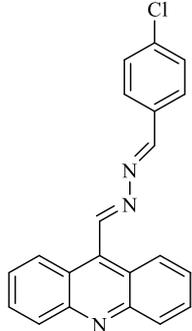
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A primeira etapa correspondente a obtenção do intermediário ACHZ tem início com o ataque nucleofílico do N da hidrazina ao carbono da carbonila. Devido a diferença de eletronegatividade entre o carbono e o oxigênio da carbonila, o carbono torna-se susceptível ao ataque nucleofílico do N da hidrazina. Quando formada a ligação C-N, ocorre o rompimento da dupla ligação C=O, e o oxigênio da carbonila fica com carga negativa que logo é estabilizada por um próton proveniente de N₁. Em seguida, outro próton de N₁ é transferido para o oxigênio por prototropismo, formando uma hidroxila protonada. Devido à instabilidade da hidroxila protonada na estrutura química, a mesma é liberada para o meio na forma de água, formando um intermediário carbocátion que se estabiliza por ressonância, com formação da ligação C=N (imina), formando o composto final.

A segunda etapa que consiste na obtenção dos produtos finais, tem início com o ataque nucleofílico do N do grupamento -NH₂ ao carbono carbonílico dos respectivos aldeídos utilizados. Semelhante a etapa anterior, ocorre a formação da ligação C-N, com posterior estabilização de cargas, saída de uma molécula de água e estabilização do intermediário carbocátion que se estabiliza por ressonância, com formação da ligação C=N, formando o composto final.

Para essa série, foram obtidas três moléculas: o intermediário ACHZ, e os produtos finais ACHZ-BE e ACHZ-CB, que foram previamente descritas por Abu Shady, Ragab e Ali (1990) e Kharkharov (1955) e podem ser visualizados no quadro 4.

Quadro 4 - Moléculas obtidas para a série diazenilacridina (ACHZ)

ACHZ	ACHZ-BE	ACHZ-CB
		

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

As características físico-químicas para os novos compostos da série diazenilacridina (ACHZ) foram avaliadas e estão descritas na tabela 13. Os parâmetros fórmula molecular, peso molecular e Log P, são teóricos e foram obtidos pelo programa Marvin.

Tabela 13 - Características físico-químicas para os compostos da série diazenilacridina (ACHZ)

Composto	Aparência	Ren. (%)	R _f	F.F. (°C)	F.M.	P.M.	LogP
ACHZ	Pó amarelo	71	0,38	179	C ₁₄ H ₁₁ N ₃	221,10	3,02
ACHZ-BE	Pó amarelo	76	0,79	170-179	C ₂₁ H ₁₅ N ₃	309,13	5,93
ACHZ-CB	Pó amarelo	49	0,82	169-170	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₃	343,09	6,49

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: PM – Peso molar (g mol⁻¹), Rend% – Rendimento (%). F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção (Hexano/Acetato 6:4), F.M. – Fórmula molecular.

Os compostos obtidos para esta série também foram avaliados frente os mesmos solventes orgânicos utilizados para a série MAC. Como havia pouca quantidade da molécula ACHZ-CB, a mesma foi testada apenas em DMSO, solvente utilizado para testes biológicos. O resultado se encontra no quadro 5.

Quadro 5 - Solubilidade aparente dos compostos da série diazenilacridina (ACHZ)

Compostos	Metanol	Acetonitrila	EtOAc	DMSO	Diclorometano	Clorofórmio
ACHZ	PS	S	PS	S	S	PS
ACHZ-BE	PS	PS	S	S	S	S
ACHZ-CB	-	-	-	S	-	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: S; solúvel; PS: parcialmente solúvel; I: insolúvel. EtOAc: Acetato de Etila; DMSO: Dimetilsulfóxido

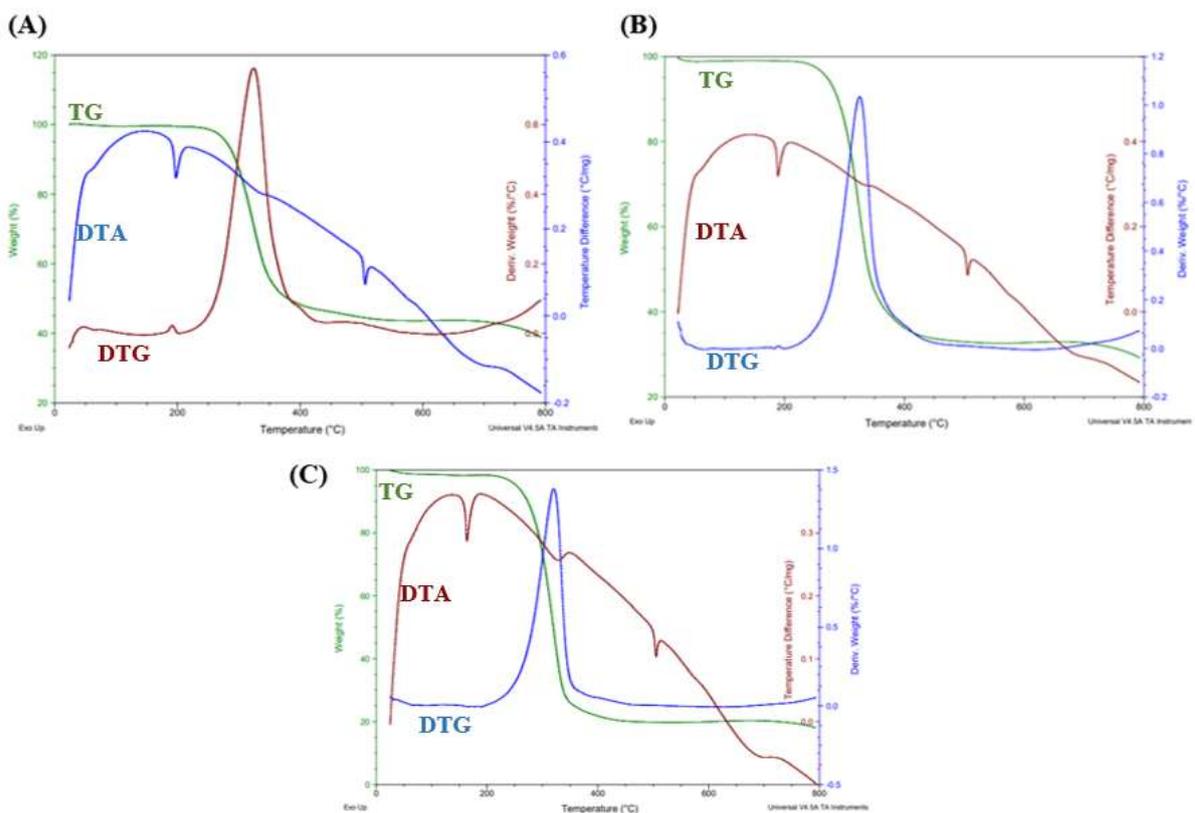
5.4 Análise térmica: termogravimetria (TG)

As técnicas de análise térmicas são amplamente utilizadas para a caracterização de matérias-primas farmacêuticas, compostos químicos com potenciais atividades biológicas e drogas aprovadas para uso clínico. Compreender o impacto da temperatura sobre os compostos químicos, é essencial, uma vez que, o comportamento térmico de uma molécula fornece informações valiosas como pureza, grau de solvatação, estabilidade térmica, mecanismos de decomposição ou seus produtos de degradação, além de permitir estudar processos de cristalização e fusão (Ostasz; Lyszczek; Sztanke, 2023).

Desse modo, os compostos da série fenilmetanimina (MAC) foram analisados por meio da técnica de TG, e os resultados estão expressos nas figuras 23 e 24, e na tabela 11. As curvas termogravimétricas dos compostos da série MAC apresentaram uma única etapa de degradação, com perdas de massa variando entre 52,59 e 86,6%. Por meio da análise das curvas de TG e

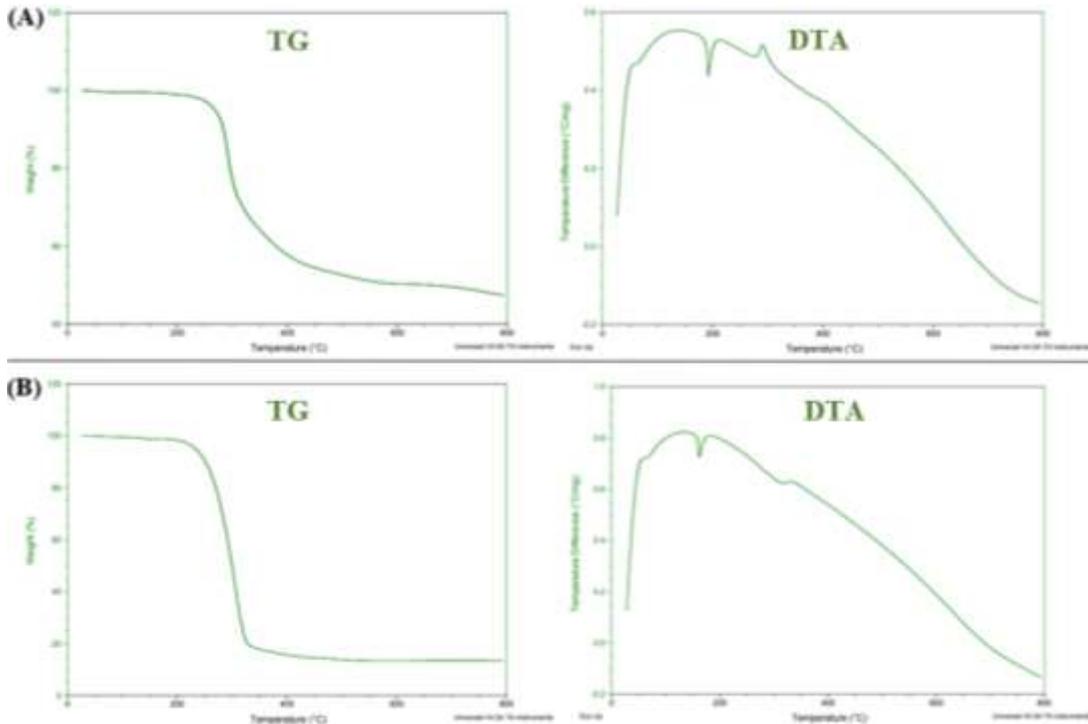
sua derivada DTG, é possível notar que as moléculas foram estáveis até cerca de 250 °C. Essa é uma característica importante em moléculas com potencial para se tornar um fármaco, pois a estabilidade em temperaturas muito superiores à temperatura ambiente, representa menores riscos de sofrer alterações com mudanças na temperatura de armazenamento na faixa de 20 °C a 45 °C (OSTASZ; ŁYSZCZEK; SZTANKE, 2023). Todos os compostos analisados apresentaram resíduos que não se decompõe na sua totalidade até 800 °C.

Figura 23 - Curvas termogravimétricas dos compostos MAC-01 (A), MAC-02 (B) e MAC-03 (C)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: TG: Termogravimétrica; DTG: Termogravimétrica Derivada; DTA: Análise Térmica Diferencial.

Figura 24 - Curvas termogravimétricas dos compostos MAC-07 (A) e MAC-08 (B)

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: TG: Termogravimétrica; DTA: Análise Térmica Diferencial.

Também é possível observar pela análise das curvas da análise térmica diferencial (DTA), presentes nas figuras 23 e 24, que em todas as moléculas da série MAC ocorreu um evento endotérmico próximo a 200 °C, correspondentes a fusão da amostra. Esses eventos foram condizentes com os pontos de fusão avaliados nos parâmetros físico-químicos.

Tabela 14 - Dados termogravimétricos dos compostos da série fenilmetanimina (MAC)

Compostos	Estágio da perda	Faixa de Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
MAC-01	Primeira	242,04 - 536,63	61,17
MAC-02	Primeira	38,07 - 439,06	70,8
MAC-03	Primeira	218,57 - 418,3	81,9
MAC-07	Primeira	26,6 - 767,51	52,59
MAC-08	Primeira	138,53 - 388,94	86,6

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Desse modo, as moléculas apresentaram eventos térmicos semelhantes, demonstrando que apresentam estruturas químicas análogas.

5.5 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

5.5.1 Identificação dos compostos por ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica muito utilizada para elucidar estrutura, conformação e dinâmica de moléculas de variados tamanhos. Além de ser uma técnica poderosa para elucidação estrutural de diferentes compostos, ela também pode ser utilizada para controle de processos, monitoramento de reações químicas, controle de qualidade de várias matrizes complexas, entre outros (Assemat *et al.*, 2019; Singh, K.; Blümich, 2017).

Neste trabalho, utilizou-se o RMN ^1H e RMN ^{13}C para elucidação estrutural dos compostos obtidos para a série MAC e para a série ACHZ. Também foi realizado RMN ^1H e RMN ^{13}C para o intermediário composto AC-01 e AC-02, com intuito de observar sua viabilidade para as sínteses dos compostos pretendidos. Os dados espectroscópicos serão discutidos nos próximos parágrafos.

Os resultados do RMN ^1H e RMN ^{13}C para os núcleos 9-metil-acridina e acridina-9-carboxaldeído (AC-02) estão contidos na tabela 15. Os espectros de ambos compostos apresentaram deslocamentos químicos característicos para hidrogênio e carbonos presentes em sua estrutura, os quais são discutidos a seguir.

Tabela 15 - Resultado das análises de RMN de ^1H e ^{13}C para os núcleos AC-01 e AC-02

Compostos	RMN de ^1H (valores em ppm)	RMN de ^{13}C (valores em ppm)
AC-01	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 8.40 (dd, $J = 8.9, 2.8$ Hz, 2H, acridina), 8.13 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 2H, acridina), 7.84 (m, 2H, acridina), 7.63 (m, 2H, acridina), 3.13 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H, metil)	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO): δ 148.36 (Cq, acridina, adjacente ao N), 143.12 (Cq, acridina ligado ao C sp^3), 130.47 (C-H, acridina), 130.15 (C-H, acridina), 126.04 (C-H, acridina), 125.58 (C-H, acridina), 125.50 (Cq, acridina), 13.18 (C-H, metil)
AC-02	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 11.50 (s, 1H, aldeído), 8.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, acridina), 8.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, acridina), 7.94 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, acridina), 7.80 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, acridina)	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO): δ 196.24 (C-H, aldeído), 149.10 (C=N, acridina), 133.57 (Cq da acridina ligado ao C aldeído), 130.96 (C-H, acridina), 130.31 (C-H, acridina), 129.16 (Cq, acridina), 124.60 (C-H, acridina), 123.55 (C-H, acridina)

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Hidrogênios ligados a anéis aromáticos normalmente apresentam deslocamento químico entre 6,5 e 8,0 ppm devido ao grande campo anisotrópico gerado pela circulação de elétrons do sistema π do anel (Pavia *et al.*, 2010). No RMN ^1H dos núcleos acridínicos, foram identificados sinais na forma de dubletos, duplo dubletos, tripletos e multipletos com integrais para dois H, com deslocamento químico variando entre 7,63 – 8,84 ppm, região característica para os H do núcleo acridínico (Almeida *et al.*, 2015). Os sinais observados acima de 8,0 ppm correspondem aos H próximos ao átomo de N presente no núcleo acridínico, uma vez que, átomos eletronegativos aumentam o deslocamento químico de prótons que estejam principalmente até três carbonos de distância (Pavia *et al.*, 2010).

Hidrogênios benzílicos também são desblindados pelo campo anisotrópico do anel, mas por estarem mais distantes deste, o efeito é menor e eles são encontrados entre 2,3- 2,7 ppm. O RMN ^1H do núcleo 9-metil-acridina também apresentou um singlete com integral para 3 H em 3,13 ppm característico dos hidrogênios benzílicos do grupamento metil presente em sua estrutura, que sofre maior deslocamento químico por estar ligado a um sistema conjugado de anéis aromáticos. Já o RMN ^1H acridina-9-carboxaldeído, apresentou um singlete com integral para 1H em 11,50 ppm, característico para o H do grupo aldeído (-CHO) que apresentou maior deslocamento químico por esta ligado a um sistema conjugado de anéis aromáticos. Deslocamento do próton de aldeído é encontrado entre 9-10 ppm (Pavia *et al.*, 2010).

Assim como observado para o ^1H , a eletronegatividade, a hibridação e a anisotropia afetam o deslocamento químico de ^{13}C . Carbonos em anéis aromáticos apresentam deslocamento químicos entre 110-175 ppm, devido ao efeito da anisotropia. O RMN ^{13}C dos núcleos acridínicos apresentaram majoritariamente deslocamentos entre 123,55 – 149,10 ppm, característicos para os carbonos dos anéis aromáticos. No RMN ^{13}C do núcleo 9-metil-acridina também foi observado um sinal com deslocamento químico de 13,18 ppm, característico do carbono metila, que normalmente se encontra na faixa de 8-30 ppm. Já no RMN ^{13}C do núcleo acridina-9-carboxaldeído, foi observado um sinal com deslocamento químico de 196,24 ppm, característico do carbono da carbonila. Devido a hibridização sp^2 e o átomo eletronegativo diretamente ligado ao carbono, os carbonos de grupo carbonila tem os maiores deslocamentos químicos, carbonos de carbonilas de aldeídos podem apresentar deslocamento entre 185-220 ppm (Pavia *et al.*, 2010).

Os dados obtidos para o RMN ^1H para os novos derivados acridínicos sintetizados neste trabalho estão descritos na tabela 16 e discutidos em seguida.

Tabela 16 - Resultados da análise por RMN de ^1H dos novos derivados acridínicos

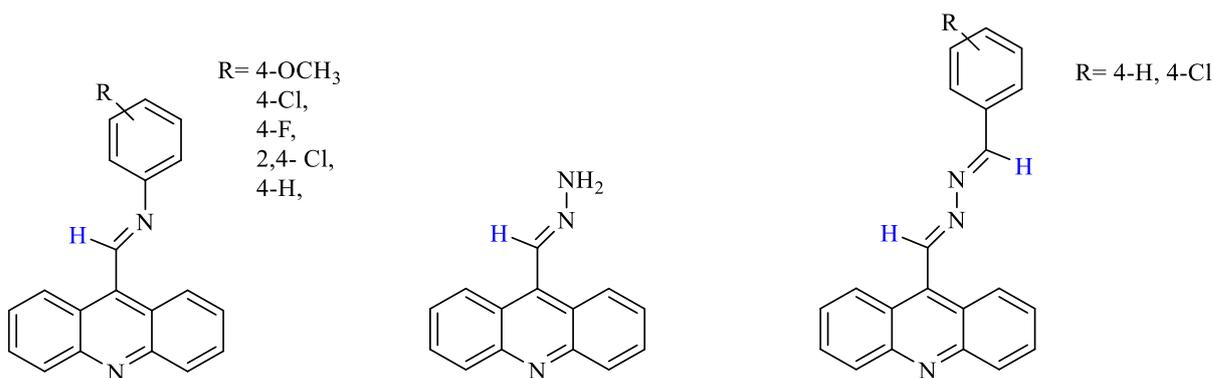
Compostos	RMN de ^1H (valores em ppm)
MAC-01	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.86 (s, 1H, imina), 8.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, acridina, adjacente ao N), 8.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, acridina), 7.91 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, fenil), 7.71 (m, 2H, acridina), 7.64 (m, 2H, acridina), 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, fenil), 3.85 (s, 3H, metoxila)
MAC-02	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.83 (s, 1H, imina), 8.80 (m, 1H, acridina, H adjacente ao N), 8.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, acridina), 7.91 (m, 2H, acridina), 7.71 (ddd, $J = 8.8, 6.4, 1.3$ Hz, 2H, acridina), 7.61 (q, $J = 8.8$ Hz, 4H, fenil)
MAC-03	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.82 (s, 1H, imina), 8.78 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, acridina, H adjacente ao N), 8.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, acridina), 7.90 (ddd, $J = 8.4, 6.5, 1.3$ Hz, 2H, acridina), 7.70 (m, 2H, fenil, adjacente ao F), 7.68 – 7.64 (m, 2H, fenil), 7.38 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H, acridina)
MAC-07	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.83 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, imina), 8.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, acridina, adjacente ao N), 8.26 (m, 2H, acridina), 7.93 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, acridina), 7.83 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, fenil), 7.74 (m, 4H, fenil), 7.61 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H, acridina)
MAC-08	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.80 (s, 1H, imina), 8.78 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 2H, acridina, H adjacente ao N), 8.24 (m, 2H, acridina), 7.90 (t, 2H, acridina), 7.70 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, acridina), 7.56 (m, 4H, fenil), 7.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, fenil)
ACHZ	RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 8.93 (s, 1H, imina), 8.74 (d, 2H, acridina), 8.12 (dd, $J = 8.7, 0.0$ Hz, 2H, acridina), 7.87 (sl, 2H, NH_2), 7.82 (ddt, $J = 8.7, 6.5, 1.4$ Hz, 2H, acridina), 7.61 (ddd, $J = 8.8, 6.5, 1.4$ Hz, 2H, acridina)
ACHZ-BE	RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 9.85 (s, 1H, imina ligada a acridina), 8.92 (s, 1H, imina ligada ao fenil), 8.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, acridina, adjacente ao N), 8.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, acridina), 8.02 (m, 2H, acridina), 7.92 (ddd, $J = 8.6, 6.6, 1.3$ Hz, 2H, fenil), 7.73 (m, 2H, acridina), 7.59 (td, $J = 6.7, 3.5$ Hz, 2H, fenil)
ACHZ-CB	RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 9.84 (s, 1H, imina ligada a acridina), 8.92 (s, 1H, imina ligada ao fenil), 8.72 (dd, $J = 8.7, 1.0$ Hz, 2H, acridina), 8.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenil), 8.03 (m, 2H, acridina), 7.92 (ddd, $J = 8.5, 6.6, 1.4$ Hz, 2H, acridina), 7.72 (ddd, $J = 8.9, 6.6, 1.3$ Hz, 2H, acridina), 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenil)

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Todos os compostos sintetizados, apresentam em sua estrutura, hidrogênios ligados diretamente ao carbono da imina ($-\text{CH}=\text{N}-$), esses por sua vez, também são H benzílicos, como observado na figura 25. Os sinais correspondentes a esses H foram observados para todas as moléculas como simpletos com deslocamento químico variando 8,93 – 9,86 ppm e podem ser

considerados diagnósticos da obtenção das moléculas sintetizadas. Esses sinais foram os que apresentaram maior deslocamento químico nos espectros, isso porque os hidrogênios em questão estão sofrendo a ação de átomo eletronegativo (N), estão ligados a um carbono com hibridização sp^2 , são desblindados pelo campo anisotrópico dos anéis aromáticos e fazem parte uma estrutura conjugada.

Figura 25 - Estrutura geral dos compostos sintetizados e seus H com maior deslocamento químico

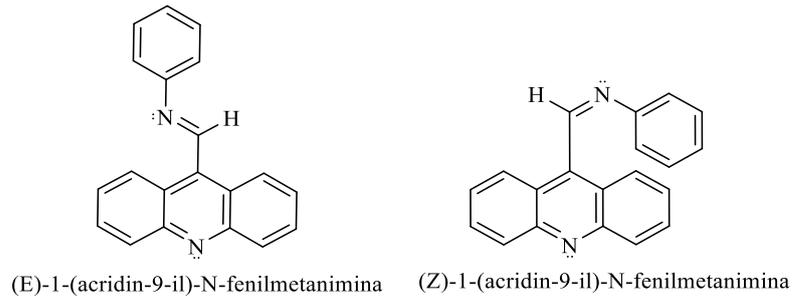


Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Outro ponto em comum entre as moléculas obtidas é o núcleo acridínico. No espectro de RMN de ^1H , todas as moléculas apresentaram sinais na forma de dubletos, duplo dubletos, duplo dubletos dobrados, tripletos e multipletos com integrais para dois H, com deslocamento químico variando entre 7,11 e 8,93 ppm, como observado para o núcleo AC-02.

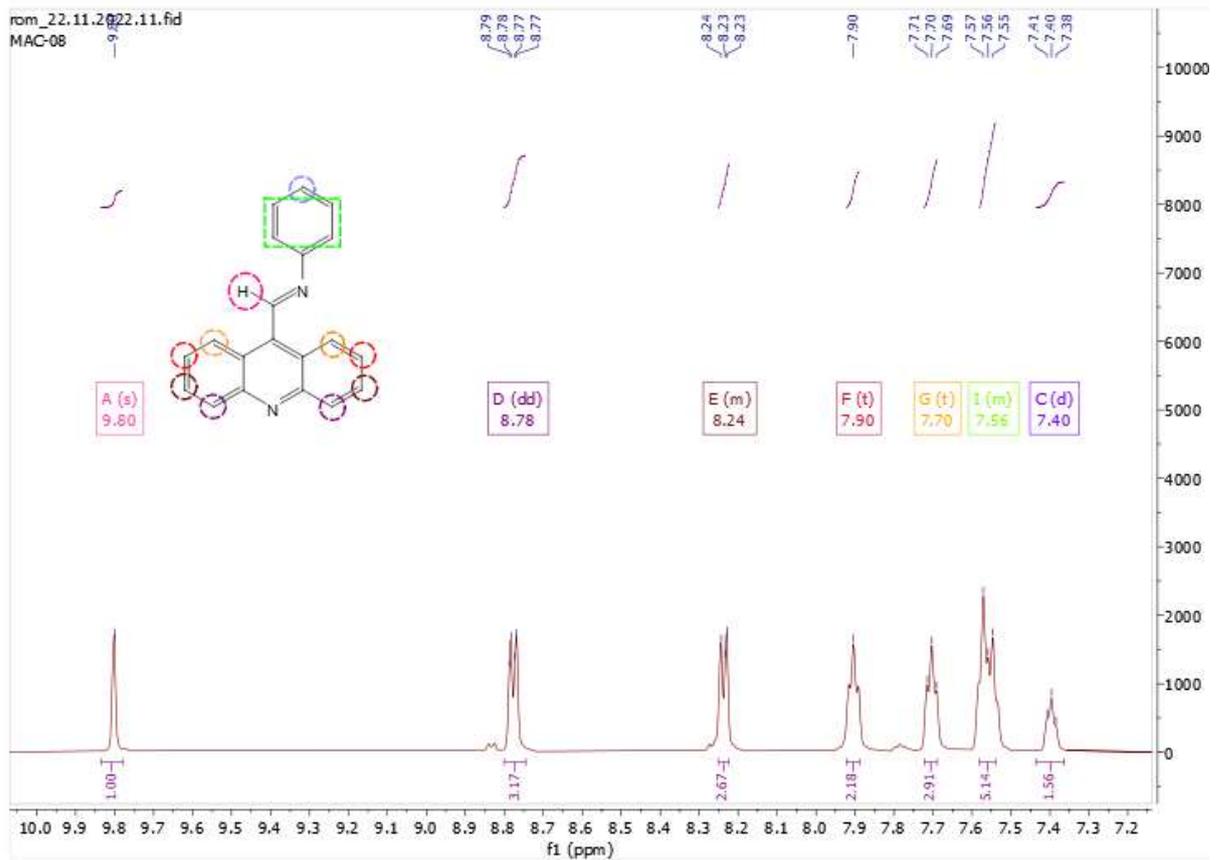
Em relação as moléculas da série MAC, os sinais se diferenciaram principalmente para os prótons do anel fenil. Assim como exposto no subtópico do *docking* molecular, a molécula MAC-08 foi obtida na síntese como uma mistura de diastereoisômeros (*E*) e (*Z*) (figura 26). Esse achado pode ser observado por meio do RMN de ^1H , onde o valor das integrais referentes aos prótons aromáticos contidos na referida molécula, excedem a quantidade de prótons esperados, mas apresentam formações de sinais características para MAC-08. Por meio do RMN de ^{13}C , foi possível a comprovação da presença dos diastereoisômeros, uma vez que o mesmo apresentou sinais duplicados característicos, o qual será melhor discutido adiante. Entretanto no espectro de ^1H seus sinais não apareceram duplicados e ocorreram na forma de multipletos com deslocamento químico em 7,56 ppm, correspondente aos hidrogênios na posição *orto* e *meta* do anel fenil e um dubleto em 7,40 ppm, correspondente ao hidrogênio da posição *para* do anel fenil (figura 27).

Figura 26 - Diastereoisômeros (Z) e (E) observados para a molécula MAC-08



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H da molécula MAC-08



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Para a molécula metoxilada, MAC-01, foi observado além dos dubletos com deslocamento de 8,24 e 8,82 ppm característicos para os hidrogênios do grupo fenil, um simpleto com integral para três hidrogênios em 3,85 ppm característico dos H do grupo metoxila. Os grupos metóxi são característicos por aparecerem no espectro na forma de um pico isolado na região de 3,2-3,8 ppm. Já a molécula MAC-02, com átomo de cloro na posição *para* do anel fenil, apresentou um quarteto com integral para quatro hidrogênios com sinal de

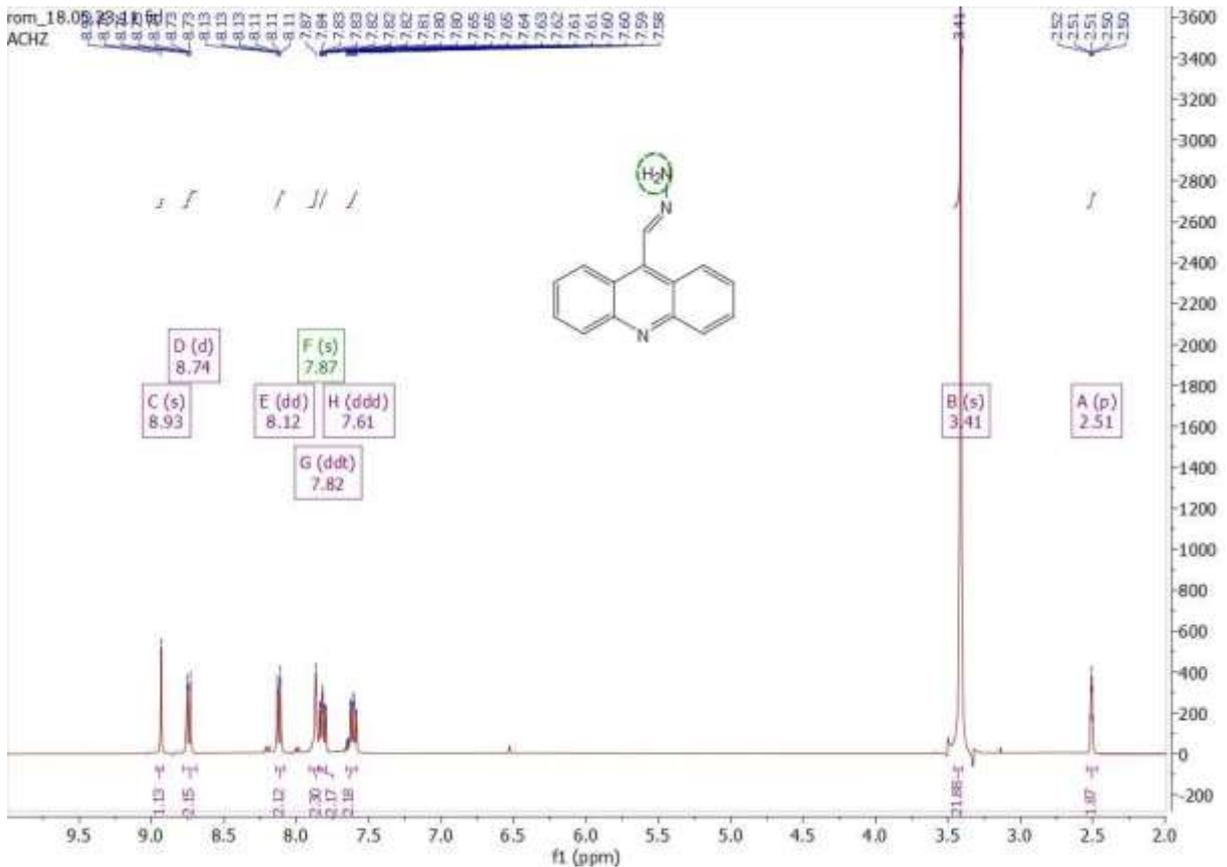
deslocamento químico em 7,61 ppm, característicos para os prótons fenílicos (Pavia *et al.*, 2010).

A molécula MAC-03 apresentou, além dos deslocamentos comuns para todas as moléculas, sinal de multipletos em 7,66 ppm e 7,70 ppm, ambos com integral para dois hidrogênios. Esses sinais são característicos para os hidrogênios presente no seu anel fenil, uma vez que, o átomo de flúor presente no mesmo é capaz de acoplar com os hidrogênios gerando multipletos. Desse modo, o sinal em 7,70 ppm foi atribuído aos hidrogênios próximos ao átomo de flúor, e o sinal em 7,66 ppm, aos hidrogênios mais distantes. O deslocamento químico aumenta com a eletronegatividade do halogênio, sendo o maior deslocamento encontrado em compostos contendo flúor. Por essa razão os hidrogênios do anel fenil da molécula MAC-03 são mais desblindados que os da molécula clorada MAC-02 (Pavia *et al.*, 2010).

A molécula diclorada MAC-07, apresentou um multipletos com integral para quatro hidrogênios com deslocamento químico de 7,74 ppm, característico para os hidrogênios da posição 5 e 6 do anel fenil, indicando a presença de diastereoisômeros, uma vez que era esperado integral para apenas dois hidrogênios. Também foi observado que o simpleto na região de 9.83 ppm característico do próton do grupamento imina da série MAC, foi revelado com sinais em 9,84 e 9,83, apesar de apresentar integral para um hidrogênio, reforçando a presença dos diastereoisômeros *Z* e *E* da molécula MAC-07. Adicionalmente, um duplo dubleto com integral para um hidrogênio foi observado em 7.61 ppm, característico para o hidrogênio entre os átomos de cloro (Pavia *et al.*, 2010).

Um simpleto largo com deslocamento químico em 7,87 ppm, com integral para 2 hidrogênios foi observado para a molécula ACHZ conforme figura 28, sendo característico dos prótons do grupamento -N-NH₂. O deslocamento químico dos hidrogênios ligados a nitrogênio é bastante variável, encontrando-se principalmente na faixa de 0,5-4,0 ppm, Entretanto, os prótons do grupamento -N-NH₂, sofrem o efeito da eletronegatividade do nitrogênio ao qual estão ligados e também do nitrogênio vizinho, além de poder fazer parte da ressonância presente na estrutura em questão, tornando os mesmos mais desblindados (Pavia *et al.*, 2010).

Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da molécula ACHZ



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A molécula ACHZ-BE, apresentou sinais característicos para o anel fenil. Um deles, foi o triplo dubleto em 7,59 ppm, correspondentes ao próton das posições *meta* e *para*, que corresponde aos hidrogênios da região menos desblindada da molécula e por isso foi o sinal mais protegido. O outro, foi o duplo dubleto dobrado em 7,92 ppm, correspondente aos prótons da posição *orto*, que se tornam mais desblindados devido ao efeito mesomérico negativo exercido pela imina. Para a molécula clorada ACHZ-CB, foram observados dois dubletos, com integral para dois hidrogênios cada, acoplando com $J = 8,5$ Hz, um com deslocamento de 7,65 ppm e outro 8,24 ppm. O dubleto mais desblindado corresponde aos prótons da posição *orto* do anel fenil, isso se dá porque os prótons em questão estão sofrendo o efeito da eletronegatividade do átomo de cloro e também do átomo de nitrogênio. O dubleto em 7,65 ppm correspondem aos prótons da posição *meta* (Pavia *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados, também estavam de acordo com o esperado e permitiram elucidar as estruturas analisadas, e estão expostos na tabela 17, para a série fenilmetanimina (MAC) e tabela 18, para série diazenilacridina (ACHZ).

Tabela 17 - Resultados da análise por RMN de ^{13}C dos novos derivados acridínicos da série fenilmetanimina (MAC)

Compostos	RMN de ^{13}C (valores em ppm)
MAC-01	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 55.09 (C-H, metoxila), 115.06 (C-H, fenil), 123.56 (C-H, fenil), 124.08 (Cq, acridina), 126.05 (C-H, acridina), 127.54 (C-H, acridina), 130.15 (C-H, acridina), 130.76 (C-H, acridina), 137.30 (Cq, acridina adjacente a imina), 144.51 (Cq, fenil), 148.90 (C-N, acridina), 156.37 (C-O, fenil), 159.44 (C=N, imina)
MAC-02	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 123.77 (C-H, fenil), 124.00 (Cq, acridina), 125.92 (C-H, acridina), 127.76 (C-H, acridina), 129.76 (C-H, fenil), 130.17 (C-H, acridina), 130.83 (C-H, acridina), 131.92 (C-Cl, fenil), 136.69 (Cq, acridina, adjacente a imina), 148.86 (C-N, acridina), 150.45 (C-N, fenil), 160.16 (C=N, imina)
MAC-03	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 116.60 e 116.45 (C-C-F), 123.95 e 123.90 (C-C-C-F), 124.01 (Cq, acridina), 125.95 (C-H, acridina), 127.67 (C-H, acridina), 130.15 (C-H, acridina), 130.79 (C-H, acridina), 136.89 (Cq, acridina, adjacente a imina), 148.00 (C-N, fenil), 148.86 (C=N, acridina), 159.51 (C=N, imina), 162.59 e 160.97 (C-F), 148.85 (C=N, acridina),
MAC-07	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 122.51 (C-H, fenil), 123.97 (Cq, acridina), 125.85 (C-H, acridina), 127.98 (C-H, acridina), 128.91 (C-H, fenil), 129.15 (C-Cl, fenil), 129.70 (C-H, fenil, entre os Cl), 130.21 (C-H, acridina), 30.88 (C-H, acridina), 131.87 (C-Cl, fenil, posição para), 136.07 (Cq, acridina), 148.15 (C-N, fenil), 162.50 (C=N, imina)
MAC-08	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 121.84 (C-H, fenil), 123.99 (C-H, fenil), 125,89 (Cq, acridina), 127,55 (C-H, acridina), 127,67 (C-H, acridina), 129,85 (C-H, acridina), 130,14 (C-H, acridina), 130,78 (Cq, acridina adjacente a imina), 136,98 (Cq, fenil), 148,86 (C-N, acridina), 152,74 (C=N, imina),

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 18 - Resultados da análise por RMN de ^{13}C dos novos derivados acridínicos da série diazenilacridina (ACHZ)

Compostos	RMN de ^{13}C (valores em ppm)
ACHZ	RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO) δ 123.34 (Cq, acridina), 126.22 (C-H, acridina), 126.34 (C-H, acridina), 130.04 (C-H, acridina), 130.35 (C-H, acridina), 133.50 (Cq, acridina adjacente a imina), 137.34 (C=N, imina), 148,91 (Cq, C-N acridina)
ACHZ-CB	RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO) δ 124.02 (Cq, acridina), 125.93 (C-H, acridina), 127.82 (C-H, acridina), 129.67 (C-H, fenil), 130.21 (C-H, acridina), 130.87 (C-H, fenil adjacente ao C ligado ao Cl), 132.87 (Cq, fenil), δ 134.91 (Cq, acridina adjacente a imina), 136.90 (C-Cl, fenil), 148,75 (Cq, C-N acridina), 159.11 (C=N, adjacente a acridina), 162.02 (C=N, adjacente ao fenil)
ACHZ-BE	RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO) δ 124.07 (Cq, acridina), 125.96 (C-H, acridina), 127.77 (C-H, acridina), 129.23 (C-H, fenil), 129.50 (C-H, fenil), 130.23 (C-H, acridina), 130.85 (Cq, fenil), 132.31 (C-H, fenil), 134.00 (C-H, fenil adjacente a imina), 135.01 (Cq, acridina adjacente a imina), 148,80 (Cq, C-N acridina), 158.69 (C=N, adjacente a acridina), 1623.06 (C=N, adjacente ao fenil)

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Por apresentar o núcleo acridínico em comum, todos os compostos sintetizados apresentaram sinais com deslocamento químico bastante semelhantes variando entre 123,24 – 148,91 ppm. Esses sinais apresentaram semelhanças de deslocamento químico e intensidade entre as moléculas obtidas e também com os núcleos AC-01 e AC-02 (Pavia *et al.*, 2010).

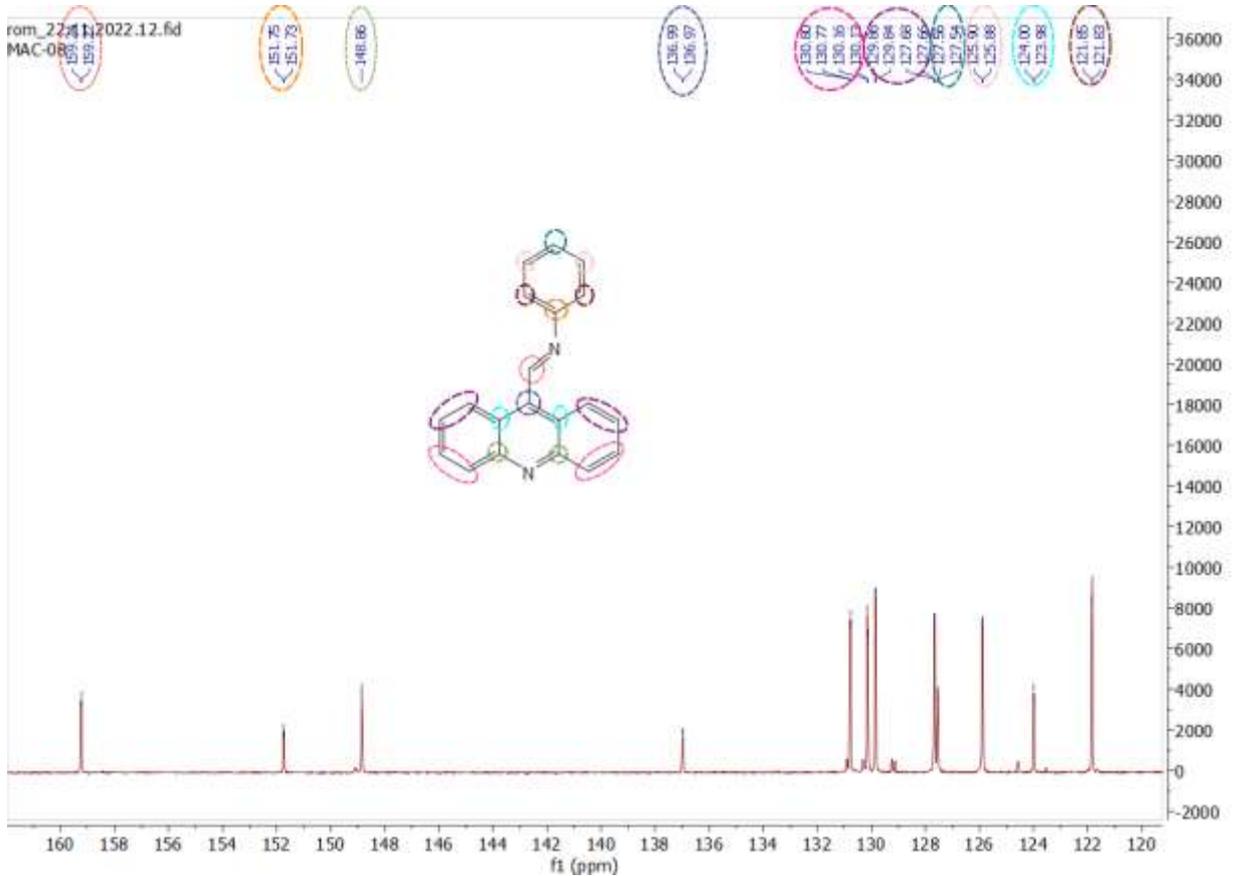
Como as moléculas obtidas também apresentam em sua estrutura carbonos aromáticos da porção fenil, com exceção do intermediário ACHZ, outros sinais foram observados na faixa correspondente a carbonos aromáticos que de 110 á 175 ppm. Estes serão discutidos mais detalhadamente para cada molécula obtida (Pavia *et al.*, 2010).

Outro ponto comum entre as moléculas é o carbono imínico (C=N), que além de estar diretamente ligado a um átomo eletronegativo por uma ligação do tipo sp^2 , está diretamente ligado ao núcleo acridínico ou aos anéis fenilas, na série ACHZ. Desse modo, o carbono imínico encontra-se, afetado por efeitos de eletronegatividade, hibridização e anisotropia, apresentando deslocamento químico entre 137,34 e 162,50 ppm (Pavia *et al.*, 2010).

Na figura 29, se encontra o espectro aproximado de RMN de ^{13}C da molécula MAC-08, sendo possível observar os deslocamentos químicos característicos para os carbonos presentes em sua estrutura, assim como discutido anteriormente. Também é possível notar que os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos se encontram duplicados e possuem o mesmo tamanho, podendo significar a ocorrência dos diastereoisômeros (Z) e (E), como demonstrados

anteriormente na figura 26. Situação semelhante foi observada no trabalho de Gama (2015), o qual, através de uma análise mais detalhada, aferiu a uma mistura diastereosseletiva de (dr 1:1).

Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula MAC-08



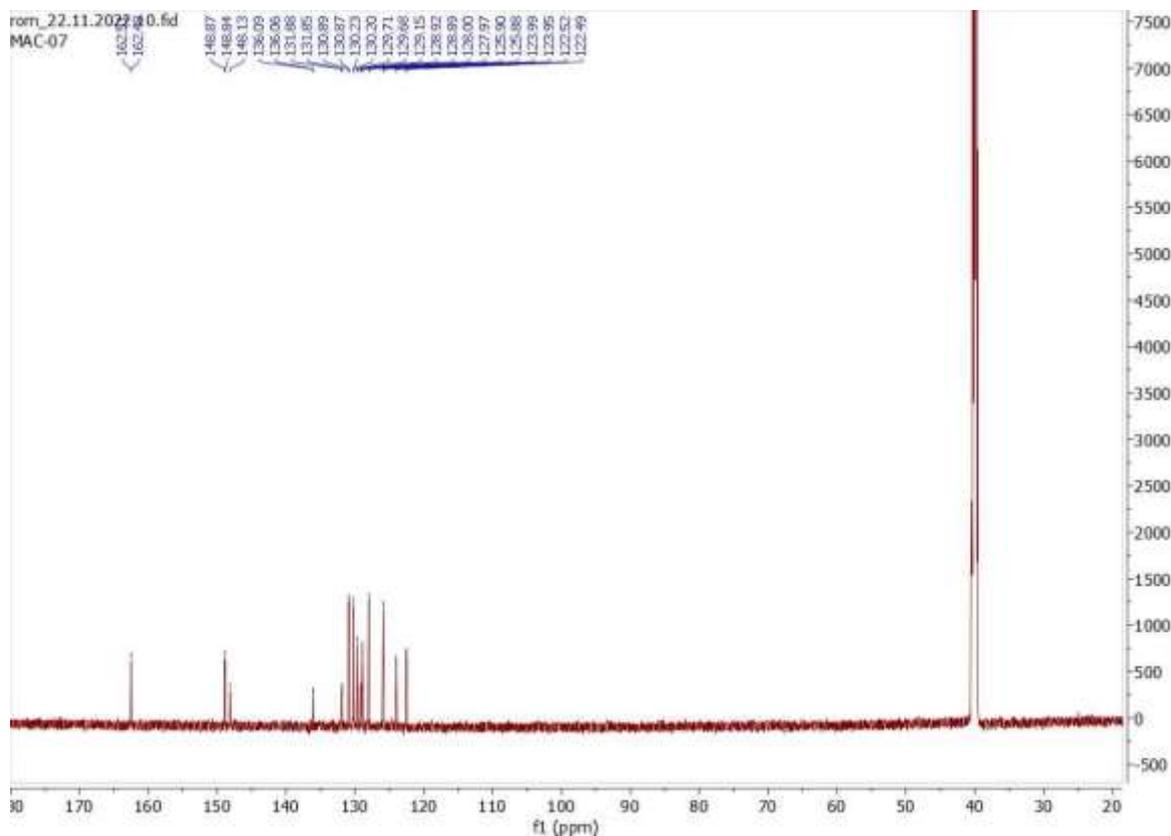
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Para assimilar os carbonos aromáticos ligados aos heteroátomos (Cl e F), considerou-se que devido ao efeito da eletronegatividade os mesmos estariam em regiões mais desblindadas do espectro que os carbonos aromáticos não ligados a heteroátomos, bem como, também foi levado em consideração o efeito nuclear Overhauser (NOE), que aponta que átomos de carbono com átomos de hidrogênio diretamente ligados são mais intensificados, havendo um aumento à medida que mais hidrogênios estiverem ligados (Pavia *et al.*, 2010).

Para a molécula MAC-01, foi possível observar um sinal com deslocamento químico de 55,09 ppm, característico do C-H da metoxila. Para MAC-02, um sinal em região mais desblindada do espectro foi observado em 131,92 ppm, correspondente ao C-Cl do anel fenil. A molécula diclorada MAC-07, apresentou os sinais correspondentes aos carbonos ligados diretamente aos cloros em 131,87 e 129,15 ppm e semelhante a molécula MAC-08, apresentou

os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos duplicados e com mesmo tamanho (figura 30), indicando a ocorrência dos diastereoisômeros (Z) e (E) (Pavia *et al.*, 2010).

Figura 30 -Espectro de RMN de ^{13}C da molécula MAC-07



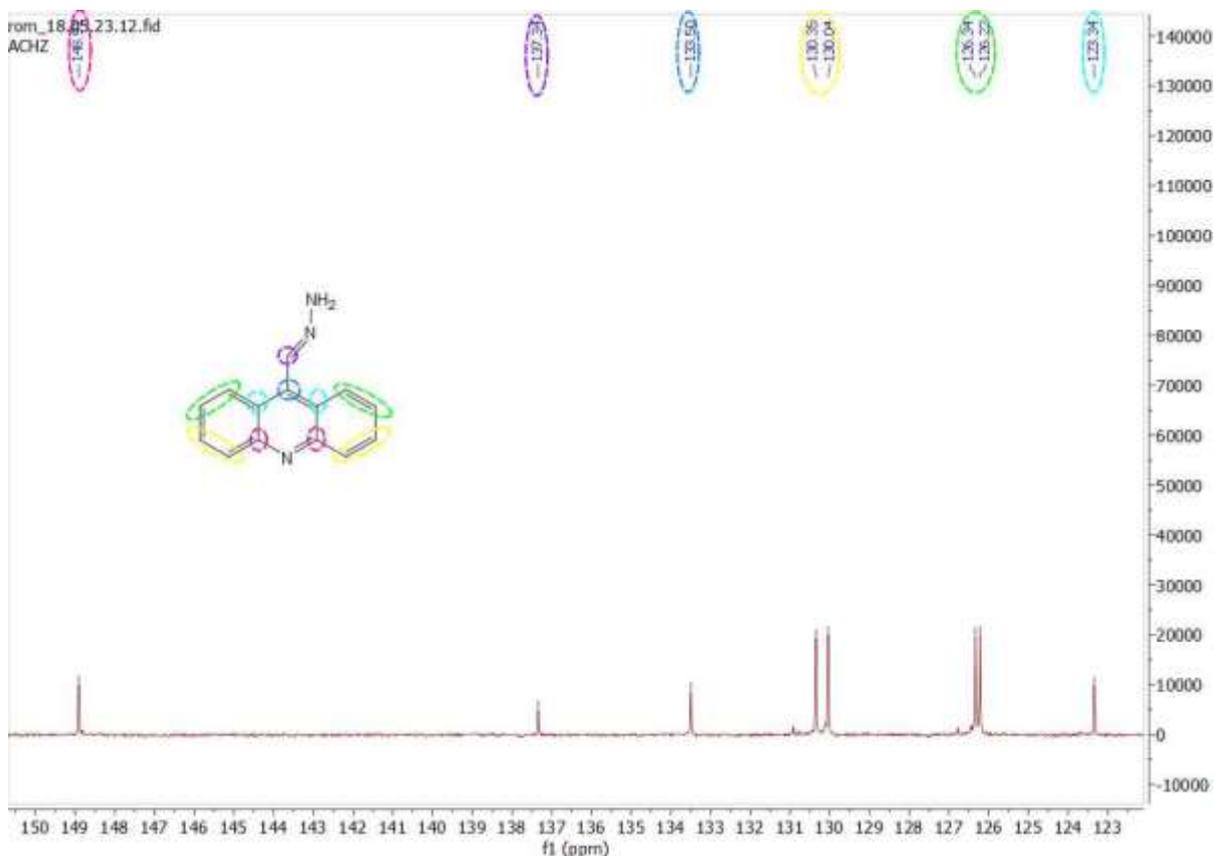
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os carbonos ligados à hidrogênios no anel fenil da molécula MAC-03 apresentaram sinais com dois deslocamentos químicos diferentes, cada um: 162,59 e 160,97 (C-F), 116,60 e 116,45 ppm (CH-C-F), 123,95 e 123,90 (CH-CH-C-F). Isso pode ser justificado devido ao acoplamento heteronuclear ^{13}C - ^{19}F que gera o sinal na forma de dubleto e ocorre quando um átomo de carbono está ligado diretamente ao átomo de flúor, ou a até quatro ligações de distância (no caso de anéis aromáticos). Os carbonos em *orto* no anel fenil, se encontram mais desblindados, pois sofrem influência do F por três ligações de distância e também experimentam o efeito da eletronegatividade do átomo de N da imina (Pavia *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de ^{13}C do intermediário ACHZ, pode ser observado na figura 31. Como discutido anteriormente sobre o efeito NOE, os sinais mais intensificados foram atribuídos aos carbonos ligados a hidrogênios, variando entre 126,22 até 130,35 ppm. O sinal com deslocamento químico em 148,87 é característico para os carbonos quaternários ligados ao N do núcleo acridínico. Os sinais em 133,50 e 123,34 ppm, também são característicos para

carbonos quaternários do núcleo acridínico, o de maior deslocamento corresponde ao Cq via duas ligações do nitrogênio imínico. De tal modo, o sinal com deslocamento químico de 137,34 corresponde ao carbono imínico (C=N), sendo crucial para confirmação da estrutura do derivado apresentado (Pavia *et al.*, 2010).

Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C do intermediário ACHZ



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

O derivado ACHZ-BE, além dos sinais característicos apresentados por seu intermediário ACHZ, apresentou dois sinais diagnósticos em 158,69 e 163,6 ppm na região mais desprotegida do espectro e com intensidade menor, correspondendo aos dois carbonos imínicos presentes em sua estrutura. Também foram observados outros quatro sinais que não estavam presentes no intermediário ACHZ, com deslocamento químico de 129,23, 129,50, 134,00 e 132,31 ppm, correspondentes aos carbonos do anel fenil (Pavia *et al.*, 2010).

Para o derivado com átomo de cloro no anel fenil, ACHZ-CB, foi também observado dois sinais em 159,11 e 162,02 ppm na região mais desprotegida do espectro e com intensidade menor, correspondendo aos dois carbonos imínicos presentes em sua estrutura. Semelhante a molécula anterior, quatro sinais com deslocamento químico de 129,67, 130,87, 132,87 e

136,90 ppm, correspondentes aos carbonos do anel fenil. Neste caso, o deslocamento em 136,90 ppm corresponde ao carbono ligado diretamente ao átomo de cloro e por isto se encontra mais desblindado que aquele observado para ACHZ-BE (Pavia *et al.*, 2010).

5.6 Estudo de interação com DNA

Para prever um possível mecanismo de ação anticâncer, titulações espectrofotométricas em tampão aquoso (Tris-HCl, pH 7,6) foram usadas para estudar a interação das moléculas (20 μ M) obtidas com ssDNA. Os espectros de absorção dos compostos apresentaram bandas de absorção na região de 300 nm, conforme observado na tabela 19. Os diferentes substituintes presentes nos compostos MAC-01 a MAC-07 induziram desvios para o vermelho nos espectros UV-Vis em relação ao MAC-08 (não substituída no anel fenil). O substituinte cloro presente na molécula ACHZ-CB induziu desvio para o azul nos espectros UV-Vis em relação a molécula ACHZ-BE (não substituída no anel fenil).

Tabela 19 - Dados de absorção UV-Vis para os novos derivados acridínicos na ausência e presença de ssDNA

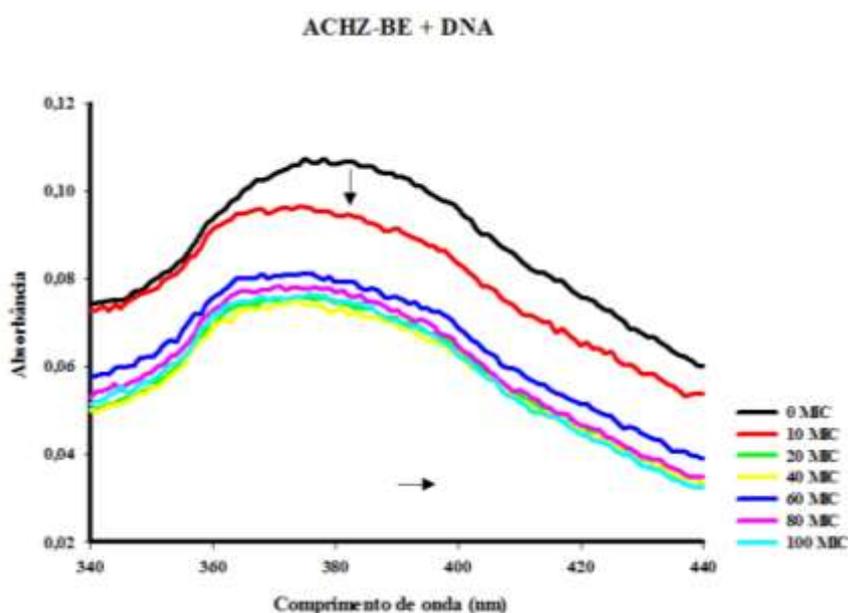
COMPOSTO	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hiper cromismo (%)	Hipo cromismo (%)	K_b (M^{-1})	R^2
ACHZ-BE	378	373	05	-	45,27	$9,03 \times 10^4$	0,9954
ACHZ-CB	367	366	01	11,56	-	$3,27 \times 10^4$	0,9900
MAC-01	363	362	01	20,46	-	$9,78 \times 10^4$	0,9916
MAC-02	372	371	01	12,50	-	$1,92 \times 10^5$	0,9980
MAC-03	363	362	01	6,42	-	$2,57 \times 10^4$	0,9955
MAC-07	364	367	03	11,41	-	$7,04 \times 10^4$	0,9975
MAC-08	362	364	02	6,02	-	$5,46 \times 10^4$	0,9921

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Quando um compostos é capaz de se ligar ao DNA, suas curvas UV-Vis resultam em uma mudança característica do comprimento de onda máximo de absorção (deslocamento batocrômico ou hipsocrômico), uma diminuição (hipocromicidade) ou aumento

(hipercromicidade) da absorvância (Almeida *et al.*, 2015). A molécula ACHZ-BE foi a única que apresentou hipercromicidade significativa (45,27 %) e maior efeito batocrômico ($\Delta\lambda$ 5 nm), quando comparado as demais moléculas analisadas, seu espectro de absorção (μM) tanto na ausência quanto na presença de ssDNA (0–100 μM) estão expostos na figura 32. As moléculas MAC-01 a 08 e ACHZ-CB apresentaram sutis efeitos hipsocrômicos e hipocromismo variando de 6,02 até 20,46 %, conforme demonstrado na tabela 19.

Figura 32 - Espectros de absorção do derivado ACHZ-BE (20 μM) com concentrações crescentes de ssDNA



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM . As setas (↓) e (→) referem-se aos efeitos hipsocrômico e batocrômico, respectivamente. Inserção: Gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ como função da concentração de DNA conforme determinado a partir dos dados espectrais de absorção.

O hipocromismo é preditivo de que ocorre intercalação dos compostos nos pares de bases do DNA, onde os orbitais π dos compostos intercalados são capazes de se acoplar com os orbitais π dos pares de bases, diminuindo assim as energias de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (Ali *et al.*, 2014; Senthil Raja; Bhuvanesh; Natarajan, K., 2012).

Observa-se que as moléculas obtidas apresentaram capacidade e interação com DNA inferior a molécula protótipo 3a, que promoveu nos estudos *in vitro* com DNA hipercromicidade de 92,58% e um leve desvio batocrômico ($\Delta\lambda$ 6 nm) segundo exposto no trabalho de Almeida *et al.* (2015), divergindo dos estudos *in silico* nos alvos de DNA, onde as mesmas apresentaram atividade comparável ou superior a 3a. Entretanto, aqui, as moléculas foram testadas na concentração de 20 μM e 3a foi avaliada nos estudos anteriores na

concentração de 50 μM , não podendo de fato aferir resultado inferior para as moléculas sintetizadas.

A partir dos dados espectrofotométricos, foram estimadas as constantes de ligação (K_b). Conforme demonstrado na tabela 19, as moléculas se ligam ao ssDNA com $K_b = 10^4$ ou 10^5 M^{-1} , que corresponde a faixas típicas para complexos de intercalação entre corantes e DNA (10^4 a 10^6 M^{-1}) (Ihmels; Otto, 2005). Esses valores de K_b , também são semelhantes aos observados para a molécula 3a testada na concentração 50 μM ($K_b = 3.77 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) e para amsacrina ($K_b = 1,2 \pm 0,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Almeida *et al.*, 2015).

Se considerarmos os valores de K_b e as mudanças observadas nos comprimentos de onda e absorção descritos na literatura para o protótipo 3a e a amsacrina descritos anteriormente, as moléculas sintetizadas aparentam ter potencial de intercalação com o DNA inferior as de referência, divergindo um pouco dos resultados obtidos nos estudos *in silico*, onde as moléculas sintetizadas apresentaram atividade superior aos compostos citados no alvo DNA preditivo de intercalação. Entretanto, os resultados foram obtidos por testes diferentes, onde 3a e a amsacrina foram testadas em concentrações diferentes das moléculas sintetizadas, além disso, a análise de *docking* molecular não considera alguns parâmetros fundamentais para o êxito em estudos *in vitro*, a exemplo da solubilidade das moléculas.

De modo geral, as moléculas demonstraram ser capazes de interagir com o DNA, assim como observado nos estudos de *docking* molecular, indicando que este pode ser um mecanismo de ação antitumoral desempenhado pelas mesmas. Portanto, para avaliar o potencial antitumoral dos compostos, estes foram avaliados frente linhagens de células tumorais humanas.

5.7 Estudo de interação com HSA

Para avaliar a interação das moléculas obtidas com a albumina sérica humana (HSA), foi realizado o ensaio experimental de absorção UV-Vis. Conforme exposto na tabela 17, a HSA mostrou absorção na região de 279 nm, resultado da transição $\pi-\pi^*$ dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) (Poureshghi *et al.*, 2017). Após ser submetida à interação com as moléculas, a absorção ocorreu entre 277 nm e 279 nm e ocorreram outras alterações espectrais que serão melhor discutidas a seguir. A constante de ligação (K_b) também foi avaliada e se apresentou na faixa de 10^5 (tabela 20), indicando interação entre HSA e as moléculas avaliadas, uma vez que, drogas são acomodadas na HSA em magnitudes na faixa de 10^4-10^6 M^{-1} . Também é possível inferir que as diferenças nas constantes de ligação indicam que as moléculas interagem com HSA de maneiras diferentes (Rabbani *et al.*, 2017).

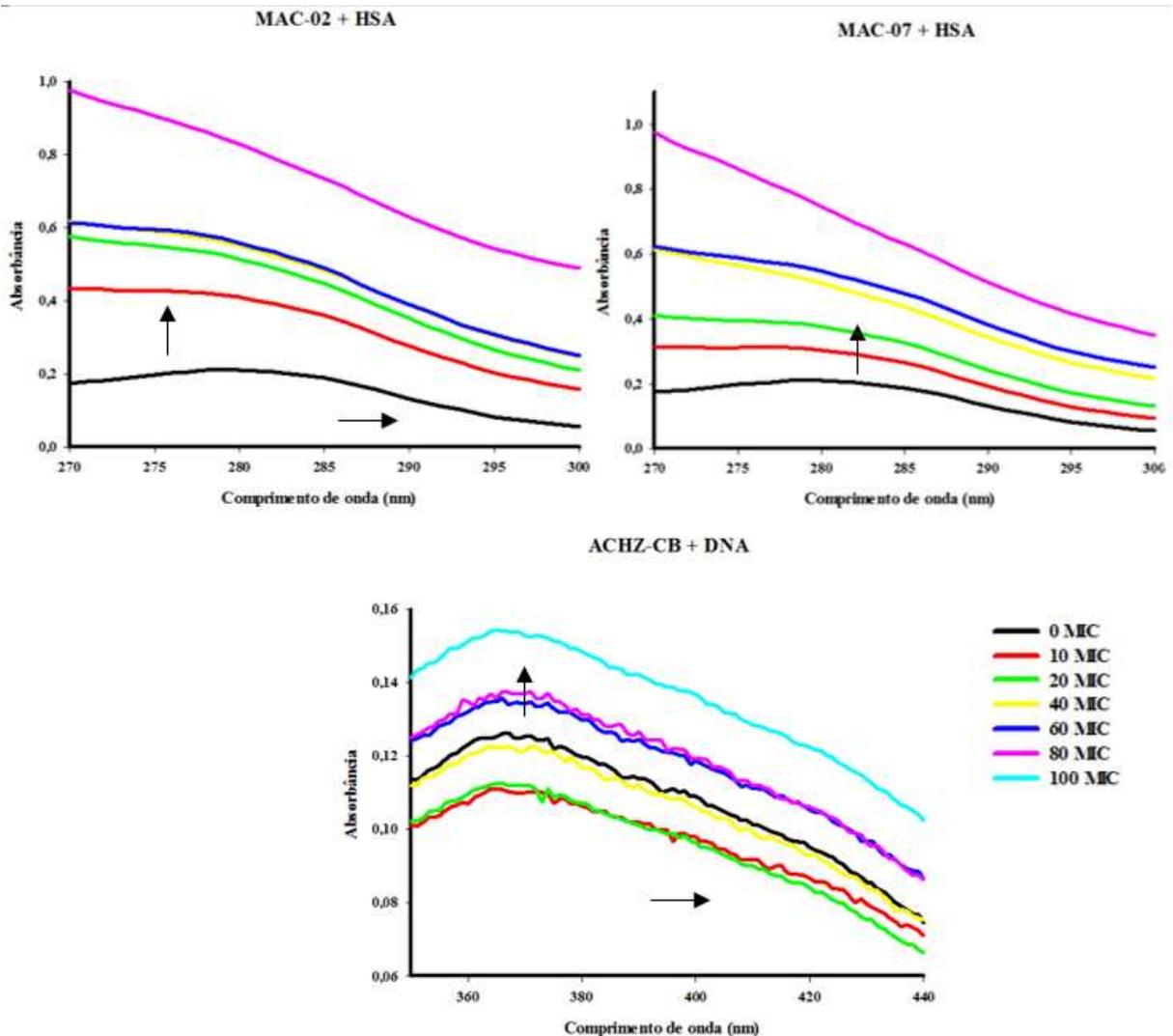
Tabela 20 - Dados de absorção UV-Vis para HSA livre e ligada aos novos derivados acridínicos

COMPOSTO	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hiper cromismo (%)	K_b (M^{-1})	R^2
ACHZ-BE	279	279	-	44,33	$2,10 \times 10^5$	0,9908
ACHZ-CB	279	277	02	59,81	$3,34 \times 10^5$	0,9934
MAC-01	279	278	01	30,70	$1,61 \times 10^5$	0,9975
MAC-02	279	278	01	62,76	$1,87 \times 10^5$	0,9879
MAC-03	279	278	01	40,18	$2,00 \times 10^5$	0,9904
MAC-07	279	279	-	61,95	$2,81 \times 10^5$	0,9920
MAC-08	279	279	-	38,68	$1,59 \times 10^5$	0,9933

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A ligação das moléculas a HSA ocasionou efeito hiperacrômico, caracterizado pelo aumento da absorção eletrônica, com percentuais variando entre 30,70 e 62,76 %. O maior deslocamento hiperacrômico foi observado para a molécula MAC-02 (62,76 %), seguida por MAC-07 (61,95 %) e ACHZ-CB (59,81%), apresentadas na figura 33. Adicionalmente foi observado efeito batocrômico ($\Delta\lambda$ 1 nm) para as moléculas MAC-01 á 03 e ($\Delta\lambda$ 2 nm) para ACHZ-CB. Tais mudanças espectrais são características para formação do complexo HSA-moléculas (Aseman *et al.*, 2019; Zhu, Meiqing *et al.*, 2018).

Figura 33 - Espectros de absorção UV-vis de HSA na ausência e presença de MAC-02, MAC-07, ACHZ-CB



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: As setas (↑) e (→) referem-se aos efeitos hipercrômico e batcrômico, respectivamente.

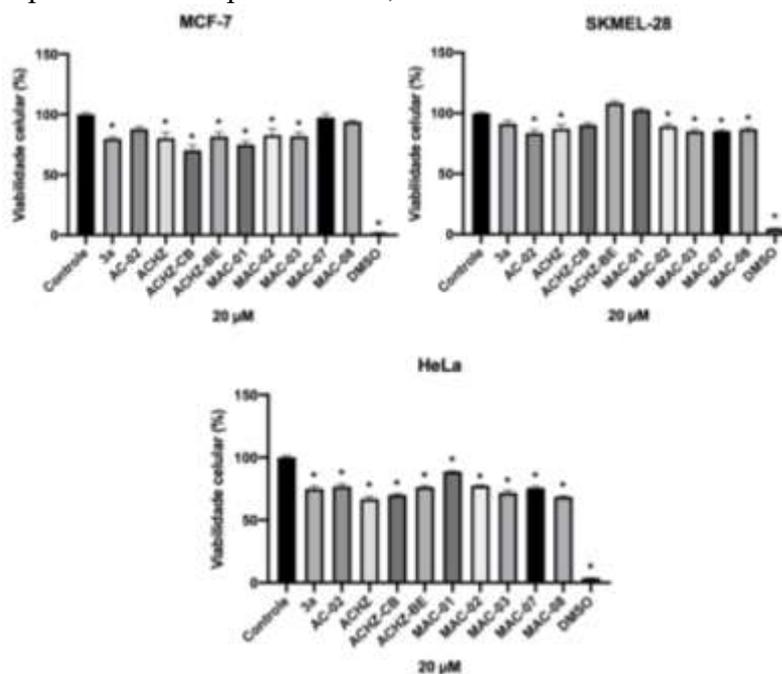
Segundo a literatura, a albumina sérica humana tem afinidade por compostos lipofílicos e como observado nos estudos farmacocinéticos *in silico* por meio do $\text{Log } P_{0/w}$, WLogP e MLogP , as moléculas cloradas MAC-02, MAC-07 e ACHZ-CB apresentaram lipofilicidade mais acentuada que as demais (Aguilera-Garrido *et al.*, 2021). Entretanto, a lipofilicidade não é o único fator determinante para interação com a HSA, interações hidrofóbicas e ligações iônicas também demonstram ser importantes para esse processo (Chrysanthakopoulos; Giaginis; Tsantili-Kakoulidou, 2010). Desse modo, se faz necessário a realização de estudos adicionais de *docking* molecular para compreender melhor a forma de interação destas moléculas com a HSA, especialmente a influência do átomo de cloro.

Como discutido anteriormente no referencial teórico, a capacidade de interação com HSA demonstra ser uma propriedade importante para fármacos, principalmente anticâncer, uma vez que, além da albumina sérica humana estar diretamente correlacionada com fatores farmacocinéticos, sua maior expressão em células cancerígenas a torna interessante para aplicação como um sistema transportador.

5.8 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

Para avaliação da citotoxicidade *in vitro* das moléculas obtidas, foi utilizado o ensaio de MTT, que permite mensurar a viabilidade celular por meio da reação de redução do composto de tetrazólio em cristais de formazan insolúveis em água, que ocorre nas mitocôndrias de células vivas (Tonder, Van; Joubert; Cromarty, 2015). No intuito de avaliar o potencial das estratégias de modificações moleculares aplicadas para as moléculas, bem como compreender a possível importância da porção tioamida, a molécula protótipo 3a e a molécula de partida AC-02, foram testadas juntamente com as novas moléculas obtidas na concentração de 20 μ M, cujos resultados podem ser visualizados na figura 34.

Figura 34 - Citotoxicidade das moléculas sintetizadas (20 μ M) nas linhagens MCF-7, SKMEL-28 e HeLa após tratamento por 72 horas, utilizando o ensaio do MTT



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer cervical), SKMEL-28 (melanoma humano). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Conforme observado na figura 34, todas as moléculas sintetizadas promoveram redução significativa da viabilidade celular em células de câncer cervical (HeLa). Já nas linhagens de câncer de mama (MCF-07) e melanoma humano (SKMEL-28), nem todas apresentaram essa capacidade. Na tabela 21, está exposto o percentual de viabilidade celular das linhagens tumorais após tratamento com as moléculas sintetizadas, sendo possível notar que a atividade dos mesmos na linhagem MCF-7 e SKMEL-28 é pequena, com no máximo 29,74 % (ACHZ-CB – MCF-7) e 14,93 % (MAC-03 -SKMEL-28) de redução da viabilidade celular, apesar de serem estatisticamente significativas quando comparadas às células sem tratamento, como demonstrado na figura 34. Para a linhagem de câncer cervical, HeLa, os percentuais de inibição foram relativamente melhores, variando de 11,32 % a 33,2 %.

Tabela 21 - Percentual de viabilidade celular das linhagens tumorais após tratamento por 72 horas de tratamento

Amostra	Viabilidade celular (%) \pm E.P.M.		
	MCF-7	SK-MEL-28	HeLa
Controle	99,97 \pm 1,36	100,0 \pm 0,73	100,0 \pm 1,48
3 a	79,80* \pm 1,68	91,29 \pm 2,71	74,89* \pm 2,14
AC-02	87,77 \pm 2,03	83,61* \pm 2,86	76,79* \pm 2,25
ACHZ	80,28* \pm 4,64	87,13* \pm 3,59	66,80* \pm 1,84
ACHZ-CB	70,26* \pm 4,28	90,37 \pm 1,70	70,09* \pm 0,95
ACHZ-BE	81,66* \pm 3,90	108,3 \pm 1,77	76,33* \pm 1,13
MAC-01	74,98* \pm 2,84	102,7 \pm 1,50	88,68* \pm 0,46
MAC-02	82,64* \pm 5,46	88,94* \pm 2,27	77,48* \pm 0,49
MAC-03	81,94* \pm 3,27	85,07* \pm 1,74	71,63* \pm 2,03
MAC-07	97,45 \pm 3,31	85,30* \pm 0,98	75,61* \pm 1,22
MAC-08	93,92 \pm 1,50	86,80* \pm 1,40	68,59* \pm 0,78
DMSO	1,982* \pm 0,07	4,86* \pm 0,04	3,56* \pm 0,11

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer cervical), SKMEL-28 (melanoma humano). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

As moléculas obtidas apresentaram percentuais de inibição semelhantes a molécula 3a e a molécula de partida AC-02, para as três linhagens testadas. Aparentemente, a remoção da porção tioamida presente na estrutura química de 3a, não influenciou negativamente ou positivamente na atividade citotóxica das novas moléculas obtidas, frente as linhagens testadas.

A molécula 3a não demonstrou promissora atividade citotóxica nos testes realizados em nosso trabalho, entretanto, ela havia sido previamente avaliada quanto a sua citotoxicidade por Almeida *et al.* (2015) utilizando ensaio de sulforrodamina B, no qual demonstrou GI_{50} de 6.85 μ M (controles: doxorubicina: 0.036 μ M e amsacrina: 0.23 μ M), além de atividade citotóxica com concentração inferior a 10 μ M frente outras linhagens tumorais não avaliadas para as moléculas obtidas neste trabalho.

A molécula clorada ACHZ-CB, uma das mais ativa no estudo de *docking* molecular no alvo topo II α , foi também a mais ativa *in vitro* para a linhagem celular MCF-7, e a terceira mais ativa para a linhagem HeLa. Células de linhagens tumorais HeLa e MCF-7 são descritas na literatura por apresentar maior expressão de topoisomerase I e II α , respectivamente (Heestand *et al.*, 2017). Esse achado, enfatiza a importância da realização de estudos *in silico* em Topoisomerase I e *in vitro* da inibição de topoisomerasas I e II para reconhecimento de possível mecanismo de ação das moléculas sintetizadas, especialmente ACHZ-CB.

É possível inferir que, apesar das moléculas sintetizadas não demonstrarem proeminente atividade citotóxica frente as linhagens tumorais MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer cervical) e SKMEL-28 (melanoma humano), elas podem ser ativas com melhor perfil de inibição para outras linhagens tumorais, especialmente aquelas cuja inibição de topoisomerase está associada a mecanismo de morte celular, como no caso de câncer colorretal. Até porque, 3a e outros derivados acridínicos com relativa semelhança estrutural às moléculas sintetizadas são descritos por sua citotoxicidade *in vitro* frente variadas linhagens tumorais.

Outro ponto a ser considerado é o tipo de ensaio utilizado, sendo interessante a avaliação da citotoxicidade por exemplo, pelo ensaio de sulforrodamina B previamente realizado para 3a, no qual a mesma teve melhor desenvoltura. Além disso, é importante que sejam realizados testes da citotoxicidade frente diferentes linhagens de células humanas normais, para então avaliar a toxicidade e seletividade dos compostos da série diazenilacridina (ACHZ) e fenilmetanimina (MAC).

5.9 *Docking* molecular para avaliação de possível mecanismo de ação

Quando realizado o teste de citotoxicidade *in vitro*, se observou que as moléculas, especialmente ACHZ, MAC-08 e ACHZ-CB, apresentaram percentual de inibição ligeiramente melhor para a linhagem tumoral de câncer cervical (HeLa), descrita na literatura por apresentar expressão aumentada de topoisomerase I. Partindo dessa premissa, decidimos realizar o *docking*

molecular das moléculas sintetizadas com o alvo Topoisomerase I complexada com o DNA (PDB ID:1K4T), para avaliação complementar de possível mecanismo de ação antitumoral.

Como ligantes de referência foram utilizados os fármacos topotecano (ligante co-cristalizado) e SN-38, metabólito ativo do irinotecano (inibidor topo I). A molécula 3a também foi utilizada para comparação dos resultados e avaliação das estratégias de desenvolvimento aplicadas às moléculas sintetizadas. Para validação do método utilizado, foi realizado o *redocking* com o ligante co-cristalizado topotecano, conforme visualizado na figura 35, obtendo o valor do RMSD de 0.77 Å, sendo 2.0 Å o valor máximo desejável, como descrito anteriormente.

Figura 35 - *Redocking* com ligante co-cristalizado topotecano



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Após a validação do método, foi realizado o *docking* para as novas moléculas planejadas, cujos resultados estão expostos na tabela 22. Considerando os valores de energia livre de ligação (ΔG) e constante de inibição estimada (K_i), podemos notar que todos os compostos avaliados são capazes de interagir com o alvo topoisomerase I, mesmo que, em proporções diferentes. A molécula ACHZ apresentou valor de ΔG relativamente menor que as demais moléculas, contrapondo o esperado, uma vez que, ela foi a mais ativa nos estudos de citotoxicidade *in vitro* frente a células tumorais HeLa. Porém, é importante destacar que entre as limitações apresentadas pelo *docking* molecular, está a aparente inadequação do método quando se trabalha com moléculas de tamanho e flexibilidades variadas, onde moléculas estruturalmente maiores tem resultado favorecidos em comparação com moléculas menores (Boittier *et al.*, 2020). Esse poderia ser o motivo da desenvoltura de ACHZ ser menor que a das demais moléculas, já que as demais são maiores e apresentam tamanhos relativamente semelhantes.

Tabela 22 - Resultados do *docking* molecular frente ao alvo topoisomerase I complexada com o DNA (PDB ID: 5K4T)

MOLÉCULA	Energia Livre de Ligação (ΔG) (kcal mol ⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
Topotecano	-8,70	494,08
SN-38	-7,4	3740,00
3 a	-7,41	3690,00
MAC-01	-6,69	7580,00
MAC-02	-6,95	8050,00
MAC-03	-6,31	23600,00
MAC-07 (E)	-7,75	2080,00
MAC-07 (Z)	-7,04	6880,00
MAC-08 (E)	-6,63	13750,00
MAC-08 (Z)	-6,44	19090,00
ACHZ	-5,60	78160,00
ACHZ-BE	-7,74	1610,00
ACHZ-CB	-7,90	2120,00

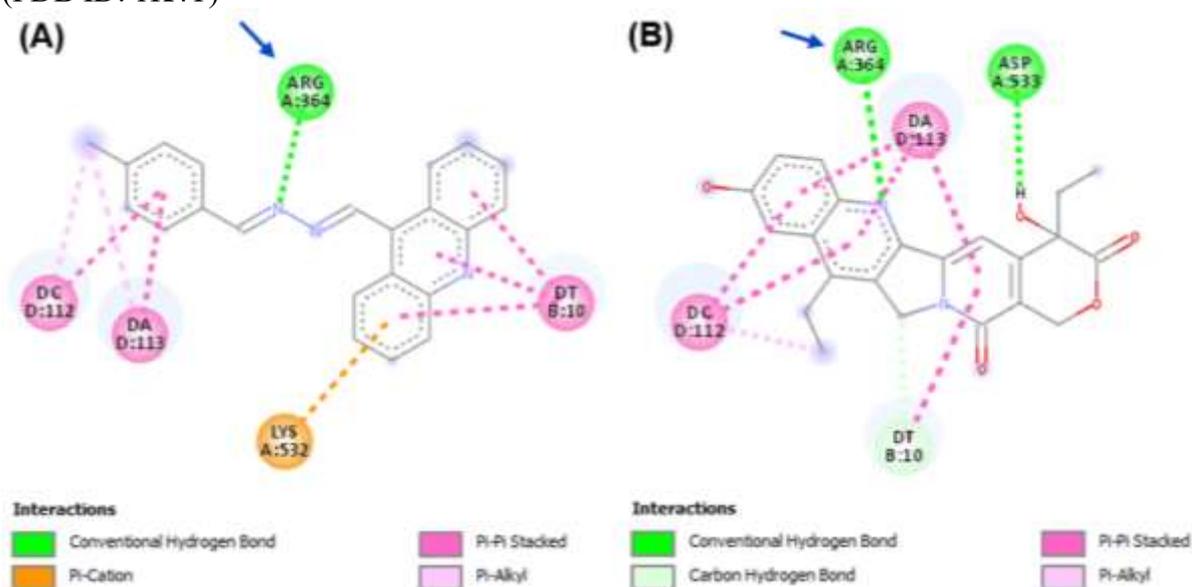
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A molécula ACHZ-CB foi a que apresentou melhor resultado frente ao alvo topoisomerase I, com valores de energia livre de ligação (ΔG) de $-7.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ e constante de inibição estimada 2120.00 nM , valores melhores que os apresentados por SN-38 ($\Delta G = -7.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 3740.00$), conhecido inibidor de topo I utilizado na linha de frente para o tratamento de câncer colorretal. As moléculas ACHZ-BE ($\Delta G = -7.74 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 1610.00 \text{ nM}$), MAC-07 ($\Delta G = -7.75 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 2080.00 \text{ nM}$) e a protótipo 3a ($\Delta G = -7.41 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 3690.00 \text{ nM}$) também apresentaram melhores resultados quando comparadas a SN-38.

Na figura 36, é possível visualizar as interações da molécula ACHZ-CB e do metabólito ativo do irinotecano, SN-38, no alvo topoisomerase I. Ambas, interagiram com o aminoácido Arg364 por meio de ligação de hidrogênio. Esse aminoácido é tido como essencial para interação de diferentes compostos ao alvo topo I (Gomes *et al.*, 2022). Interações em comum também ocorreram com as bases nitrogenadas adenosina-113 (DA D: 113), citosina-112 (DC D:112) e timidina-10 (DT B:10), por meio de empilhamento π - π e π -alquil. Adicionalmente, o núcleo acridínico de ACHZ-CB foi capaz de formar uma ligação do tipo π -cátion com o resíduo de aminoácido Lys A:532. Já SN-38, apresentou interação adicional com Asp A:533 por meio

de ponte de hidrogênio e outra com timidina-10 (DT B:10), por ligação carbono-hidrogênio. Como observado, a molécula ACHZ-CB apresentou interação com diferentes pares de base e aminoácidos também presentes na interação do fármaco de referência e uma ligação π -cátion não observada para SN-38. Esta última é considerada mais forte que ligações comuns por ponte de hidrogênio, podendo justificar a melhor atividade de ACHZ-CB quando comparada a SN-38.

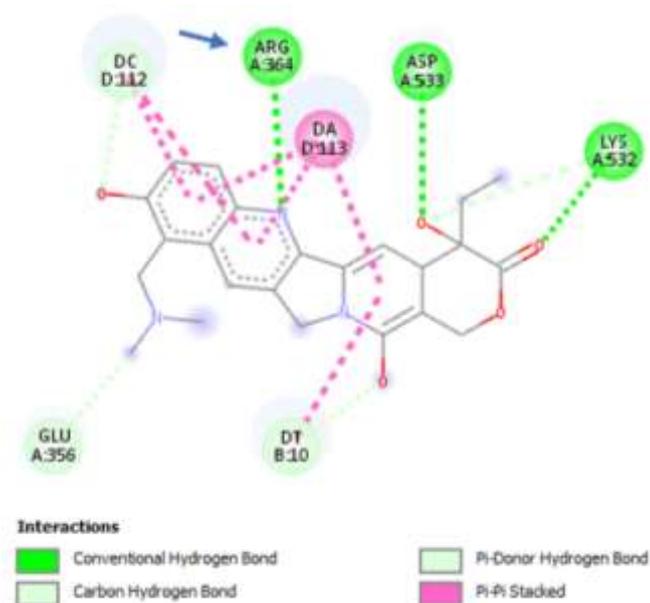
Figura 36 - Interações das moléculas ACHZ-CB (A) e SN-38 (B), no alvo topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Nenhuma das moléculas analisadas obteve melhores resultados que o ligante co-critalizado topotecano. Conforme observado na figura 37, o mesmo realizou 13 diferentes interações com o alvo, enquanto que a moléculas ACHZ-CB realizou 9 e SN-38, 10. Além das interações com as bases nitrogenadas adenosina-113 (DA D: 113), citosina-112 (DC D:112) e timidina-10 (DT B:10), por meio de empilhamento π - π e com a Arg A:364 por ligação de hidrogênio, o topotecano apresentou interações por ligação carbono-hidrogênio e ligação por hidrogênio π -doador com as bases DC D:112 e DT B:10, bom como com o resíduo de aminoácido Glu A:356. Interações por ligação de hidrogênio também foram observadas com os resíduos de aminoácido Asp A:533 e Lys A:532. Como observado, a molécula ACHZ-CB compartilhou de interações com diferentes bases nitrogenadas e aminoácidos também observadas para topotecano, porém não apresentou a mesma variabilidade de tipos de interação ou foi capaz de interagir com Glu A:356 e Asp A:533, podendo justificar seu menor desempenho se comparado a este fármaco.

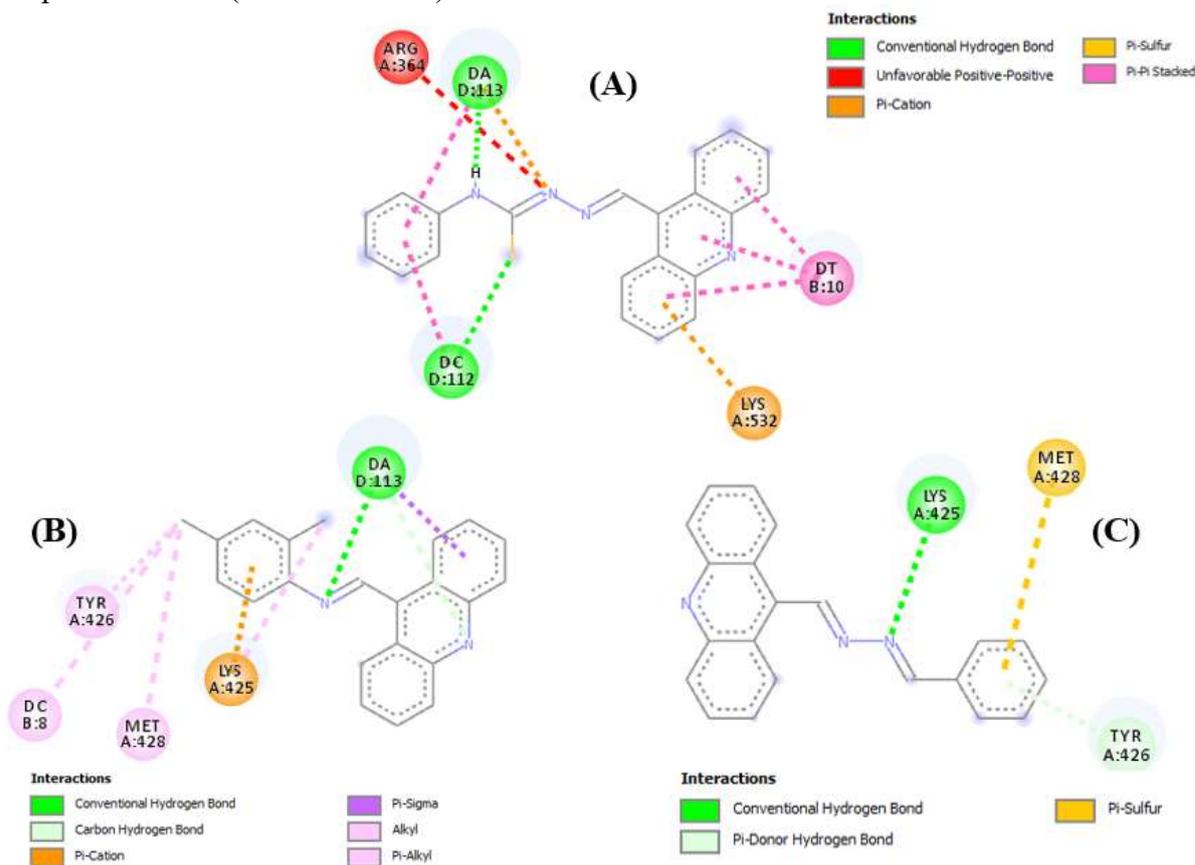
Figura 37 - Interações do topotecano no alvo topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Na figura 38, estão contidas as interações das moléculas 3a (A), MAC-07 (E) (B) e ACHZ-BE (C) com o alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T). É possível observar que as três moléculas analisadas realizaram diferentes tipos de interação com diferentes aminoácidos e bases nitrogenadas do sítio ativo da Topo I, sendo possível notar também, que os átomos de nitrogênio contidos em suas estruturas foram essenciais para tais interações. Se observa também, que apenas a molécula 3a interagiu com o aminoácido tido como essencial, Arg A:364, por meio de um nitrogênio da porção tioamida e que as demais moléculas simplificadas, não apresentaram tal interação. Apesar disso, MAC-07 (E) (B) e ACHZ-BE (C) apresentaram energia livre de ligação e constante de afinidade melhores que a observada para a protótipo 3a. Isso pode decorrer da interação de MAC-07(E) (B) e ACHZ-BE (C) com outros aminoácidos e bases nitrogenadas no sítio ativo, como os resíduos de aminoácido Lys A:425 e Met A:428, que estão presentes nas interações das moléculas citadas, mas não estão contidas nas interações de 3a.

Figura 38 - Interações das moléculas 3a (A), MAC-07 (E) (B) e ACHZ-BE (C) com o alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

De modo geral, os novos derivados acridínicos simplificados apresentaram interação com a topoisomerase I com valores de energia livre de ligação semelhantes ao seu protótipo 3a e em alguns casos com valores superiores (MAC-07 (E), ACHZ-BE e ACHZCB). Aparentemente, para o alvo topo I (PDB ID:1K4T), a redução do tamanho da molécula está associada a menor interação com o alvo, uma vez que as moléculas ACHZ-BE e ACHZCB apresentaram melhores resultados que as moléculas da série MAC, mais simplificadas.

Tomando por base os resultados obtidos nos estudos de *docking* molecular realizados para topo II α e topo I, onde as moléculas obtidas apresentaram resultados semelhantes ou melhores que o fármaco amsacrina e o metabólito ativo do irinotecano (SN-38), respectivamente, é possível inferir que tais moléculas apresentam potencial como inibidores duais de topoisomerase I e II α . Tanto a amsacrina quanto o SN-38 são conhecidos venenos de topoisomerasas, podendo este ser também um provável mecanismo de ação antitumoral exercido pelas moléculas obtidas. Para melhor compreensão desses achados, se faz necessário a realização de testes *in vitro* e testes *in vivo*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes derivados do núcleo acridínico foram obtidos a partir de uma simplificação da molécula 3a. Em estudos de *docking* molecular, os mesmos demonstraram potencial pra inibição de topoisomerase II α (PDB ID: 5GWK) e topoisomerase I (PDB ID: 1K4T) bem como capacidade de interagir com o DNA (PDB ID: 1BNA; 1G3X) intercalando seus pares de bases e interagindo com os sucros. Muitos dos derivados, demonstram melhor atividade que 3a frente os alvos avaliados, tendo destaque MAC-07 e ACHZ-CB. Adicionalmente, os novos derivados obtidos apresentaram bom perfil *druglikness in silico*.

A rota sintética empregada foi rápida e viável, com rendimentos reacionais satisfatórios (49 - 85%), obtendo ao final oito moléculas, sendo MAC-01, MAC-02, MAC-03 e MCA-07 inéditas. A caracterização estrutural se deu por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN de ^1H e ^{13}C .

Em estudos *in vitro*, as moléculas interagiram com ssDNA, com valores de constante de ligação K_b (10^4 - 10^5 M^{-1}) na faixa típica para complexos de intercalação, sendo evidenciado o composto ACHZ-BE. Esse resultado indica que este pode ser um possível mecanismo de ação antitumoral desempenhado pelas moléculas, corroborando com o estudo de *docking*. Elas também interagiram *in vitro* com a albumina sérica humana (HSA), com K_b (10^5 M^{-1}) típico de drogas capazes de se acomodar na mesma.

Em estudos de atividade antiproliferativa *in vitro* frente às linhagens tumorais MCF-7, HeLa e SKMEL-28, as moléculas apresentaram leve citotoxicidade com percentual de inibição máxima de 33,2 %, apesar de serem relativamente mais ativas para HeLa, e MCF-07, linhagens com maior expressão de topo I e II, respectivamente.

Portanto, novos derivados acridínicos foram obtidos com sucesso e apresentaram potencial para fármacos antitumorais, com resultados semelhantes ou melhores que aqueles observados para o *scaffold* 3a, demonstrando que a estratégia de simplificação molecular aplicada no desenvolvimento das novas moléculas foi promissora. Como continuidade desse trabalho, se faz necessário melhor avaliação de citotoxicidade *in vitro* e estudo *in vitro* de inibição de topoisomerase I e II α , como provável mecanismo de ação.

7 PERSPECTIVAS

As perspectivas futuras para esse trabalho envolverão:

- finalizar a caracterização estrutural dos compostos por meio de infravermelho e espectrometria de massas;
- avaliar a citotoxicidade em outras linhagens de células tumorais, especialmente aquelas com maior expressão de topoisomerasas, como a de câncer colorretal; além de utilizar outro ensaio que possa ser mais adequado para as moléculas obtidas;
- avaliar a citotoxicidade em linhagens de células humanas normais;
- avaliar *in vitro* a capacidade de interação com topoisomerase I e II α humana por meio de espectroscopia de absorção em UV-visível, emissão de fluorescência e viscosidade;
- dar continuidade às sínteses no objetivo de obter compostos mais ativos;
- publicação de artigos científicos.

REFERÊNCIAS

- ABU SHADY, H. A.; RAGAB, F. A.; ALI, E. I. Hydrazones, thiosemicarbazides, thiosemicarbazones and 1,3-thiazolidin-4-ones derived from acridine. Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Egypt, v. 31, n. 1-4, p. 285-300, 1990.
- ADELUSI, T. I.; OYEDELE, A.-Q. K.; BOYENLE, I. D.; OGUNLANA, A. T.; ADEYEMI, R. O.; UKACHI, C. D.; IDRIS, M. O.; OLAOBA, O. T.; ADEDOTUN, I. O.; KOLAWOLE, O. E.; XIAOXING, Y.; ABDUL-HAMMED, M. Molecular Modeling in Drug Discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, London, v. 29, p. 100880, 2022.
- AGUILERA-GARRIDO, A.; CASTILLO-SANTAELLA, T.; YANG, Y.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J.; MOLINA-BOLÍVAR, J. A.; HOLGADO-TERRIZA, J. A.; CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. Á.; MALDONADO-VALDERRAMA, J. Applications of Serum Albumins in Delivery Systems: Differences in Interfacial Behaviour and Interacting Abilities with Polysaccharides. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 290, p. 102365, 2021.
- AHMED JUVALE, I. I.; ABDUL HAMID, A. A.; ABD HALIM, K. B.; CHE HAS, A. T. P-Glycoprotein: New Insights into Structure, Physiological Function, Regulation and Alterations in Disease. **Heliyon**, Oxford, v. 8, n. 6, p. e09777, 2022.
- ALBINO, S. L. **Planejamento, síntese e avaliação do perfil quimioterápico de derivados tiossemicarbazônicos hibridizados a núcleos heterocíclicos**. 2020. 251 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.
- ALI, A. Q.; TEOH, S. G.; ELTAYEB, N. E.; KHADEER AHAMED, M. B.; ABDUL MAJID, A. M. S. Synthesis of Copper (II) Complexes of Isatin Thiosemicarbazone Derivatives: In Vitro Anti-Cancer, DNA Binding, and Cleavage Activities. **Polyhedron**, Oxford, v. 74, p. 6–15, 2014.
- ALMEIDA, L. C.; CALIL, F. A.; MACHADO-NETO, J. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. DNA Damaging Agents and DNA Repair: From Carcinogenesis to Cancer Therapy. **Cancer Genetics**, New York, v. 252-253, p. 6–24, 2021.
- 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, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V.; RIBEIRO, A. G.; SILVA, G. C. L.; ALVES, J. E. F.; BELTRÃO, E. I. C.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; LIMA, M. C. A. DNA Binding and Topoisomerase Inhibition: How Can These Mechanisms Be Explored to Design More Specific Anticancer Agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Issy-les-Moulineaux, v. 96, p. 1538–1556, 2017.

ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; DA SILVA, L. P. B. G.; AMORIM, C. A. D. C.; DE OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; DE LIMA, M. C. A.; JÚNIOR, L. B. D. 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, 2015

ARULANANDAM, C. D.; HWANG, J.-S.; RATHINAM, A. J.; DAHMS, H.-U. Evaluating Different Web Applications to Assess the Toxicity of Plasticizers. **Scientific Reports**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 19684, 2022.

ASEMAN, M. D.; ARYAMANESH, S.; SHOJAEIFARD, Z.; HEMMATEENEJAD, B.; NABAVIZADEH, S. M. Cycloplatinated (II) Derivatives of Mercaptopurine Capable of Binding Interactions with HSA/DNA. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 58, n. 23, p. 16154–16170, 2019.

ASSEMAT, G.; BALAYSSAC, S.; GERDOVA, A.; GILARD, V.; CAILLET, C.; WILLIAMSON, D.; MALET-MARTINO, M. Benchtop Low-Field ¹H Nuclear Magnetic Resonance for Detecting Falsified Medicines. **Talanta**, Amsterdam, v. 196, p. 163–173, 2019.

BAGLINI, E.; SALERNO, S.; BARRESI, E.; ROBELLO, M.; DA SETTIMO, F.; TALIANI, S.; MARINI, A. M. Multiple Topoisomerase I (TopoI), Topoisomerase II (TopoII) and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (TDP) Inhibitors in the Development of Anticancer Drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 156, p. 105594, 2021.

BAILLY, C. Etoposide: A Rider on the Cytokine Storm. **Cytokine**, London, v. 168, p. 156234, 2023.

BANKS, W. A. From Blood–Brain Barrier to Blood–Brain Interface: New Opportunities for CNS Drug Delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 275–292, 2016.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, São Paulo, 1997. v. 20, n. 3, p. 300–310.

BARROS, F. W. A.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTI, B. C.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Inhibition of DNA Topoisomerase I Activity and Induction of Apoptosis by Thiazacridine Derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 268, n. 1, p. 37–46, 2013.

BERGAZIN, T. D.; TIELKER, N.; ZHANG, Y.; MAO, J.; GUNNER, M. R.; FRANCISCO, K.; BALLATORE, C.; KAST, S. M.; MOBLEY, D. L. Evaluation of Log P, PKa, and Log D Predictions from the SAMPL7 Blind Challenge. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Dordrecht, v. 35, n. 7, p. 771–802, 2021.

BISSARO, M.; STURLESE, M.; MORO, S. The Rise of Molecular Simulations in Fragment-Based Drug Design (FBDD): An Overview. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 25, n. 9, p. 1693–1701, 2020.

BOITTIER, E. D.; TANG, Y. Y.; BUCKLEY, M. E.; SCHUURS, Z. P.; RICHARD, D. J.; GANDHI, N. S. Assessing Molecular Docking Tools to Guide Targeted Drug Discovery of CD38 Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 15, p. 5183, 2020.

BRACONI, L.; TEODORI, E.; RIGANTI, C.; CORONNELLO, M.; NOCENTINI, A.; BARTOLUCCI, G.; PALLECCHI, M.; CONTINO, M.; MANETTI, D.; ROMANELLI, M. N.; SUPURAN, C. T.; DEL, S. New Dual P-Glycoprotein (P-Gp) and Human Carbonic Anhydrase XII (HCA XII) Inhibitors as Multidrug Resistance (MDR) Reversers in Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 65, n. 21, p. 14655–14672, 2022.

CAVASOTTO, C. N.; AUCAR, M. G. High-Throughput Docking Using Quantum Mechanical Scoring. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 8, p. 246, 2020.

CERAMELLA, J.; MARICONDA, A.; IACOPETTA, D.; SATURNINO, C.; BARBAROSSA, A.; CARUSO, A.; ROSANO, C.; SINICROPI, M. S.; LONGO, P. From Coins to Cancer Therapy: Gold, Silver and Copper Complexes Targeting Human Topoisomerases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Kidlington, v. 30, n. 3, p. 126905, 2020.

CHRYSANTHAKOPOULOS, M.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Retention of Structurally Diverse Drugs in Human Serum Albumin Chromatography and Its Potential to Simulate Plasma Protein Binding. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 37, p. 5761–5768, 2010.

CRAMPON, K.; GIORKALLOS, A.; DELDOSSI, M.; BAUD, S.; STEFFENEL, L. A. Machine-Learning Methods for Ligand–Protein Molecular Docking. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 27, n. 1, p. 151–164, 2022.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DELGADO, J. L.; HSIEH, C.-M.; CHAN, N.-L.; HIASA, H. Topoisomerases as Anticancer Targets. **Biochemical Journal**, London, v. 475, n. 2, p. 373–398, 2018.

DI NARDO, G.; GILARDI, G. Natural Compounds as Pharmaceuticals: The Key Role of Cytochromes P450 Reactivity. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 45, n. 6, p. 511–525, 2020.

DICK, A.; COCKLIN, S. Bioisosteric Replacement as a Tool in Anti-HIV Drug Design. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 13, n. 3, p. 36, 2020.

EDAMATSU, H.; YAGAWA, M.; IKUSHIRO, S.; SAKAKI, T.; NAKAGAWA, Y.; MIYAGAWA, H.; AKAMATSU, M. Identification and *In Silico* Prediction of Metabolites of Tebufenozide Derivatives by Major Human Cytochrome P450 Isoforms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Kidlington, v. 28, n. 9, p. 115429, 2020.

FERNANDO, J.; JONES, R. The Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. **Surgery**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 131–135, 2015.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET Modeling Approaches in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 2019.

FILHO, F. A. S. et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam v. 138, p. 582–589, Oct. 2019.

FINK, C.; SUN, D.; WAGNER, K.; SCHNEIDER, M.; BAUER, H.; DOLGOS, H.; MÄDER, K.; PETERS, S. Evaluating the Role of Solubility in Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Hoboken, v. 107, n. 3, p. 650–661, 2020.

GAMA, **Síntese de derivados de acetoacetamidas e sua utilização em reações multicomponentes. Síntese de diazoacetamidas como intermediários para o estudo de reações de inserção C-H.** 2015. 447 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.

GOMES, J. N. S.; SANTOS, M. B.; SILVA, Y. M. S. M.; ALBINO, S. L.; 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, 2022.

GOUVEIA, R. G.; RIBEIRO, A. G.; SEGUNDO, M. A. 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**, Kidlington, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.

GUHATHAKURTA, B.; PRADHAN, A. B.; DAS, S.; BANDYOPADHYAY, N.; LU, L.; ZHU, M.; NASKAR, J. P. Spectroscopic and Molecular Docking Studies on the Interaction of Human Serum Albumin with Copper (II) Complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 173, p. 740–748, 2017.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de Fármacos, Biotecnologia e Química Medicinal: Aplicações em Doenças Infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HAJIAN, R.; HOSSAINI, P.; MEHRAYIN, Z.; WOI, P. M.; SHAMS, N. DNA-Binding Studies of Valrubicin as a Chemotherapy Drug Using Spectroscopy and Electrochemical Techniques. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 176–180, 2017.

HAKKOLA, J.; HUKKANEN, J.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Inhibition and Induction of CYP Enzymes in Humans: An Update. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 94, n. 11, p. 3671–3722, 2020.

HEESTAND, G. M.; SCHWAEDERLE, M.; GATALICA, Z.; ARGUELLO, D.; KURZROCK, R. Topoisomerase Expression and Amplification in Solid Tumours: Analysis of 24,262 Patients. **European Journal of Cancer**, Kidlington, v. 83, p. 80–87, 2017.

HEVENER, K.; VERSTAK, T. A.; LUTAT, K. E.; RIGGSBEE, D. L.; MOONEY, J. W. Recent Developments in Topoisomerase-Targeted Cancer Chemotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Beijing, v. 8, n. 6, p. 844–861, 2018.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA - General Principles and Recent Developments. *In*: WÜRTHNER, F. **Supramolecular Dye Chemistry**. Berlin: Springer, 2005. p. 161–204.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p. 160, 2022.

JAIN, A. K.; BHATTACHARYA, S. Interaction of G-Quadruplexes with Nonintercalating Duplex-DNA Minor Groove Binding Ligands. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 22, n. 12, p. 2355–2368, 2011.

JAYASHREE, B. S.; NIKHIL, P. S.; PAUL, S. Bioisosterism in Drug Discovery and Development - An Overview. **Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 18, n. 9, p. 915–925, 2022.

JENSEN, N. F.; AGAMA, K.; ROY, A.; SMITH, D. H.; PFISTER, T. D.; RØMER, M. U.; ZHANG, H.-L.; DOROSHOW, J. H.; KNUDSEN, B. R.; STENVANG, J.; BRÜNNER, N.; POMMIER, Y. Characterization of DNA Topoisomerase I in Three SN-38 Resistant Human Colon Cancer Cell Lines Reveals a New Pair of Resistance-Associated Mutations. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 35, n. 1, p. 56, 2016.

JIA, C.-Y.; LI, J.-Y.; HAO, G.-F.; YANG, G.-F. A Drug-Likeness Toolbox Facilitates ADMET Study in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 25, n. 1, p. 248–258, 2020.

KHARKHAROV A. A. Absorption spectra and structure of molecules. III. Modern electronic theory and color of arylhydrazones of 9-acridinecarboxaldehyde. **Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya**, p. 326-34, 1955.

KIRSCH, P.; HARTMAN, A. M.; HIRSCH, A. K. H.; EMPTING, M. Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 23, p. 4309, 2019.

KUDARHA, R. R.; SAWANT, K. K. Albumin Based Versatile Multifunctional Nanocarriers for Cancer Therapy: Fabrication, Surface Modification, Multimodal Therapeutics and Imaging Approaches. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 81, p. 607–626, 2017.

KUMAR, A.; BORA, U. Molecular docking studies of curcumin natural derivatives with DNA topoisomerase I and II-DNA complexes. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, Heidelberg, v. 6, n. 4, p. 285-291, 2014.

KUMARI, S.; CARMONA, A. V.; TIWARI, A. K.; TRIPPIER, P. C. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 63, n. 21, p. 12290–12358, 2020.

LAKSHMI, P.; MONDAL, M.; RAMADAS, K.; NATARAJAN, S. Molecular Interaction of 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) with Human Serum Albumin (HSA): The Spectroscopic, Calorimetric and Computational Investigation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 183, p. 90–102, 2017.

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

LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

MCGHEE, J. D.; VON HIPPEL, P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, n. 2, p. 469–89, 1974.

MORIGUCHI, I.; HIRONO, S.; NAKAGOME, I.; HIRANO, H. Comparison of Reliability of Log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Japan, V. 42, n. 4, p. 976–978, 1994.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, 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, 1998.

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

NAQVI, A. A. T.; MOHAMMAD, T.; HASAN, G. M.; HASSAN, M. I. Advancements in Docking and Molecular Dynamics Simulations Towards Ligand-Receptor Interactions and Structure-Function Relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 18, n. 20, p. 1755–1768, 2018.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L. Rational Approaches, Design Strategies, Structure Activity Relationship and Mechanistic Insights for Anticancer Hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-les-Moulineaux, v. 77, p. 422–487, 2014.

NUSSINOV, R.; TSAI, C.-J.; JANG, H. Anticancer Drug Resistance: An Update and Perspective. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 59, p. 100796, 2021.

OSTASZ, A.; ŁYSZCZEK, R.; SZTANKE, K.; SZTANKE, M. TG-DSC and TG-FTIR Studies of Annelated Triazinylacetic Acid Ethyl Esters—Potential Anticancer Agents. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 4, p. 1735, 2023.

PATEL, S. G.; BOLAND, C. R. Colorectal Cancer in Persons Under Age 50: Seeking Causes and Solutions. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, New York, v. 30, n. 3, p. 441–455, 2020.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVIAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010. 716 p.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 93, p. 52–79, 2015.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

RABBANI, G.; BAIG, M. H.; JAN, A. T.; JU LEE, E.; KHAN, M. V.; ZAMAN, M.; FAROUK, A.-E.; KHAN, R. H.; CHOI, I. Binding of Erucic Acid with Human Serum Albumin Using a Spectroscopic and Molecular Docking Study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 105, p. 1572–1580, 2017.

ROSEN, V. M.; GUERRA, I.; MCCORMACK, M.; NOGUEIRA-RODRIGUES, A.; SASSE, A.; MUNK, V. C.; SHANG, A. Systematic Review and Network Meta-Analysis of Bevacizumab Plus First-Line Topotecan-Paclitaxel or Cisplatin-Paclitaxel Versus Non-Bevacizumab-Containing Therapies in Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. **International Journal of Gynecologic Cancer**, Hoboken, v. 27, n. 6, p. 1237–1246, 2017.

SENTHIL RAJA, D.; BHUVANESH, N. S. P.; NATARAJAN, K. DNA Binding, Protein Interaction, Radical Scavenging and Cytotoxic Activity of 2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline-3-Carbaldehyde(2'-Hydroxybenzoyl)Hydrazone and Its Cu (II) Complexes: A Structure Activity Relationship Study. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 385, p. 81–93, 2012.

SHAH, D.; AJAZUDDIN; BHATTACHARYA, S. Role of Natural P-Gp Inhibitor in the Effective Delivery for Chemotherapeutic Agents. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, New York, v. 149, n. 1, p. 367–391, 2023.

SHARMA, V.; GUPTA, M.; KUMAR, P.; SHARMA, A. A Comprehensive Review on Fused Heterocyclic as DNA Intercalators: Promising Anticancer Agents. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 27, n. 1, p. 15–42, 2021.

SIDDIK, Z. H. Alkylating agents and platinum antitumor Compounds. In: BAST JR., R. C. et al. **Holland-Frei Cancer Medicin**, 2017. 9. Ed. New Jersey: JohnWiley & Sons, 2017.

SILVA FILHO, F. A.; 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.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; 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, 2019.

SILVA, J. M. **Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral**. 2018. 211 f.

Dissertação (Mestrado em Química) - 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**, Kidlington, v. 71, p. 144–151, 2017.

SINGH, K.; BLÜMICH, B. Desktop NMR for Structure Elucidation and Identification of Strychnine Adulteration. **Analyst**, Cambridge, v. 142, n. 9, p. 1459–1470, 2017.

SONG, D.; ZHANG, N.; ZHANG, P.; ZHANG, N.; CHEN, W.; ZHANG, L.; GUO, T.; GU, X.; MA, S. Design, Synthesis and Evaluation of Novel 9-Arylalkyl-10-Methylacridinium Derivatives as Highly Potent FtsZ-Targeting Antibacterial Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-les-Moulineaux, v. 221, p. 113480, 2021.

SPADA, A.; EMAMI, J.; TUSZYNSKI, J. A.; LAVASANIFAR, A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 18, n. 5, p. 1862–1894, 2021.

STARRETT, G. J.; BUCK, C. B. The Case for BK Polyomavirus as a Cause of Bladder Cancer. **Current Opinion in Virology**, Kidlington, v. 39, p. 8–15, 2019.

TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Assay When Compared to Three Commonly Used Cell Enumeration Assays. **BMC Research Notes**, London, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

TSUGE, O., NISHINOHARA M., TASHIRO M. Compounds Related to Acridine. I. Condensation of Acridine Derivatives Having Active Methyl Group and Aromatic Nitroso Compounds. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 36, n. 11, p. 1477-1485, 1963.

WANG, J.-J.; LEI, K.-F.; HAN, F. Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments. **European review for medical and pharmacological sciences**, Rome, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural Simplification: An Efficient Strategy in Lead Optimization. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Beijing, v. 9, n. 5, p. 880–901, 2019.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural Simplification of Natural Products. **Chemical Reviews**, Washington, v. 119, n. 6, p. 4180–4220, 2019.

WILDMAN, S. A.; CRIPPEN, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 39, n. 5, p. 868–873, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Geneva. World Health Organization. 2023. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 01 ago. 2023.

WU, D.; ZHAO, D.-W.; LI, Y.-Q.; SHI, W.-G.; YIN, Q.-L.; TU, Z.-K.; YU, Y.-Y.; ZHONG, B.-H.; YU, H.; BAO, W.-G. Antitumor Potential of a Novel Camptothecin Derivative, ZBH-ZM-06. **Oncology Reports**, Athens, v. 39, n. 2, p. 871–879, 2018.

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J.; FU, L.; YANG, Z.; HSIEH, C.; YIN, M.; ZENG, X.; WU, C.; LU, A.; CHEN, X.; HOU, T.; CAO, D. ADMETlab 2.0: An Integrated Online Platform for Accurate and Comprehensive Predictions of ADMET Properties. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 49, n. W1, p. W5–W14, 2021.

YUAN, Z.; CHEN, S.; CHEN, C.; CHEN, J.; CHEN, C.; DAI, Q.; GAO, C.; JIANG, Y. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amidobenzimidazole Acridine Derivatives as Dual PARP and Topo Inhibitors for Cancer Therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy-les-Moulineaux, v. 138, p. 1135–1146, 2017.

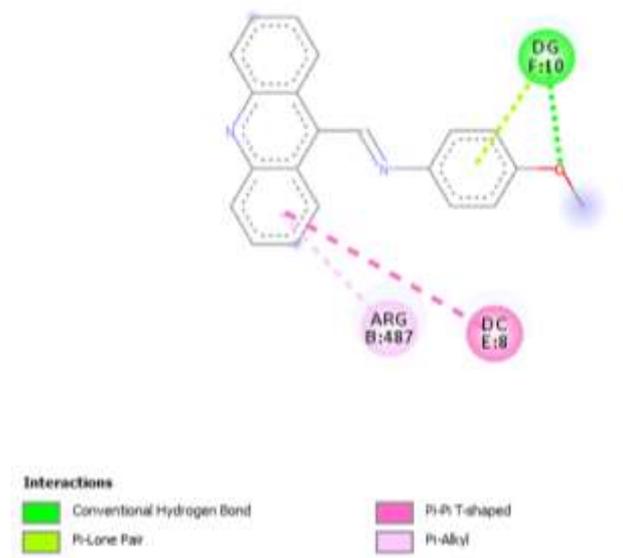
YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZHAO, M.; MA, J.; LI, M.; ZHANG, Y.; JIANG, B.; ZHAO, X.; HUAI, C.; SHEN, L.; ZHANG, N.; HE, L.; QIN, S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 23, p. 12808, 2021.

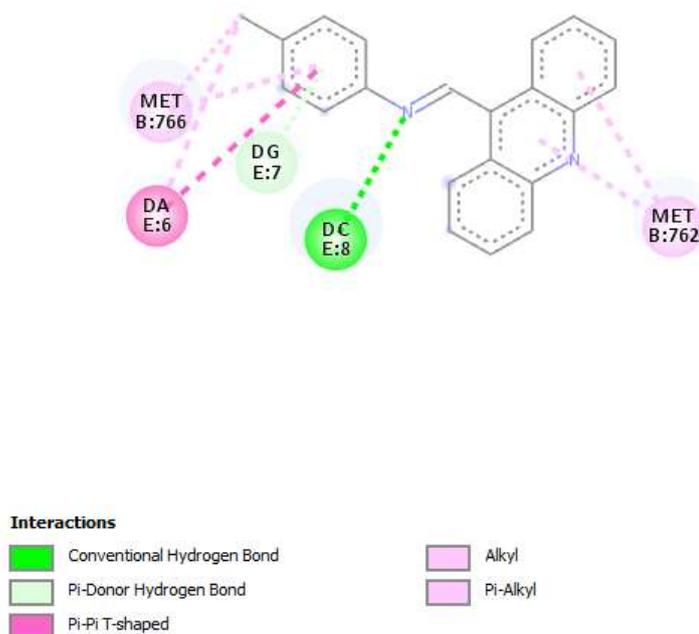
ZHU, M.; WANG, L.; WANG, Y.; ZHOU, J.; DING, J.; LI, W.; XIN, Y.; FAN, S.; WANG, Z.; WANG, Y. Biointeractions of Herbicide Atrazine with Human Serum Albumin: UV-Vis, Fluorescence and Circular Dichroism Approaches. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, n. 1, p. 116, 2018.

ANEXOS A -DOCKING MOLECULAR

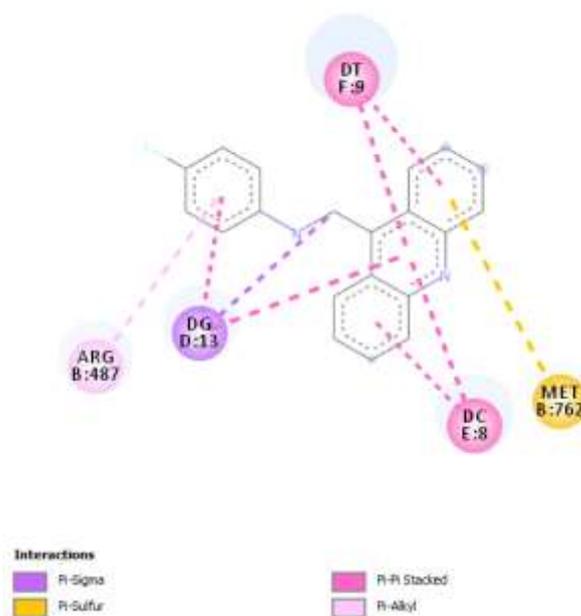
1 - Docking molecular da molécula MAC-01 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



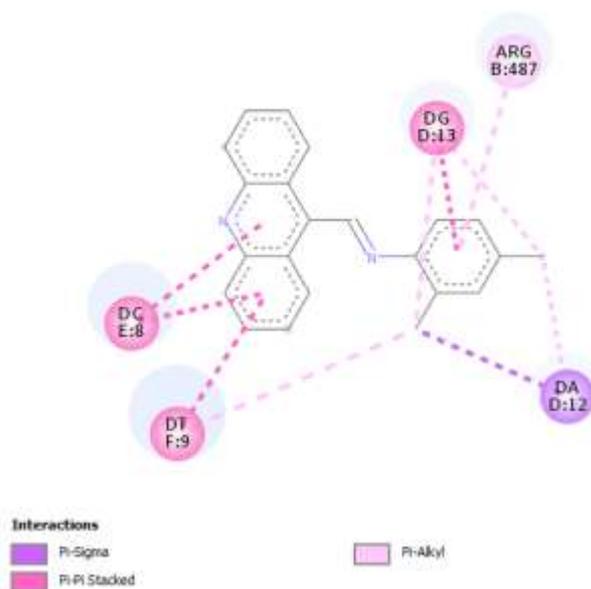
2 - Docking molecular da molécula MAC-02 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



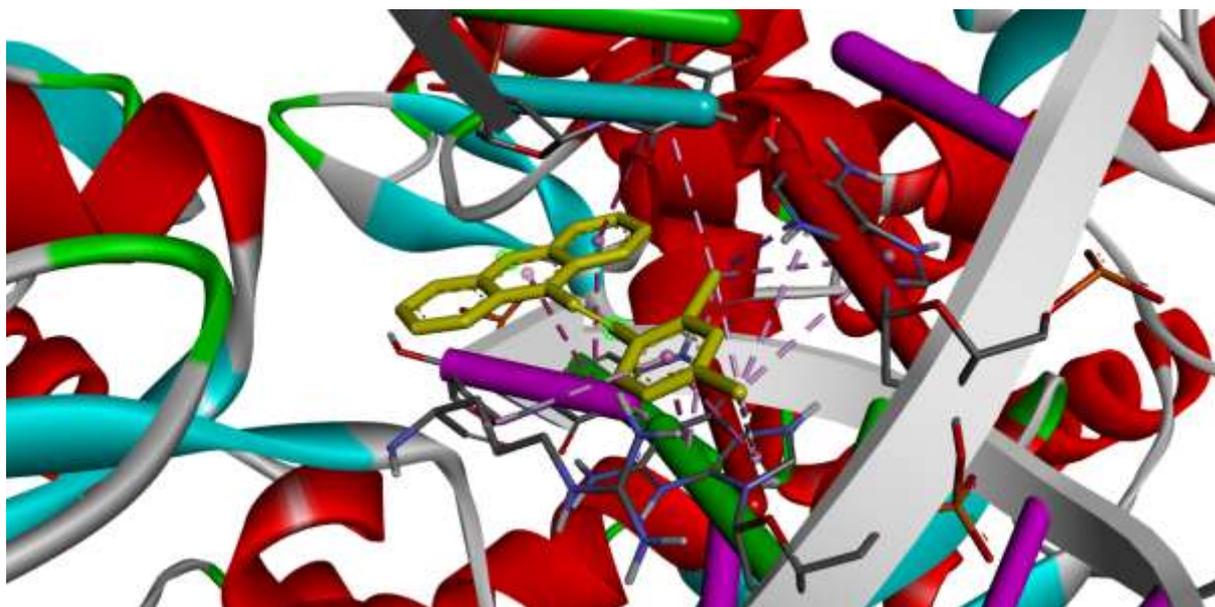
3 - *Docking* molecular da molécula MAC-03 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



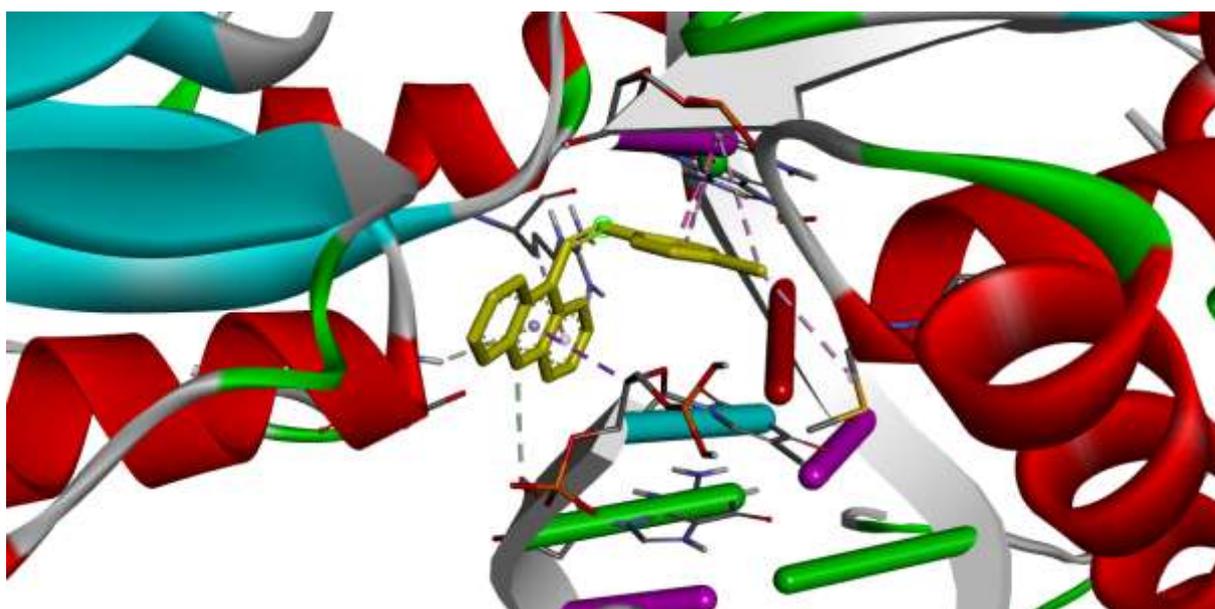
4 - *Docking* molecular da molécula MAC-07 (*E*) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



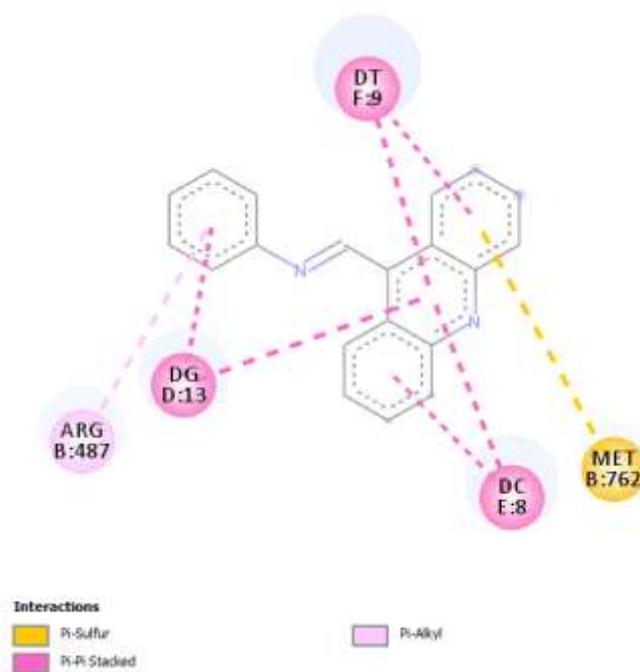
5 - Docking molecular em 3D da molécula MAC-07 (E) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



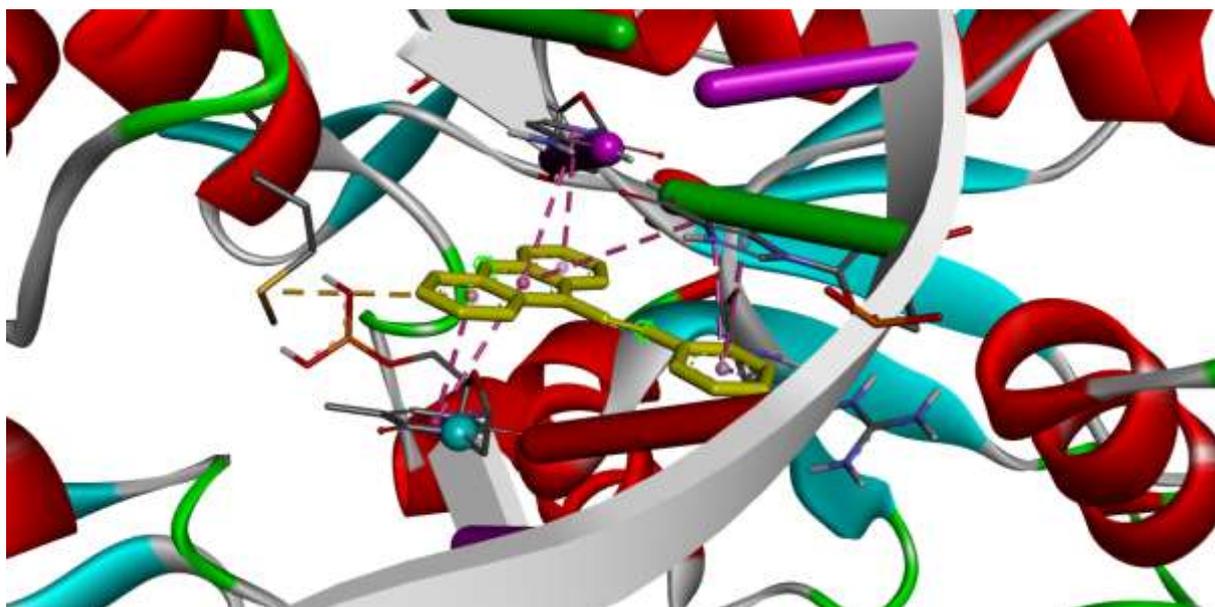
6 - Docking molecular em 3D da molécula MAC-07 (z) no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



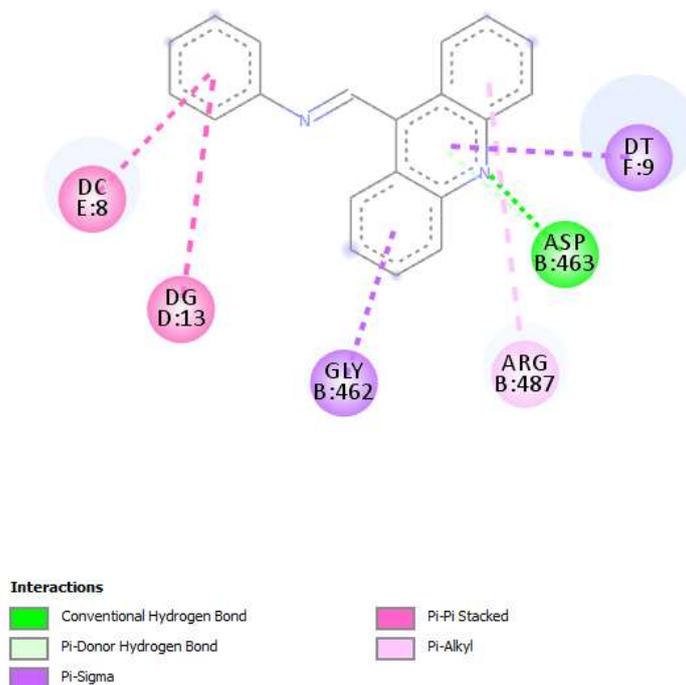
7 - Docking molecular do isômero *E* da molécula MAC-08 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



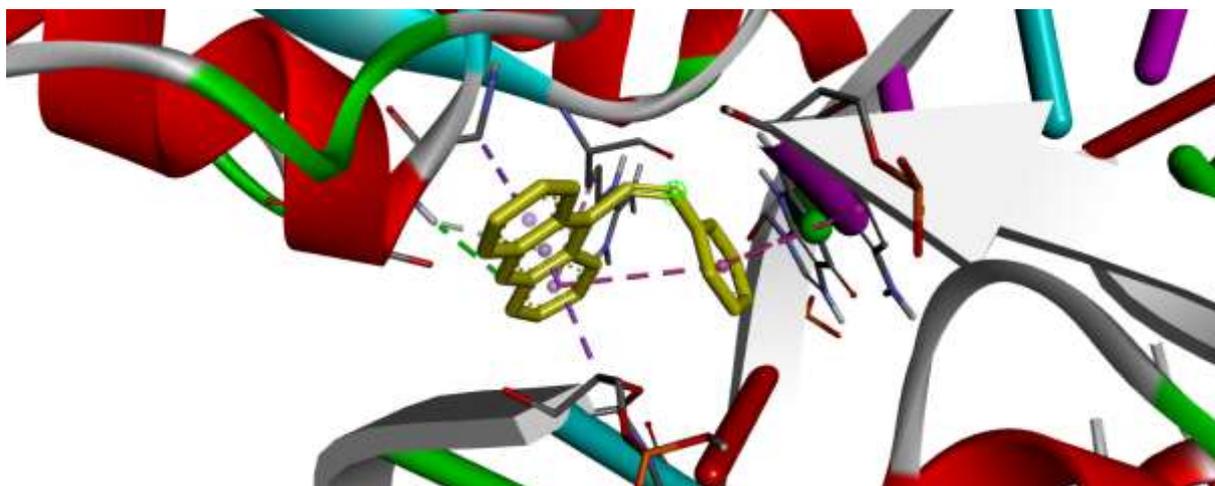
8 - Docking molecular 3D do isômero *E* da molécula MAC-08 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



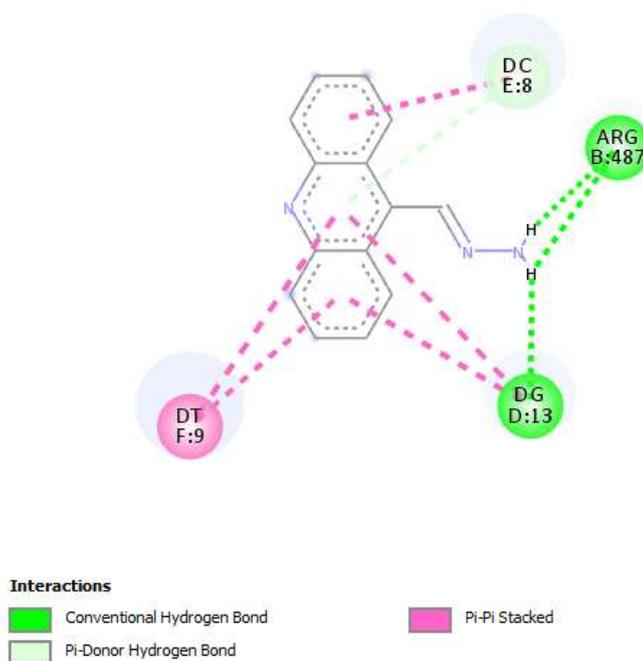
9- Docking molecular do isômero Z da molécula MAC-08 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



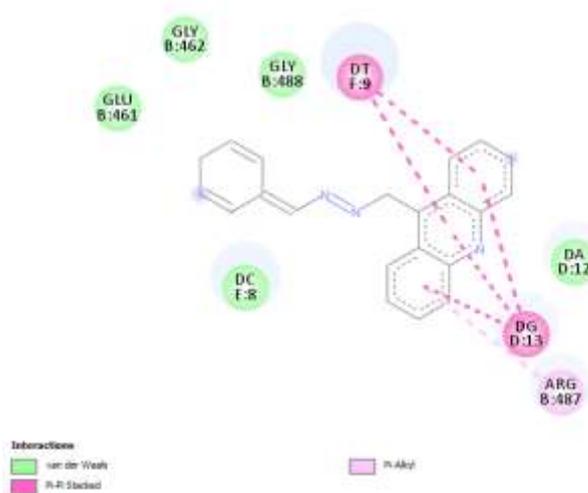
10- Docking molecular 3D do isômero Z da molécula MAC-08 no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



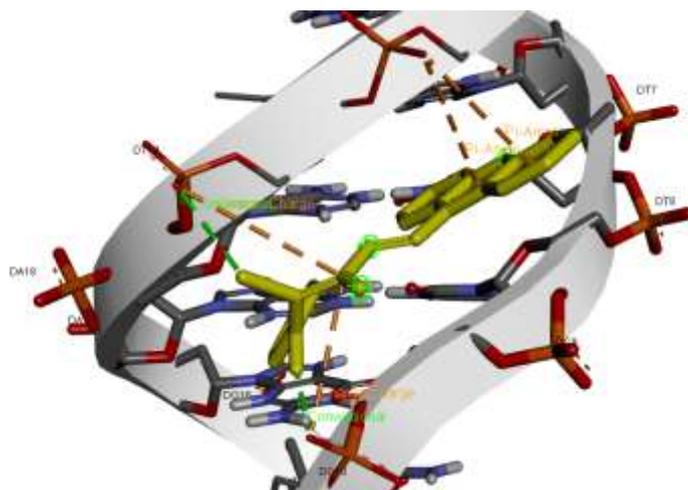
11 - Docking molecular da molécula ACHZ no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



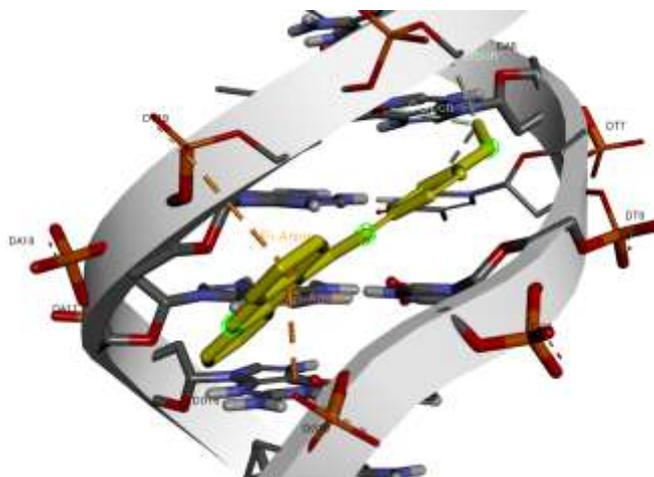
12 - Docking molecular da molécula ACHZ-BE no alvo topoisomerase II α complexada com DNA (PDB ID: 5GWK)



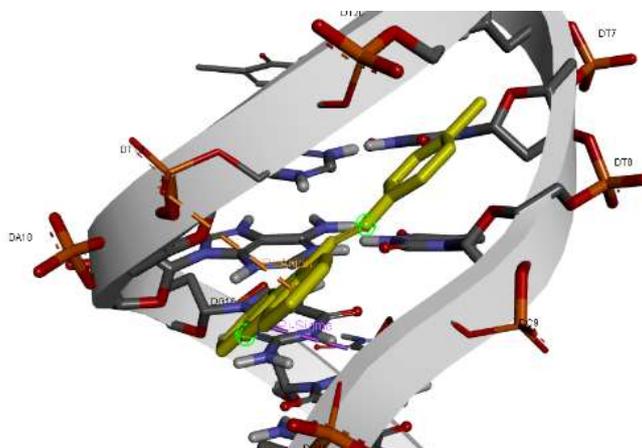
13 - Docking molecular da molécula 3a no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



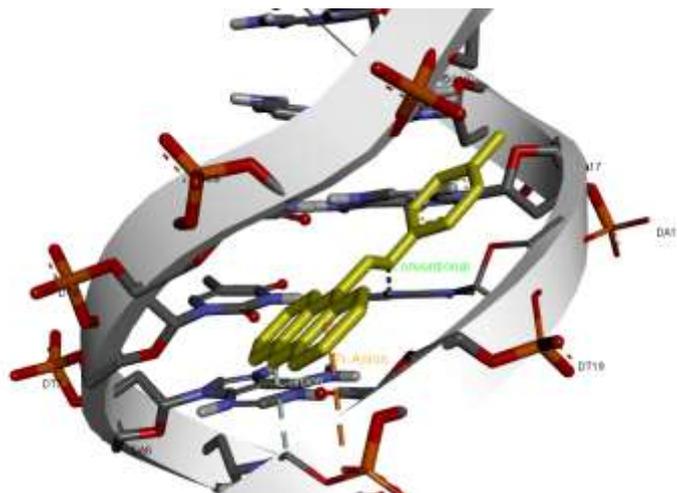
14 - Docking molecular da molécula MAC-01 no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



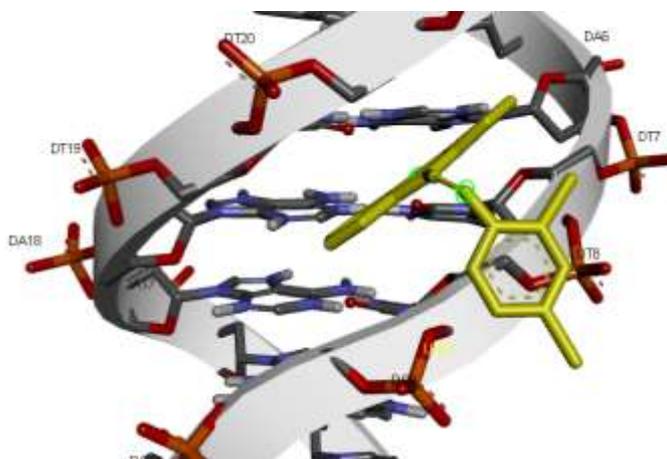
15 - Docking molecular da molécula MAC-02 no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



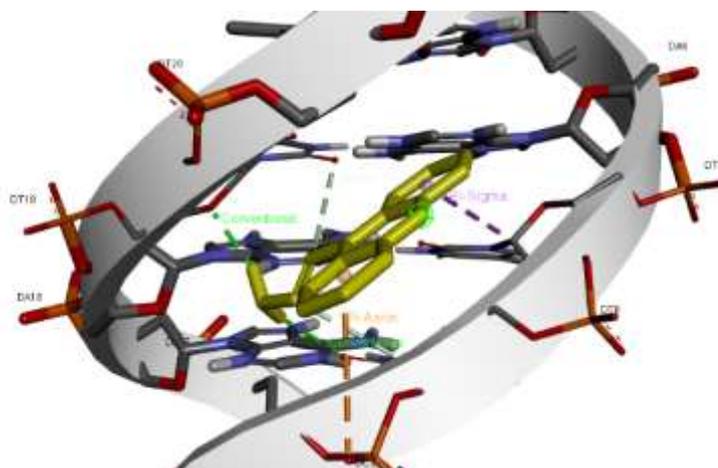
16 - Docking molecular da molécula MAC-03 no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



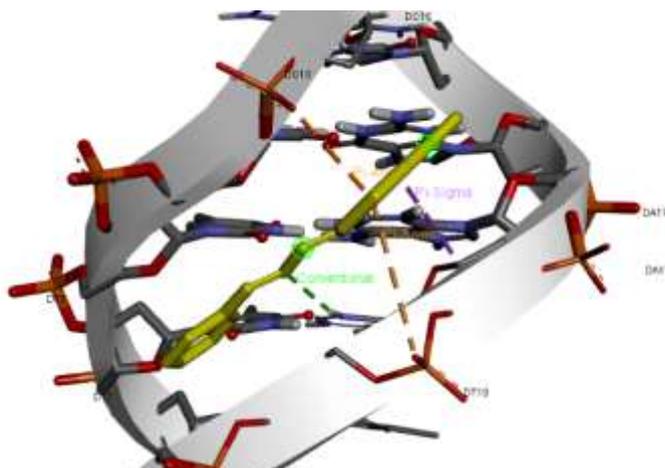
17- Docking molecular da molécula MAC-07 (Z) no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



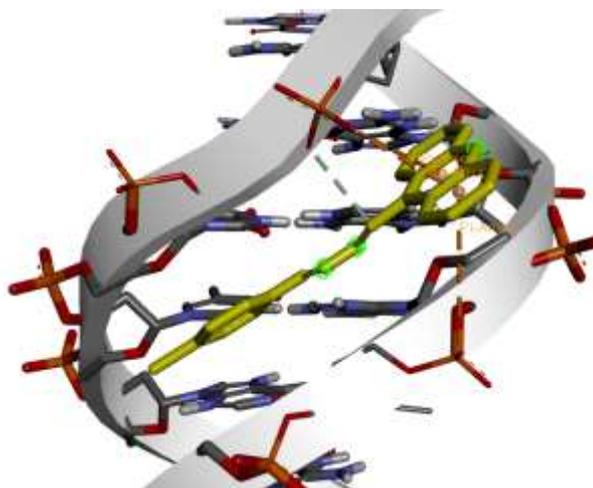
18 - Docking molecular da molécula ACHZ no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



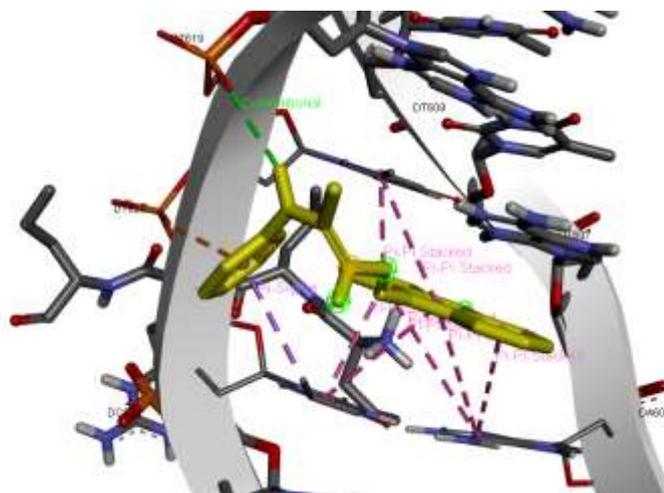
19 - Docking molecular da molécula ACHZ-BE no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



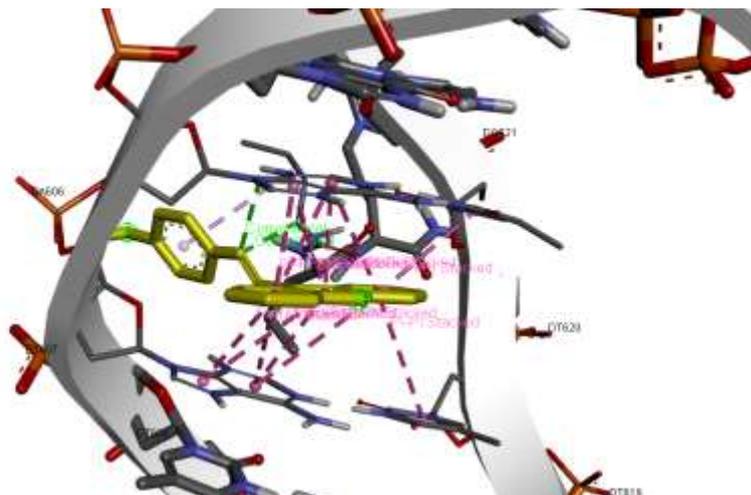
20 - Docking molecular da molécula ACHZ-CB no alvo DNA (PDB ID: 1BNA)



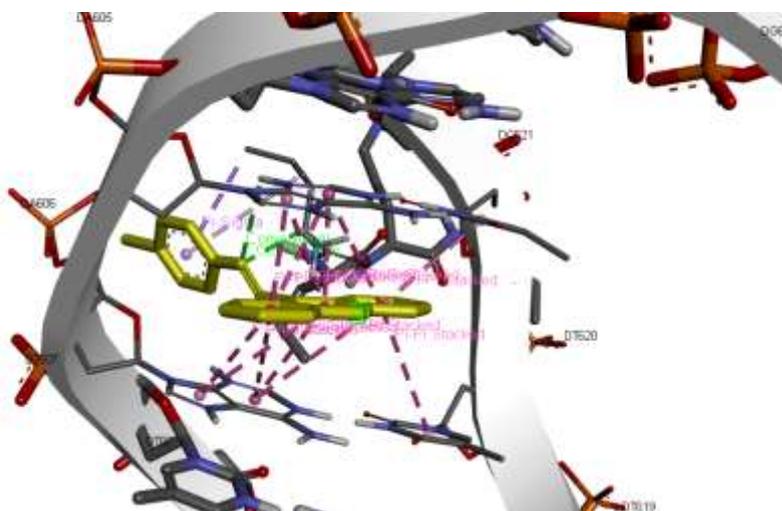
21 - Docking molecular da molécula 3a no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



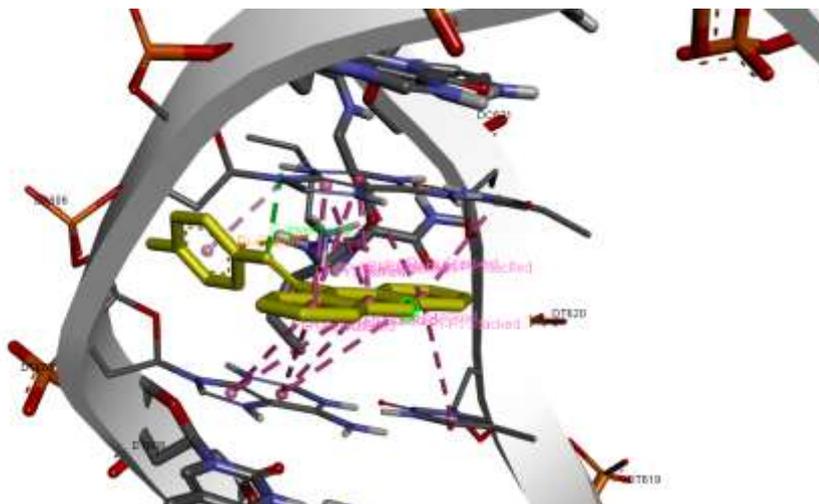
22 - *Docking* molecular da molécula MAC-01 no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



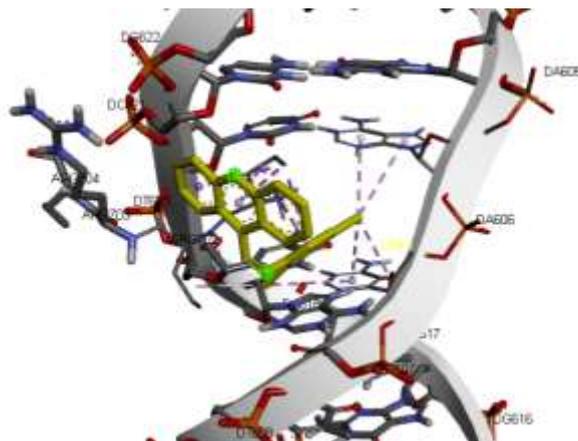
23 - *Docking* molecular da molécula MAC-02 no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



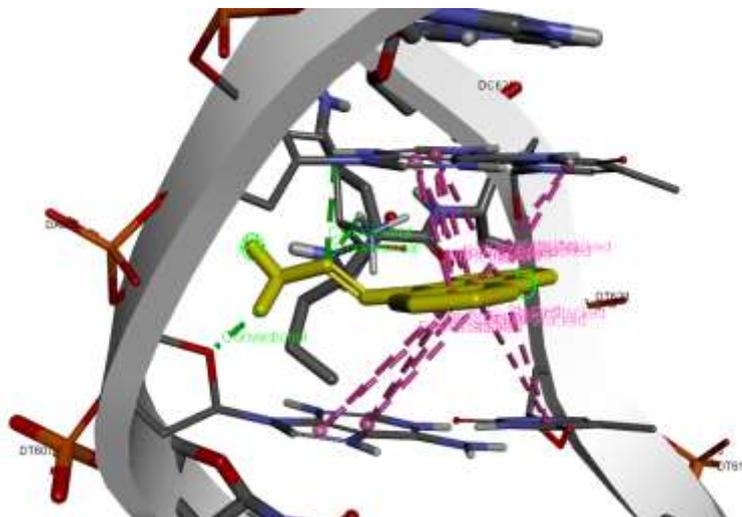
24- *Docking* molecular da molécula MAC-03 no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



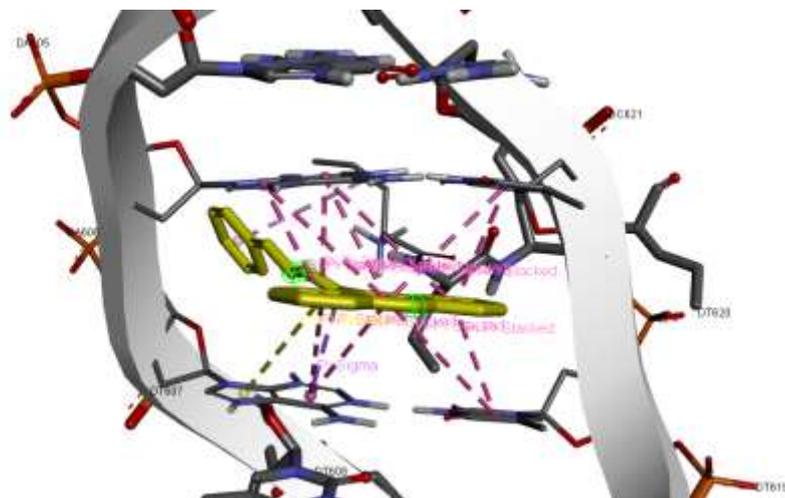
25 - Docking molecular da molécula MAC-07 (Z) no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



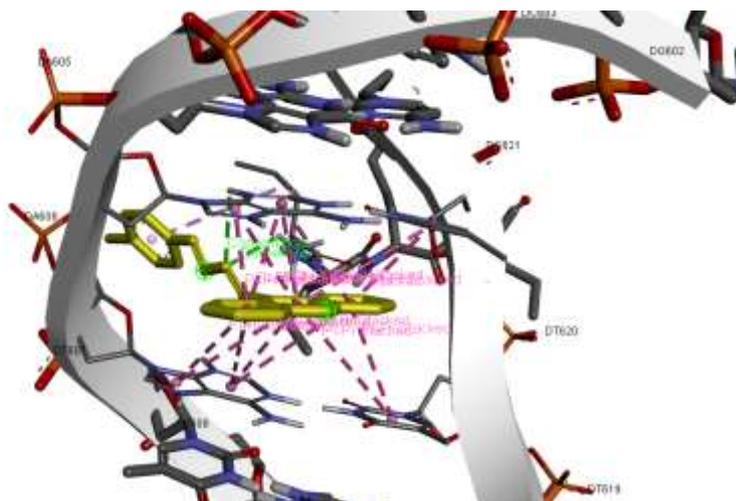
26 - Docking molecular da molécula ACHZ no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



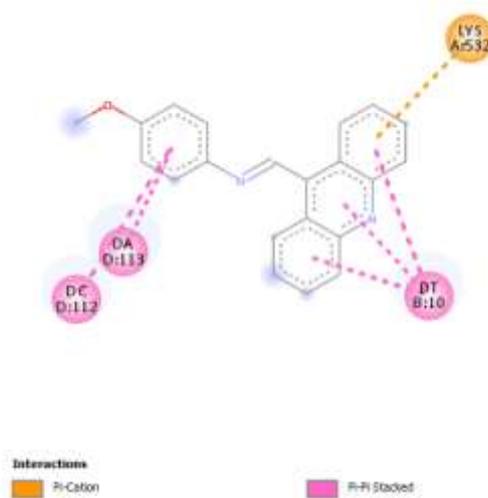
27 - Docking molecular da molécula ACHZ-BE no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



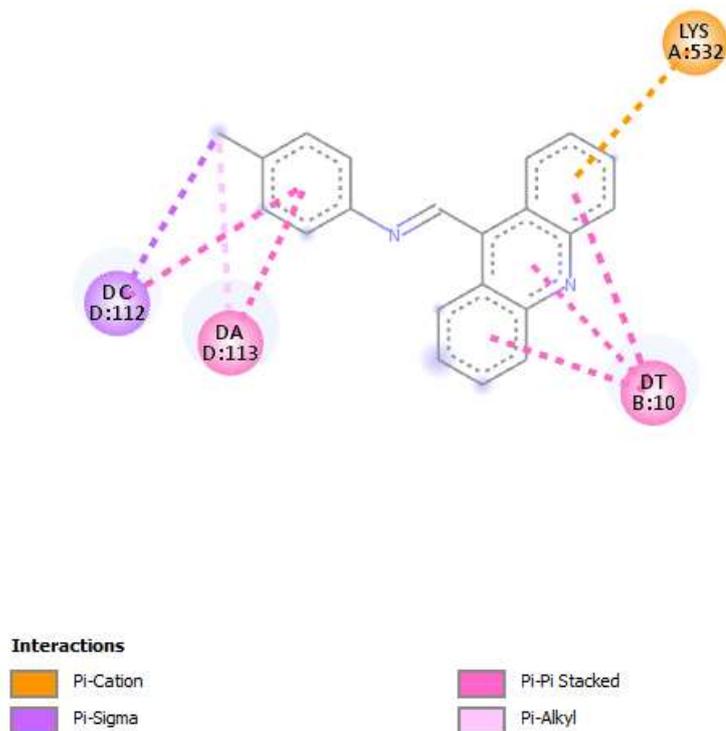
28 - Docking molecular da molécula ACHZ-CB no alvo DNA (PDB ID: 1G3X)



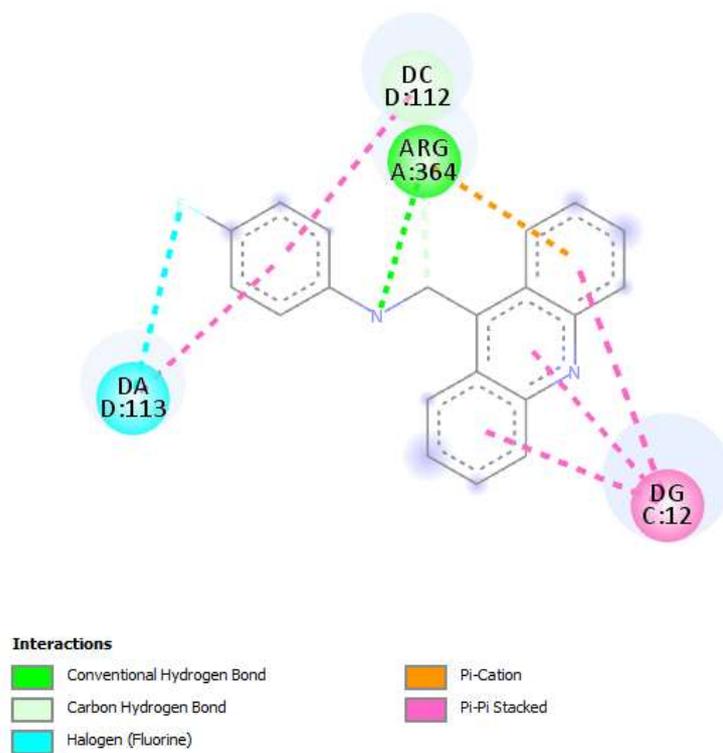
29 - Docking molecular da molécula MAC-01 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



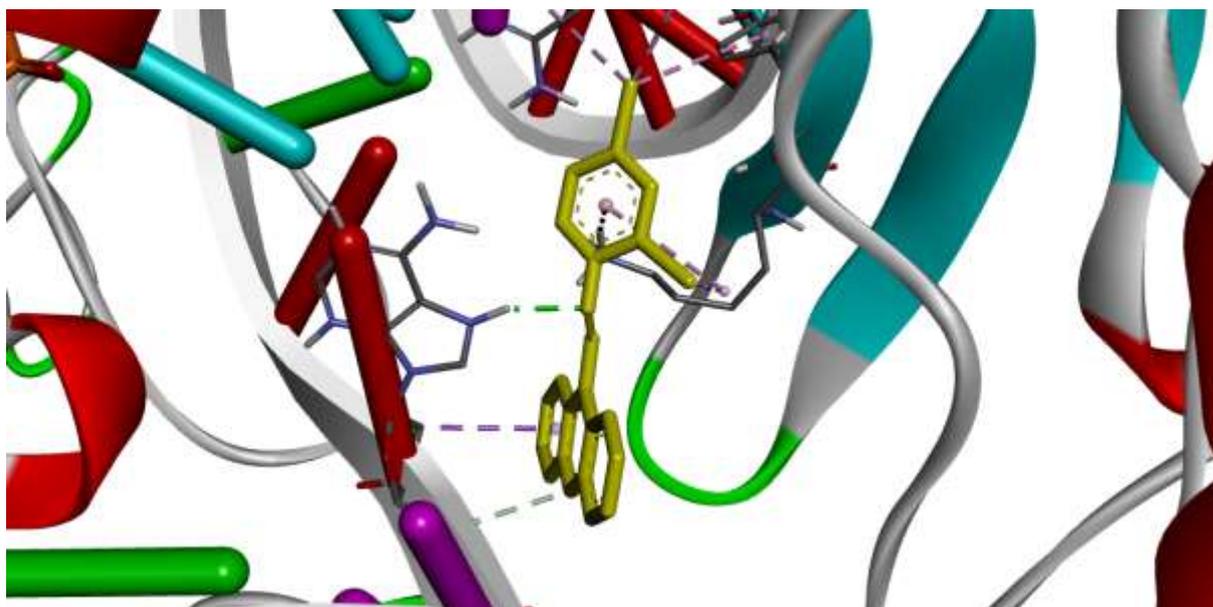
30 - Docking molecular da molécula MAC-02 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



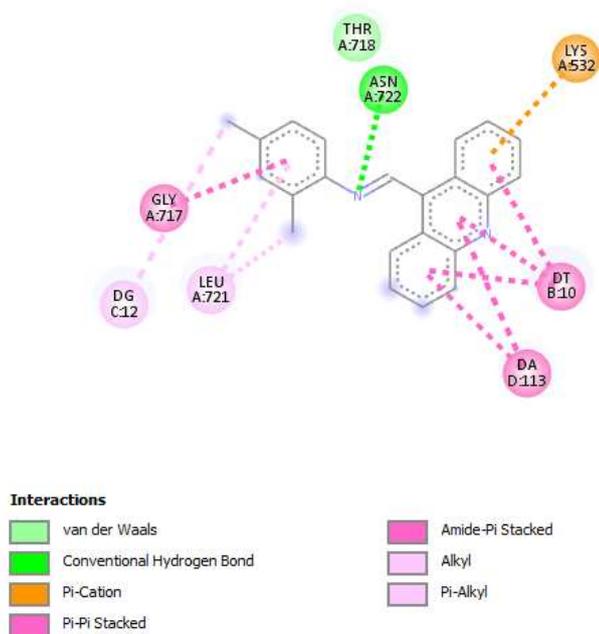
31 - Docking molecular da molécula MAC-03 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



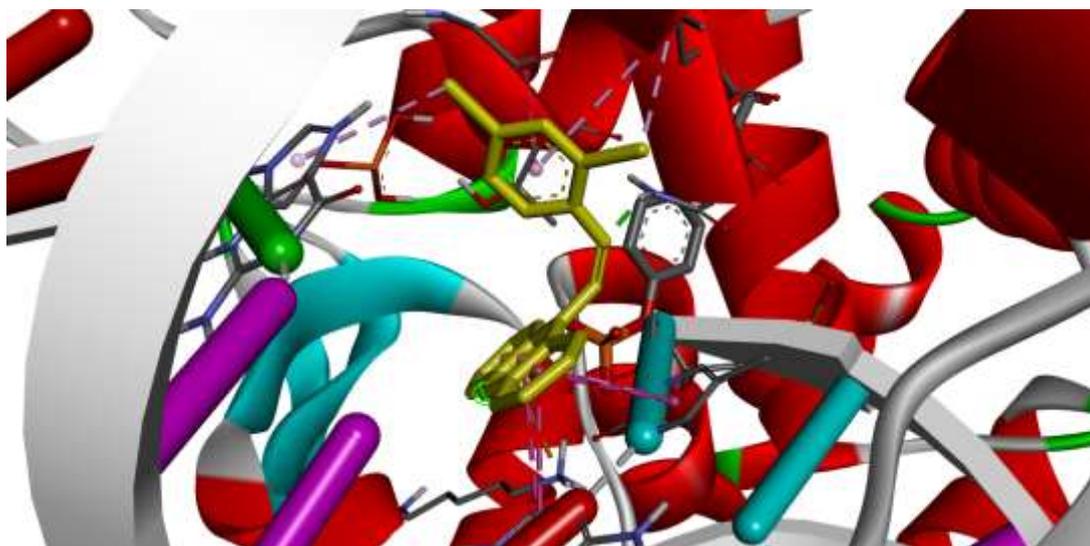
31 - Docking molecular em 3D da molécula MAC-07 (E) no alvo topoisomerase I complexada com DNA (PDB ID: 1K4T)



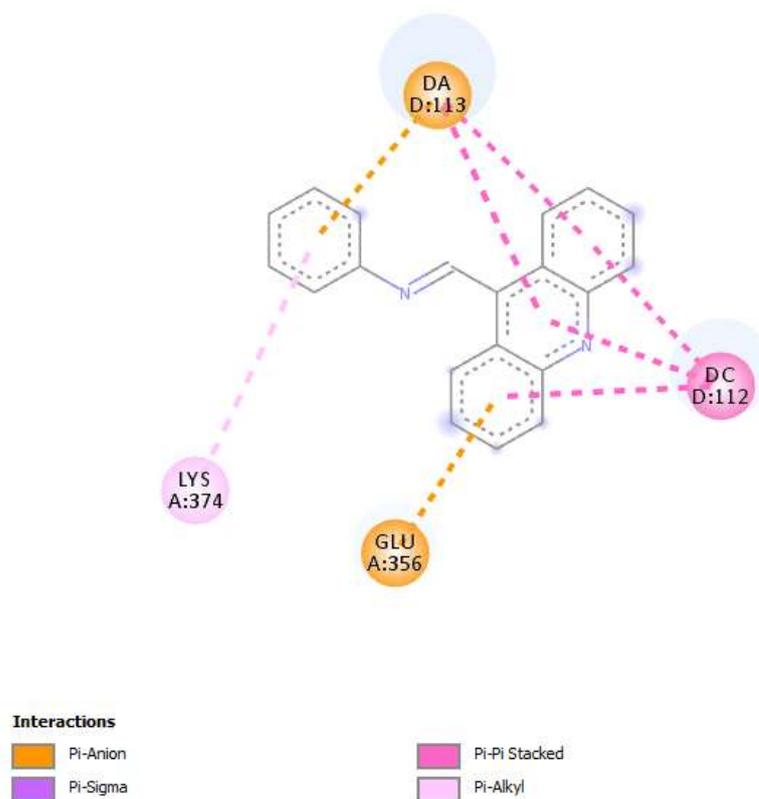
32 - Docking molecular da molécula MAC-07 (Z) no alvo topoisomerase I complexada com DNA (PDB ID: 1K4T)



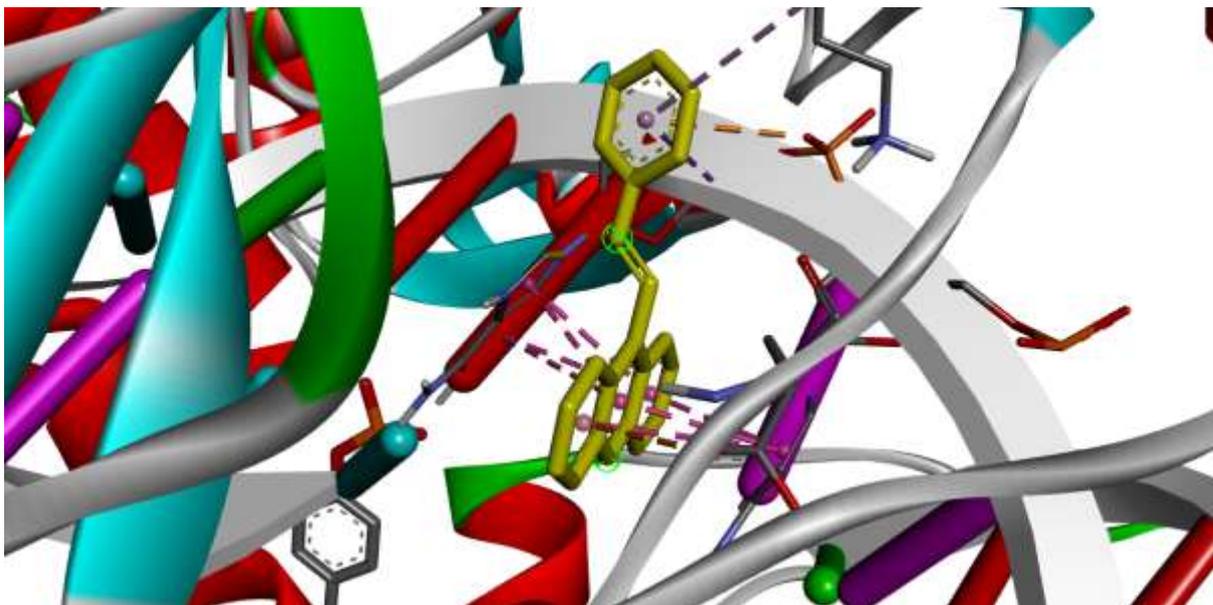
33 - *Docking* molecular em 3D da molécula MAC-07 (Z) no alvo topoisomerase I complexada com DNA (PDB ID: 1K4T)



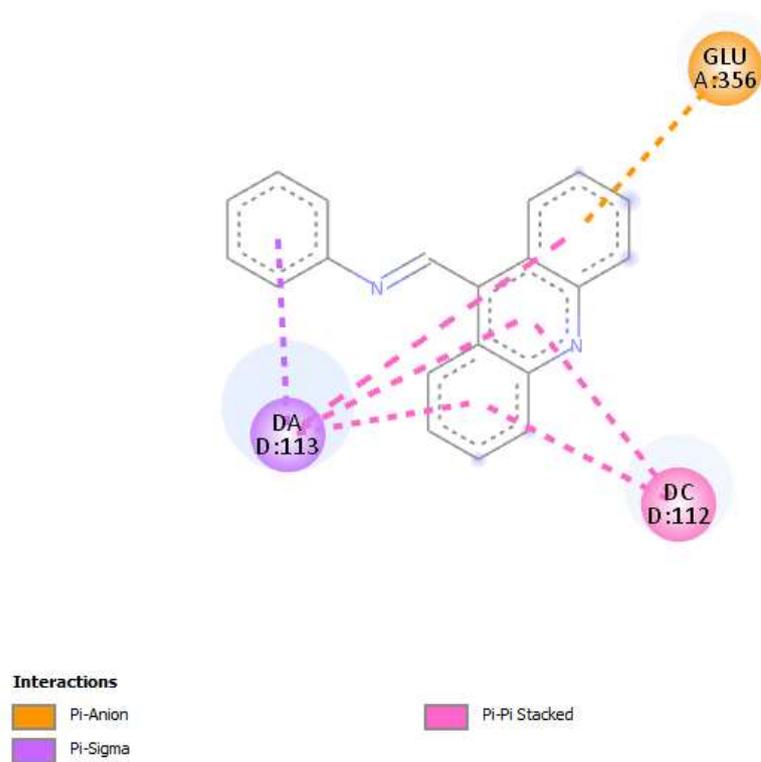
34 - *Docking* molecular do isômero (E) molécula MAC-08 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



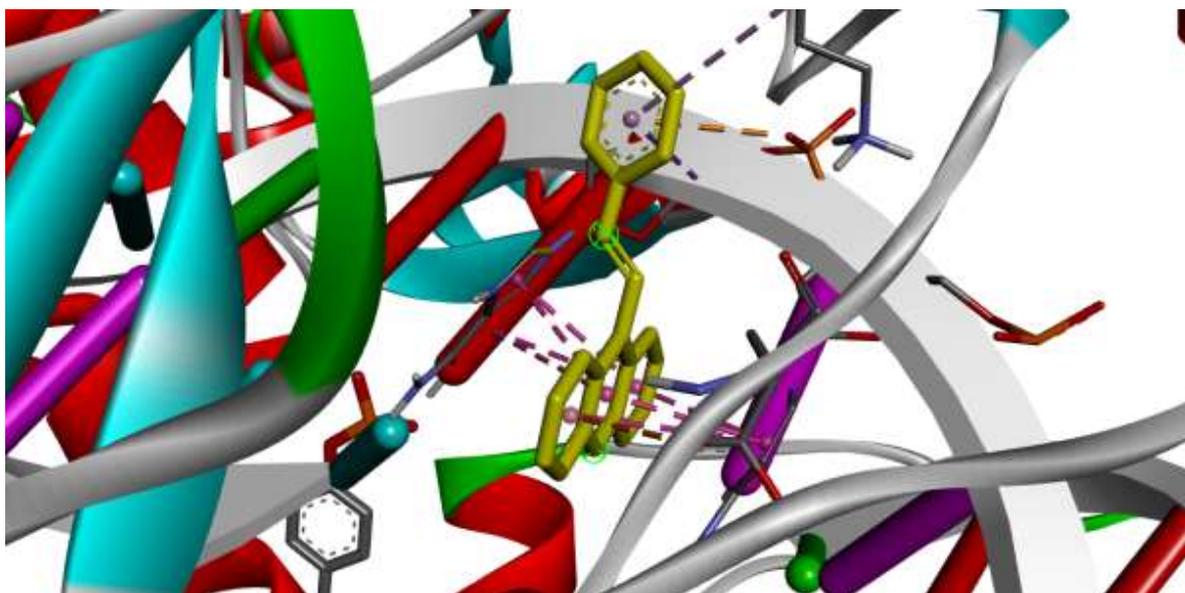
34 - *Docking* molecular em 3D do isômero (*E*) molécula MAC-08 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)



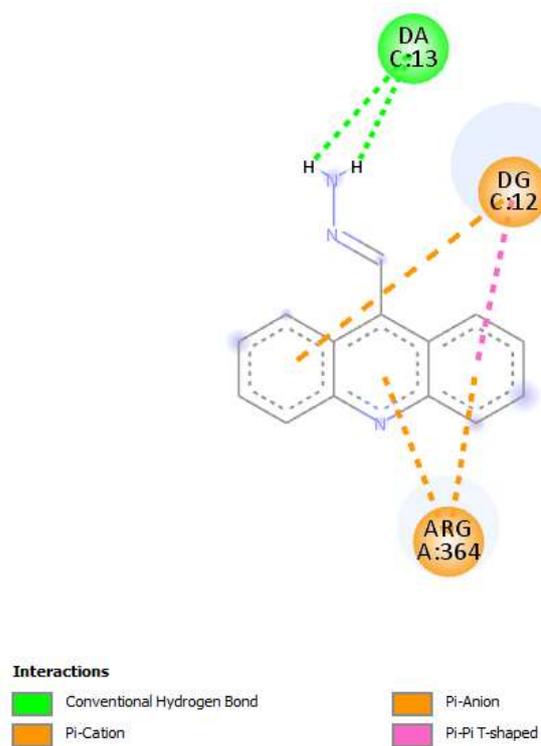
35 - *Docking* molecular do isômero (*Z*) molécula MAC-08 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)

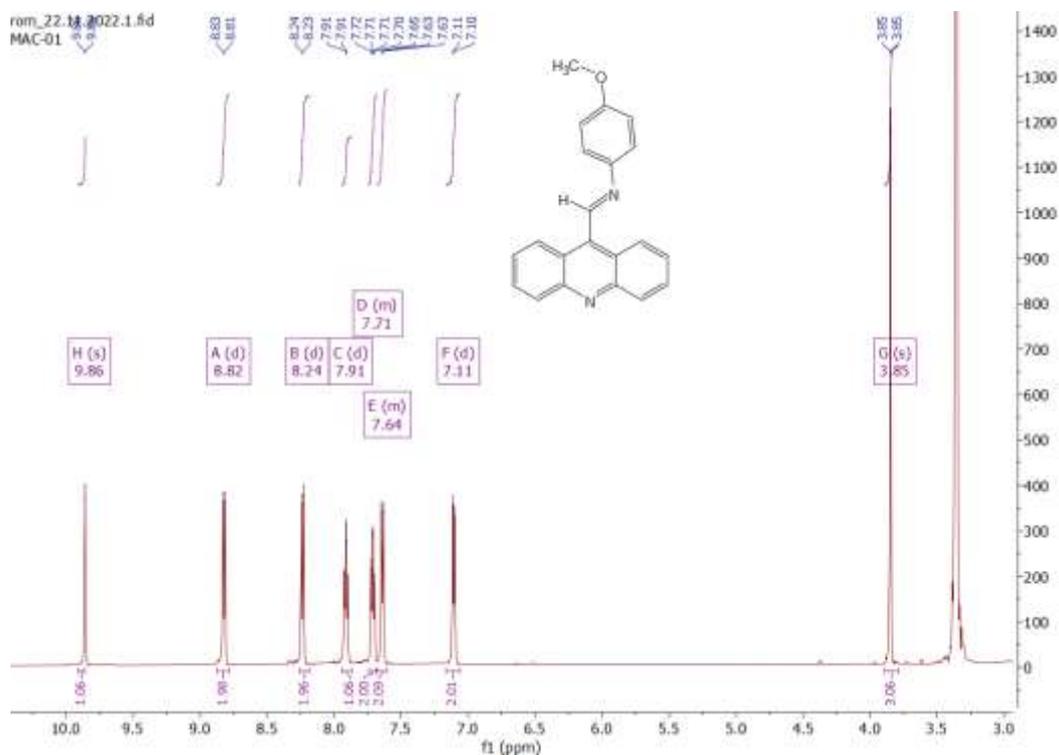
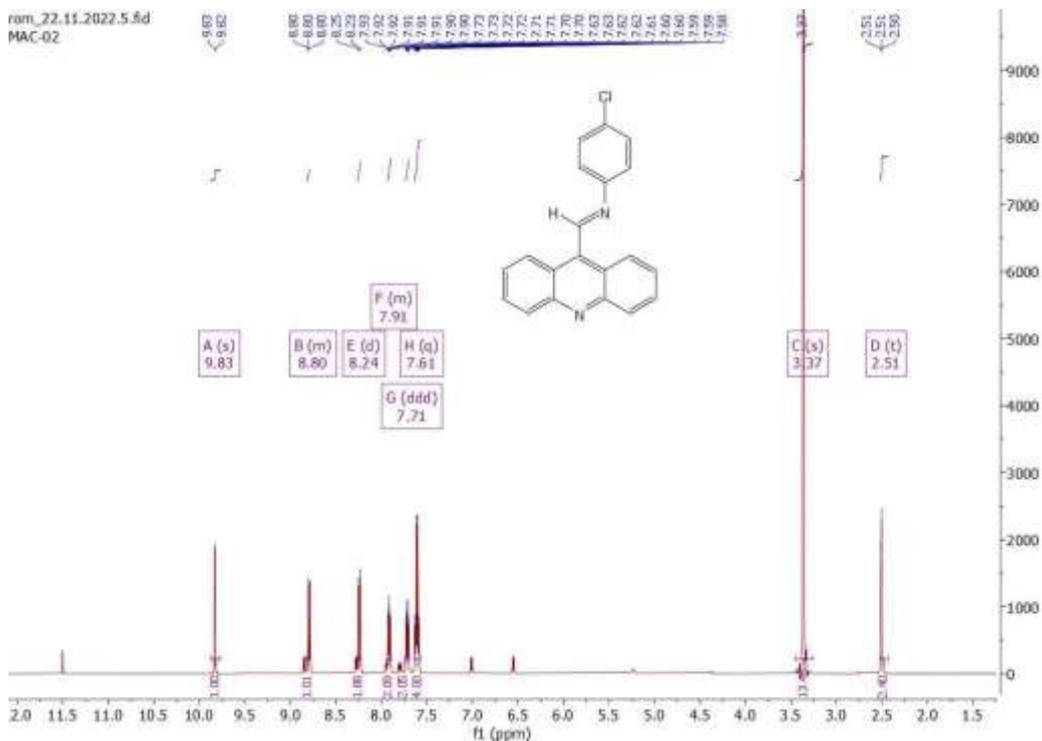


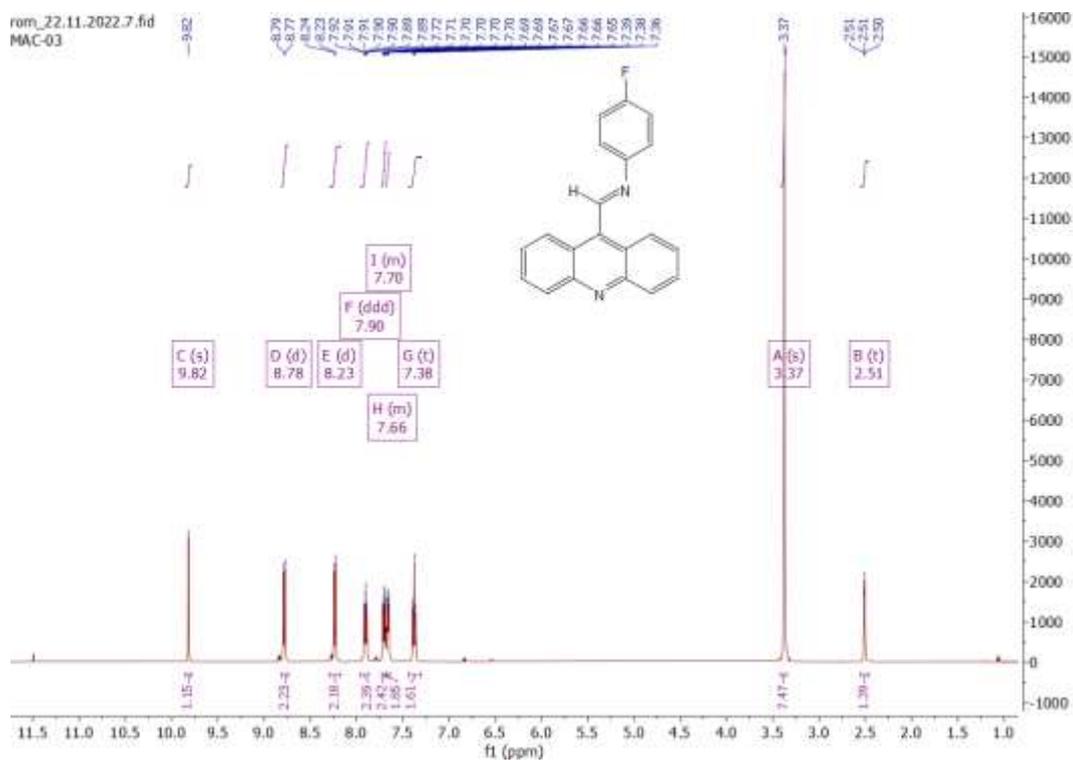
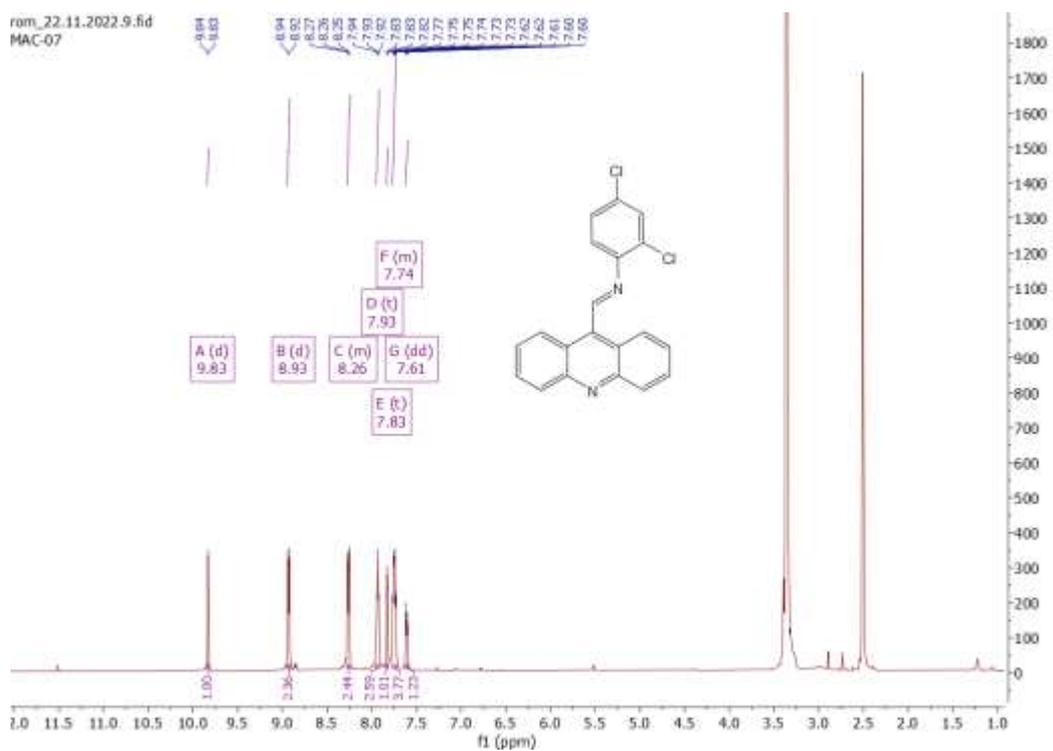
36 - Docking molecular em 3D do isômero (Z) molécula MAC-08 no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)

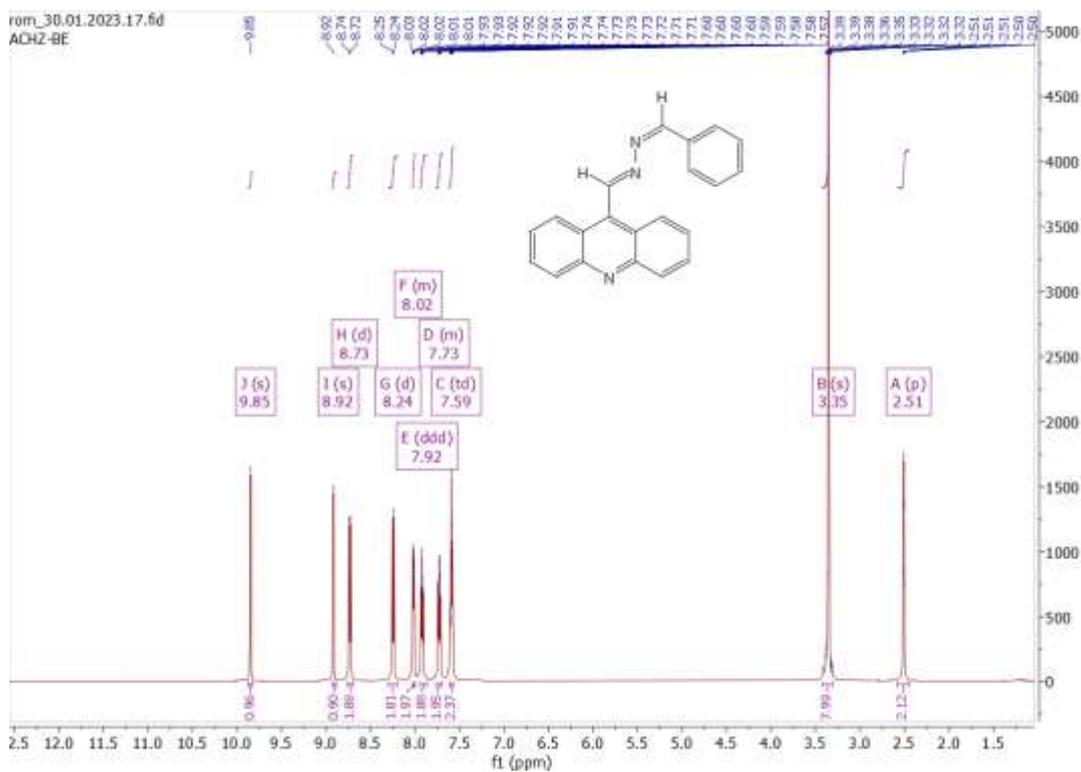
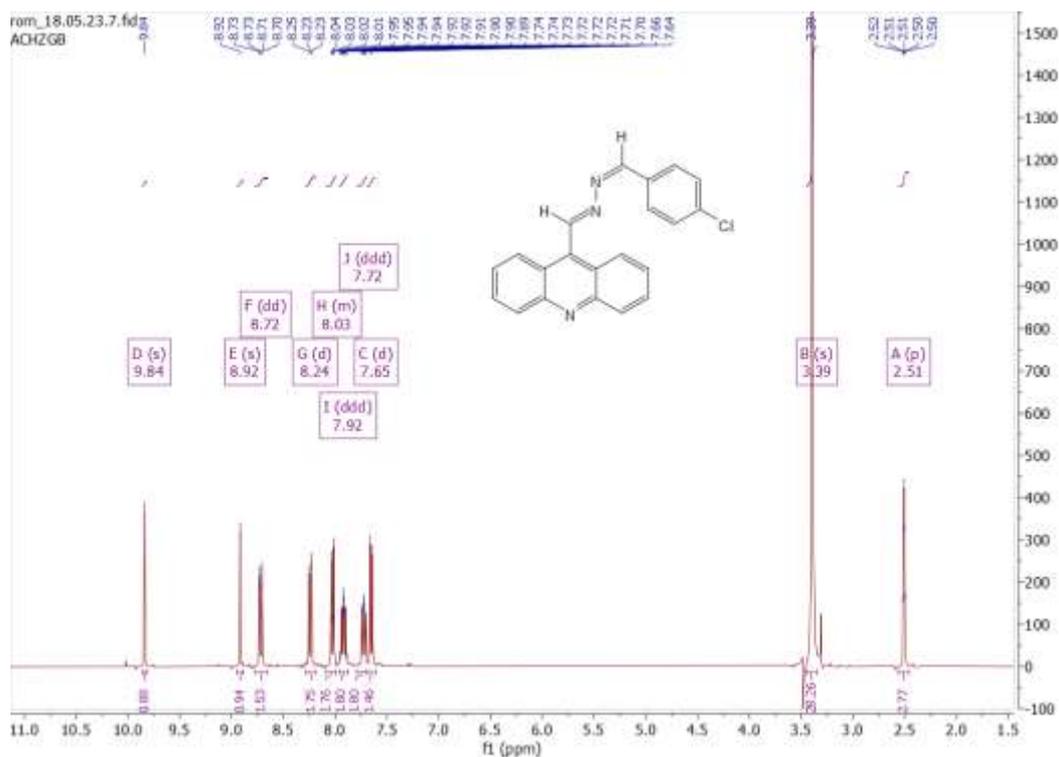


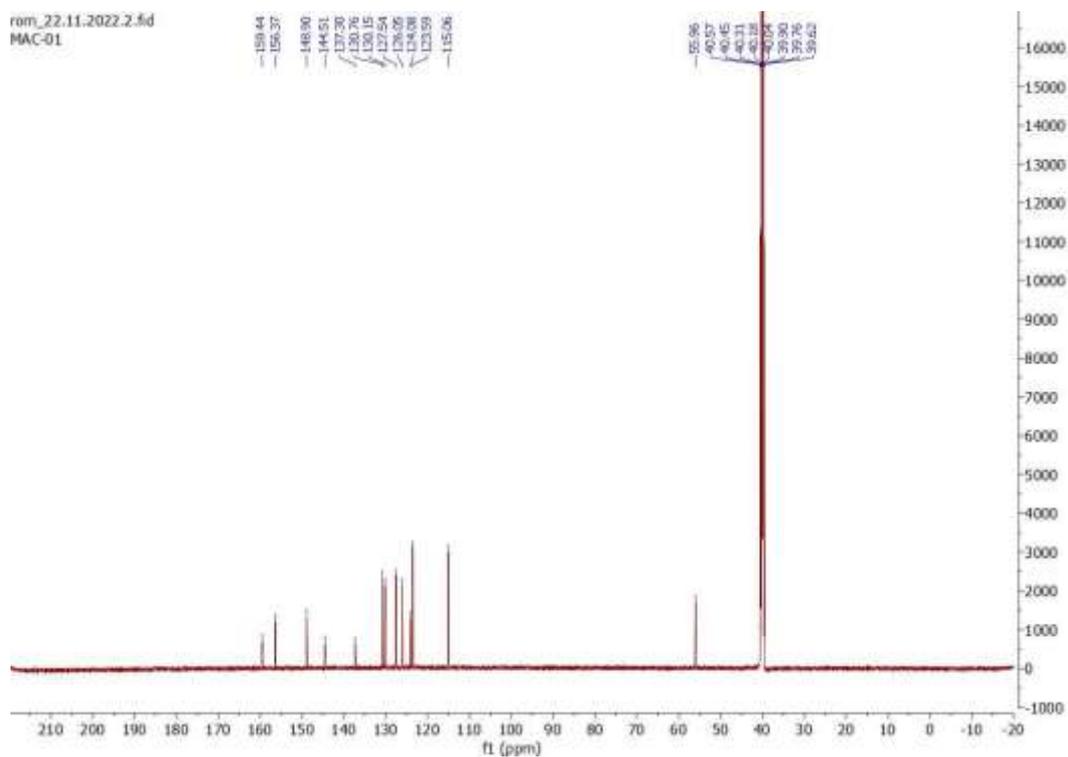
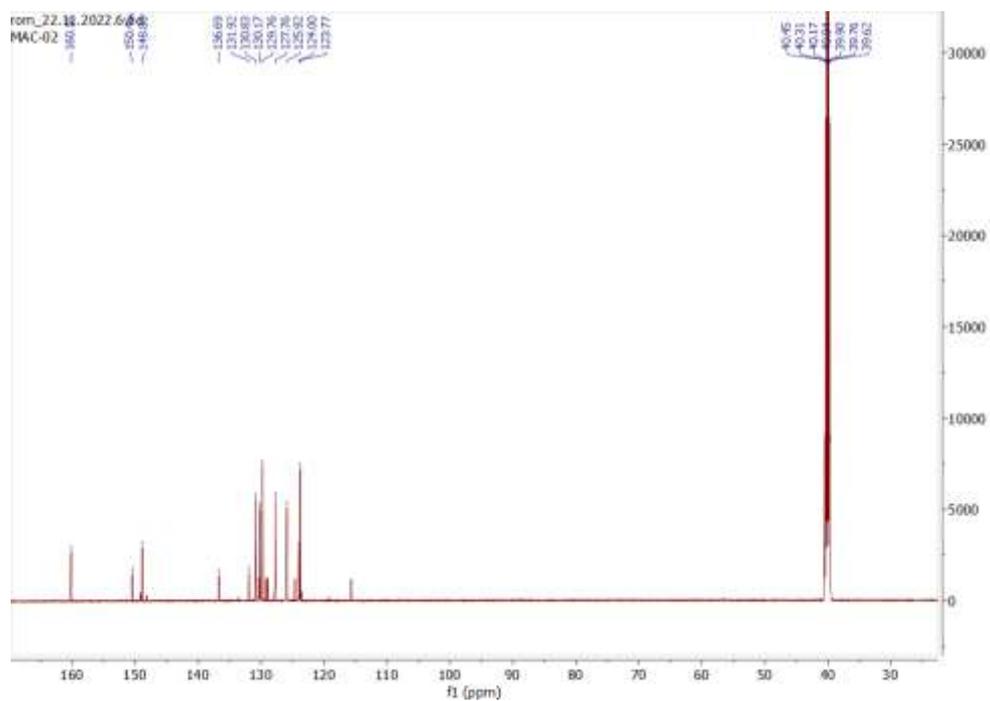
37- Docking molecular da molécula ACHZ no alvo Topoisomerase I (PDB ID: 1K4T)

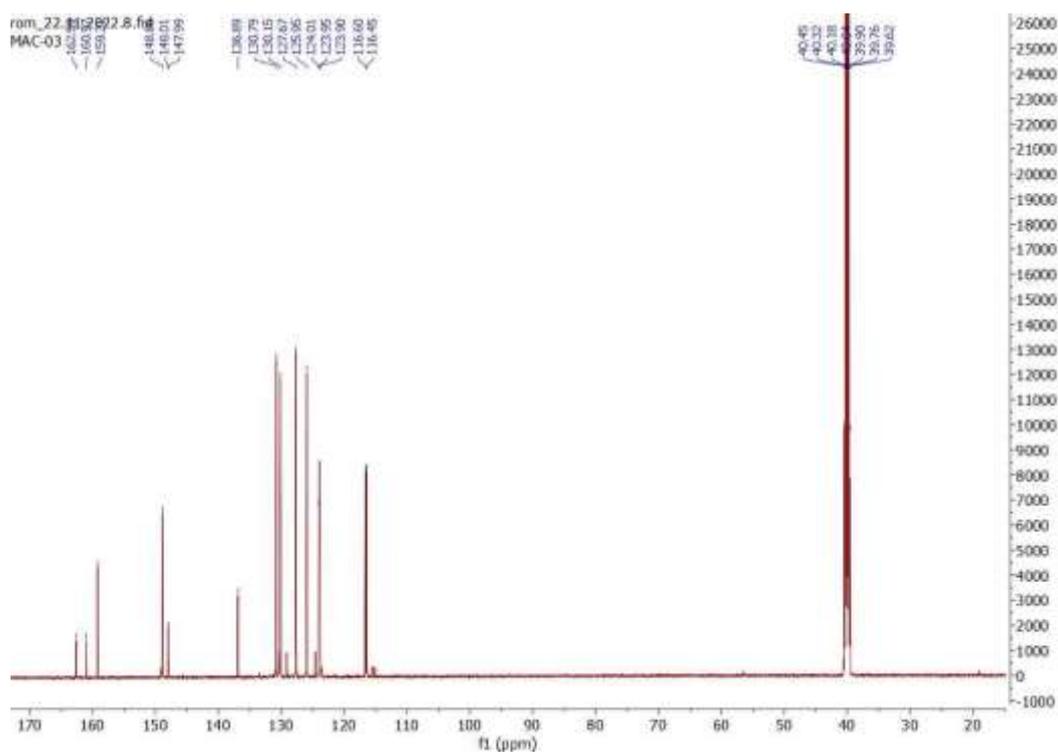
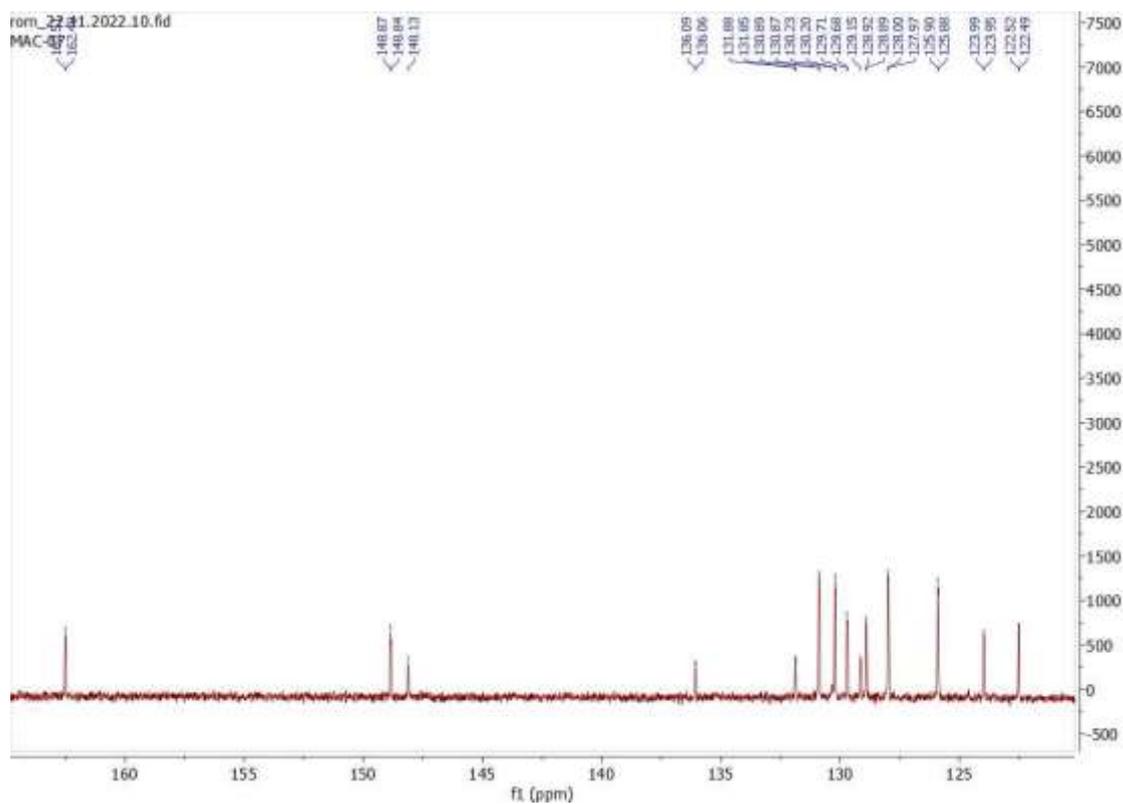


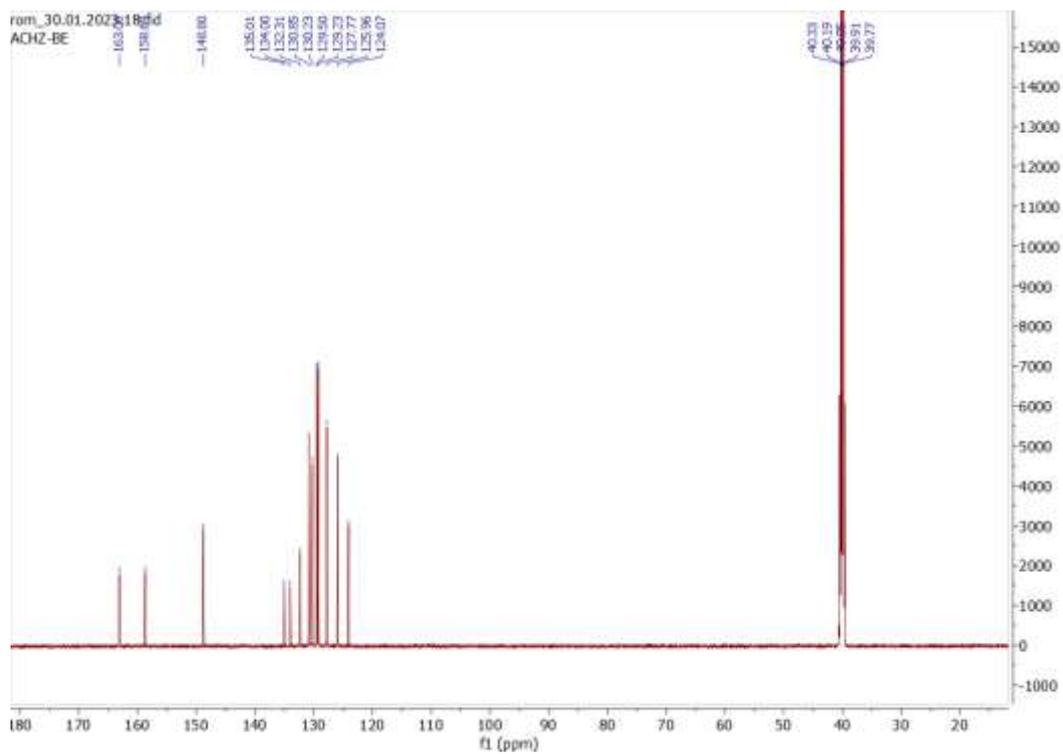
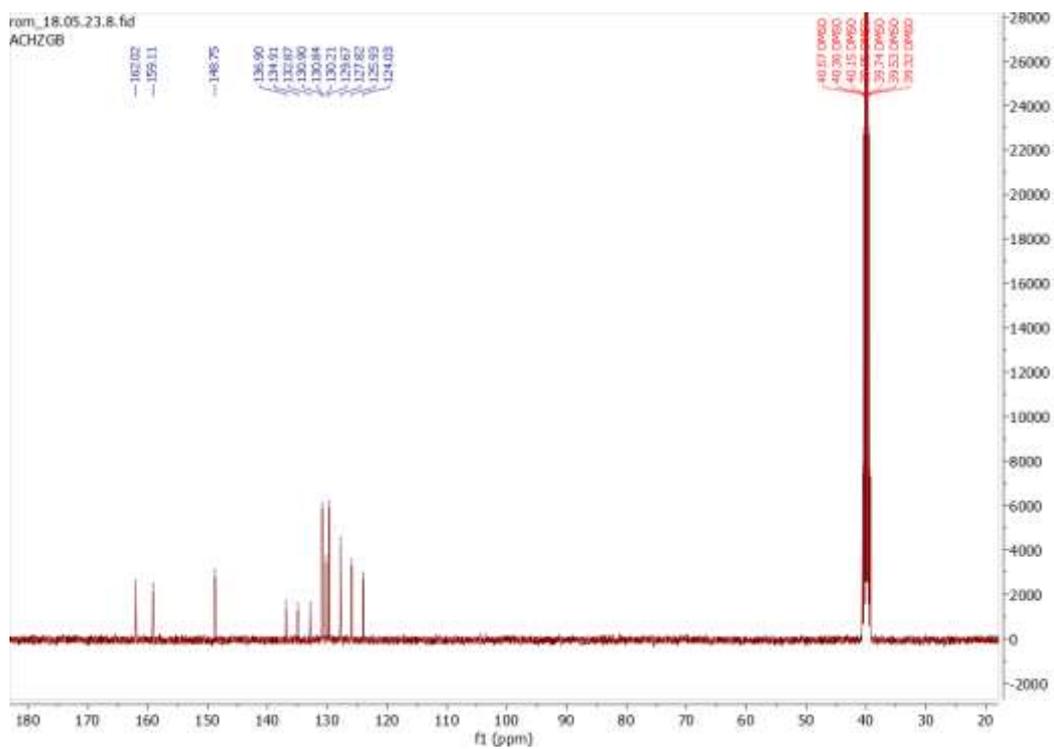
ANEXOS B - ESPECTROS DE RMN DE ^1H 38 – RMN de ^1H da molécula MAC-0139 – RMN de ^1H da molécula MAC-02

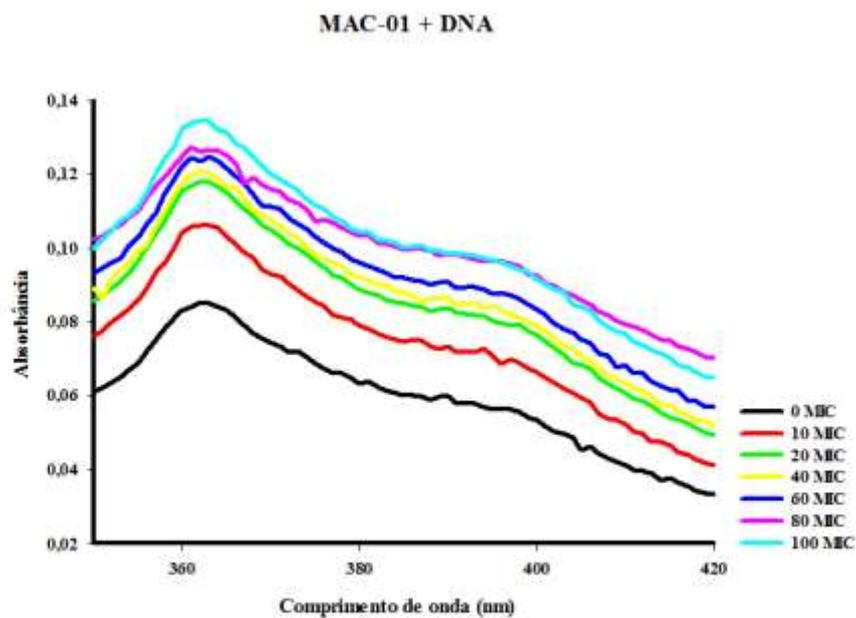
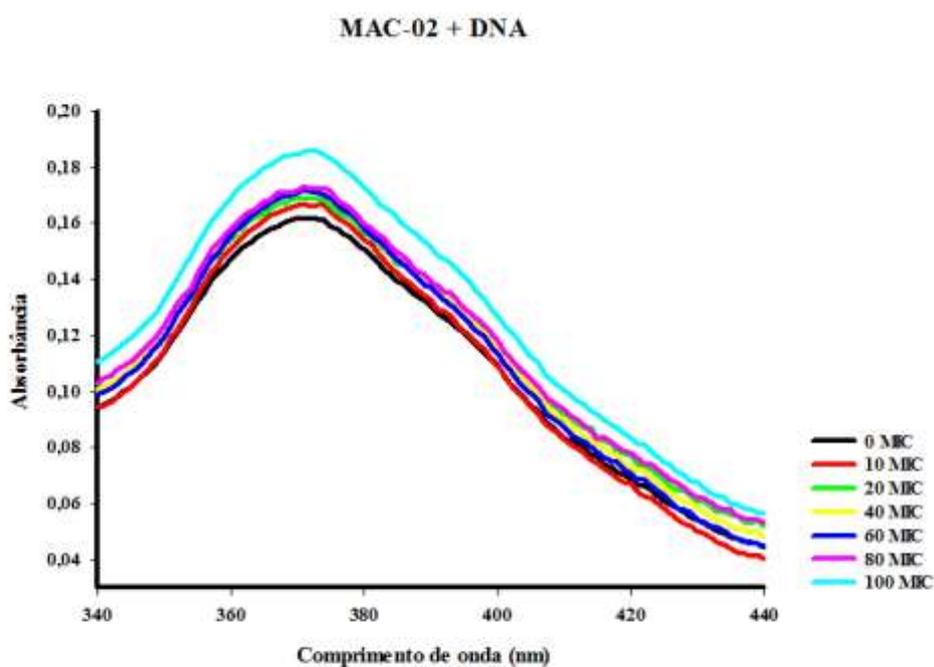
40 – RMN de ^1H da molécula MAC-0341 – RMN de ^1H da molécula MAC-07

42 – RMN de ^1H da molécula ACHZ-BE43 – RMN de ^1H da molécula ACHZ-CB

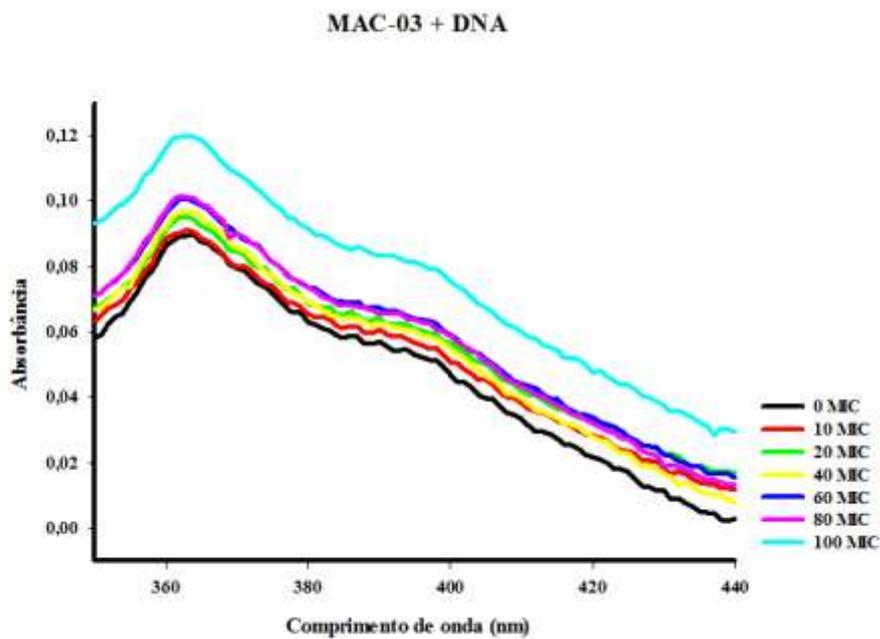
ANEXOS C - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C 44 – RMN de ^{13}C da molécula MAC-0145 – RMN de ^{13}C da molécula MAC-02

46 – RMN de ^{13}C da molécula MAC-0347 – RMN de ^{13}C da molécula MAC-07 aproximado

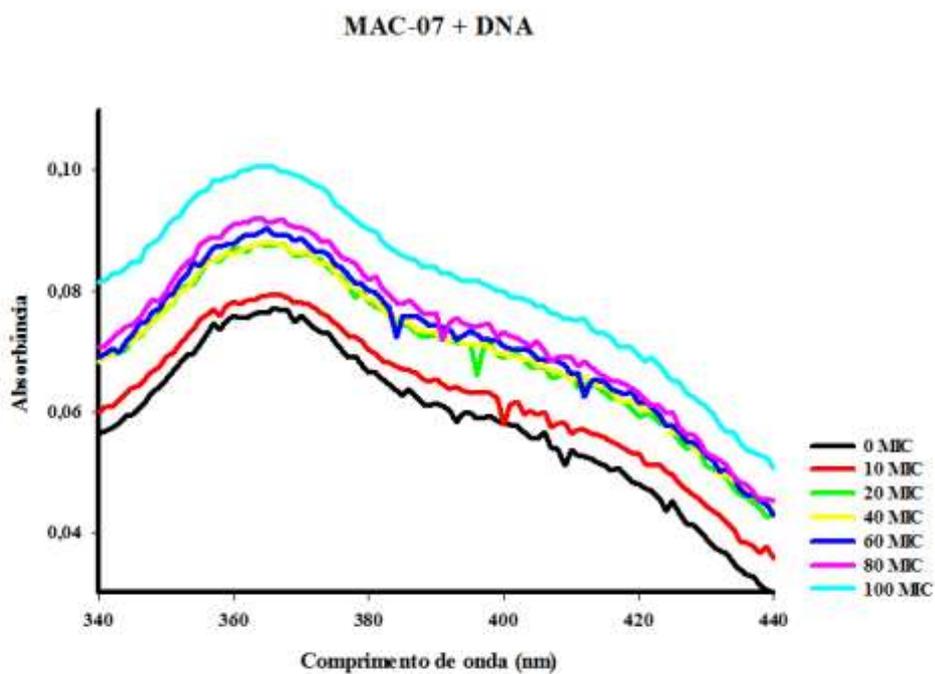
48– RMN de ^{13}C da molécula ACHZ-BE49 – RMN de ^{13}C da molécula ACHZ-CB

ANEXOS D - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS MOLÉCULA COM ssDNA**50 – Espectros de absorção do derivado MAC-01 com ssDNA****51 – Espectros de absorção do derivado MAC-02 com ssDNA**

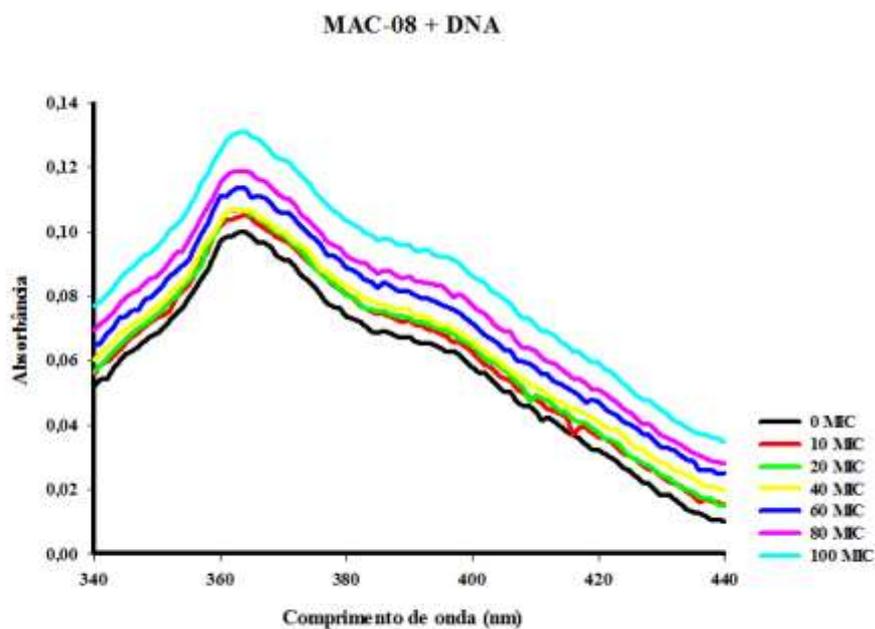
52 – Espectros de absorção do derivado MAC-03 com ssDNA



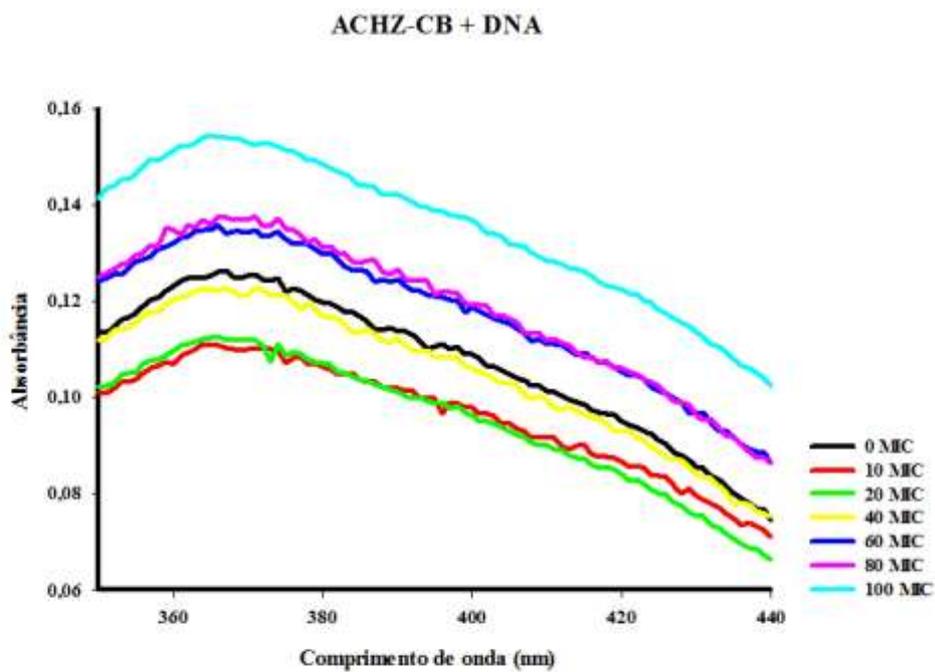
53 – Espectros de absorção do derivado MAC-07 com ssDNA

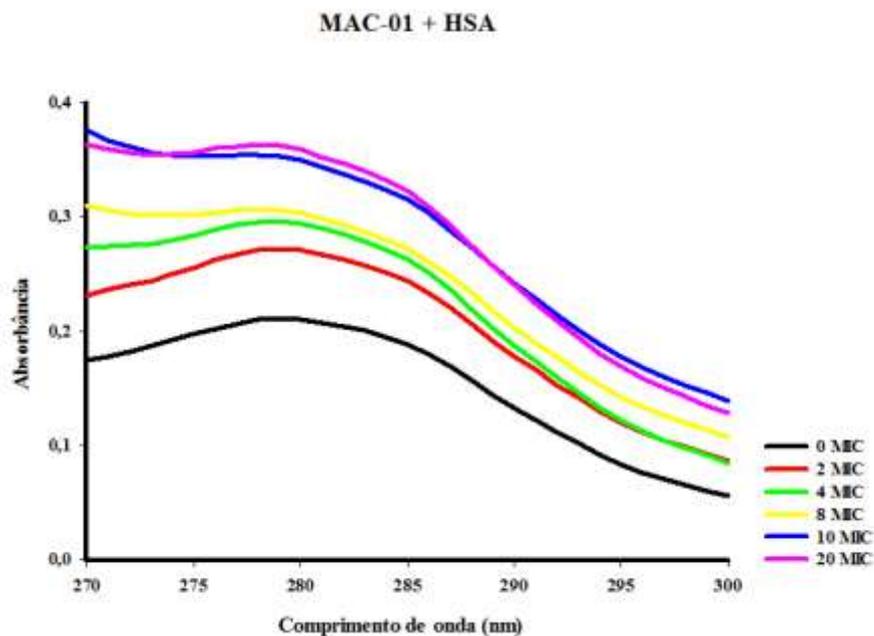
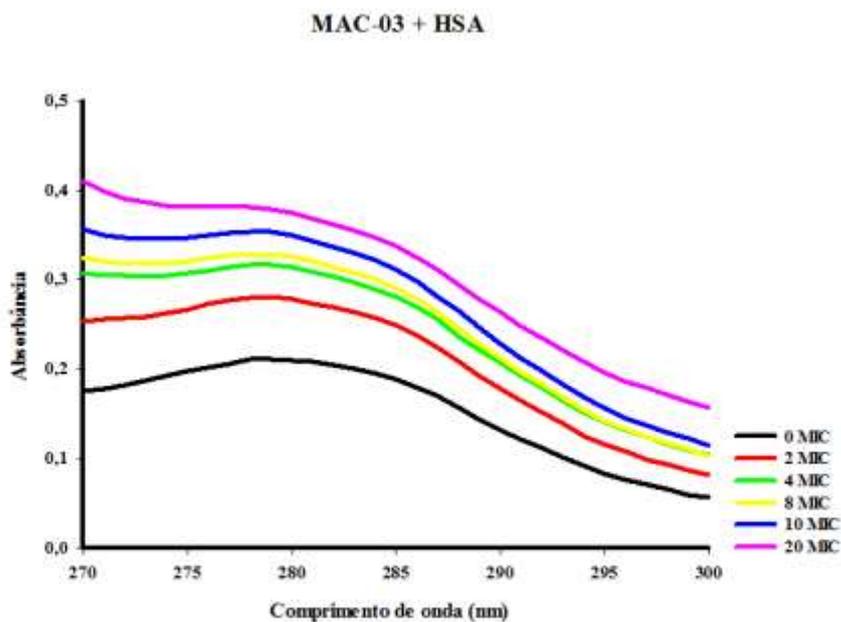


54 – Espectros de absorção do derivado MAC-08 com ssDNA

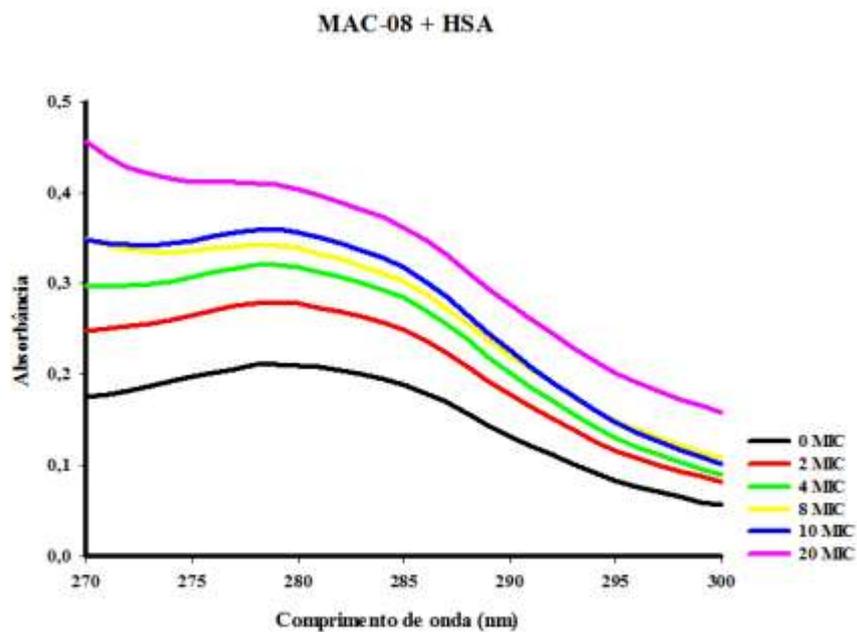


55 – Espectros de absorção do derivado ACHZ-CB com ssDNA

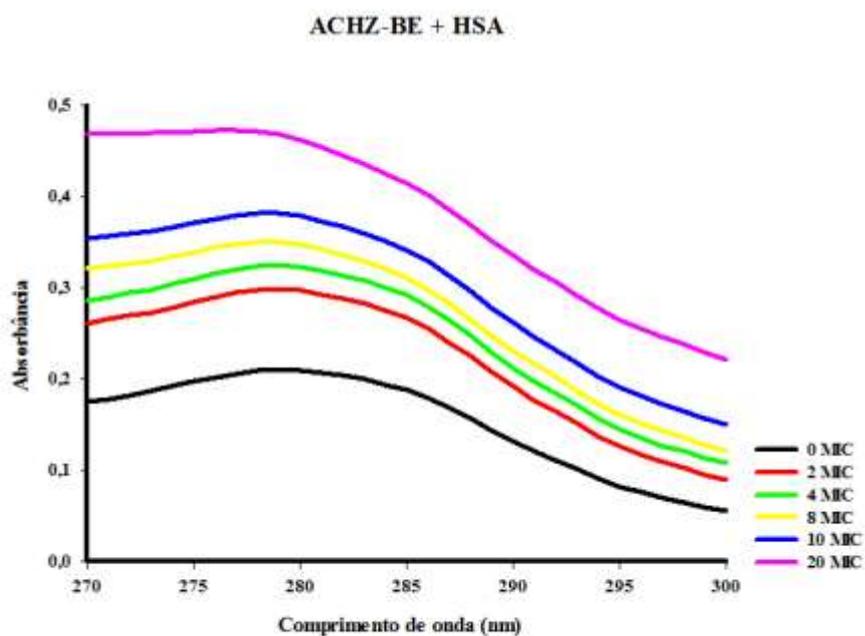


ANEXOS E - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS MOLÉCULAS COM HSA**56 – Espectros de absorção do derivado MAC-01 com HSA****57 – Espectros de absorção do derivado MAC-03 com HSA**

58 – Espectros de absorção do derivado MAC-08 com HSA



59 – Espectros de absorção do derivado ACHZ-BE com HSA



ANEXOS F – PRODUÇÃO INTELECTUAL

61 – Submissão de artigo como coautora

2014 Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Pharmaceutical Design, 2022, 28, 1388-1394

REVIEW ARTICLE



Topoisomerase Enzyme Inhibitors as Potential Drugs Against Cancer: What Makes Them Selective or Dual? – A Review



Jolly Nice Santana Gomes¹, Mirelly Barbosa Santos^{1,2}, Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva¹,
Sonaly Lima Albino² and Ricardo Olímpio de Moura¹

¹First Graduation in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil; ²Therapeutic Innovation Post-graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract: Topoisomerase inhibitors are extensively used in cancer chemotherapy. In the process of identifying novel anticancer compounds, biological evaluations are crucial and include, among others, the use of *in silico* and *in vitro* approaches. This work aimed to present recent research involving the obtention and *in silico* and *in vitro* evaluation of topoisomerase I, II, and double inhibitors, of synthetic and natural origin, as potential compounds against tumor cells, in addition to proposing the construction of a distinct enzyme catalytic site. Therefore, it was observed that most Topoisomerase I inhibitors presented medium to large structures, with a rigid portion and a flexible region. In contrast, Topoisomerase IIa inhibitors showed medium and large structural characteristics, in addition to the planarity of the aromatic rings, which are mitigated due to flexible rings but may also present elements that restrict conformation. Most compounds that exhibit dual inhibitory activity had relatively long chains, in addition to a flat and rigid portion suggestive of affinity for Topo I and a flexible region characteristic of selective drugs for Topo II. Besides, it is noticed that most compounds that exhibit dual inhibitory showed similarities in the types of interactions and amino acids when compared to the selective compounds of Topo I and II. For instance, selective Topoisomerase I inhibitors interact with Arginine364 residues, and selective Topoisomerase II inhibitors interact with Arginine487 residues, as both residues are targets for dual compounds.

ARTICLE HISTORY

Received: February 05, 2022
Accepted: April 12, 2022

DOI:
10.17713/CPD.2022.281388019

 CrossMark

62 – Submissão de artigo como coautora



Current Pharmaceutical Design

Editor-in-Chief >>

ISSN (Print): 1381-6128
ISSN (Online): 1873-4286

[Back](#)
[Journal](#)
[Subscribe](#)

Open Access Article

Application of Heterocycles as an Alternative for the Discovery of New Anti-ulcer Compounds: A Mini-Review

Author(s): Lucas Lihvars de Lócio¹, Agnita Pâmela Sordes do Nascimento¹, Mirelly Barbosa Santos¹, Jolly Nice Santana Gomes¹, Yvnni Maria Sales de Medeiros e Silva¹, Sonaly Lima Albino¹, Vanda Lúcia dos Santos¹ and Ricardo Olímpio de Moura¹

Volume 28, Issue 17, 2022

Published on: 21 June, 2022

Page: [1373 - 1388] Pages: 16

DOI: 10.2174/1381612828068230512099509

Price: \$65

