

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE  
TOPOISOMERASE I DE DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS E IMIDAZACRIDÍNICOS**

**Recife – 2012**

**ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE  
TOPOISOMERASE I DE DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS E IMIDAZACRIDÍNICOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal de  
Pernambuco, para a obtenção do Título em  
Mestre em Ciências farmacêuticas na área de  
Síntese e Planejamento de Fármacos.**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima**

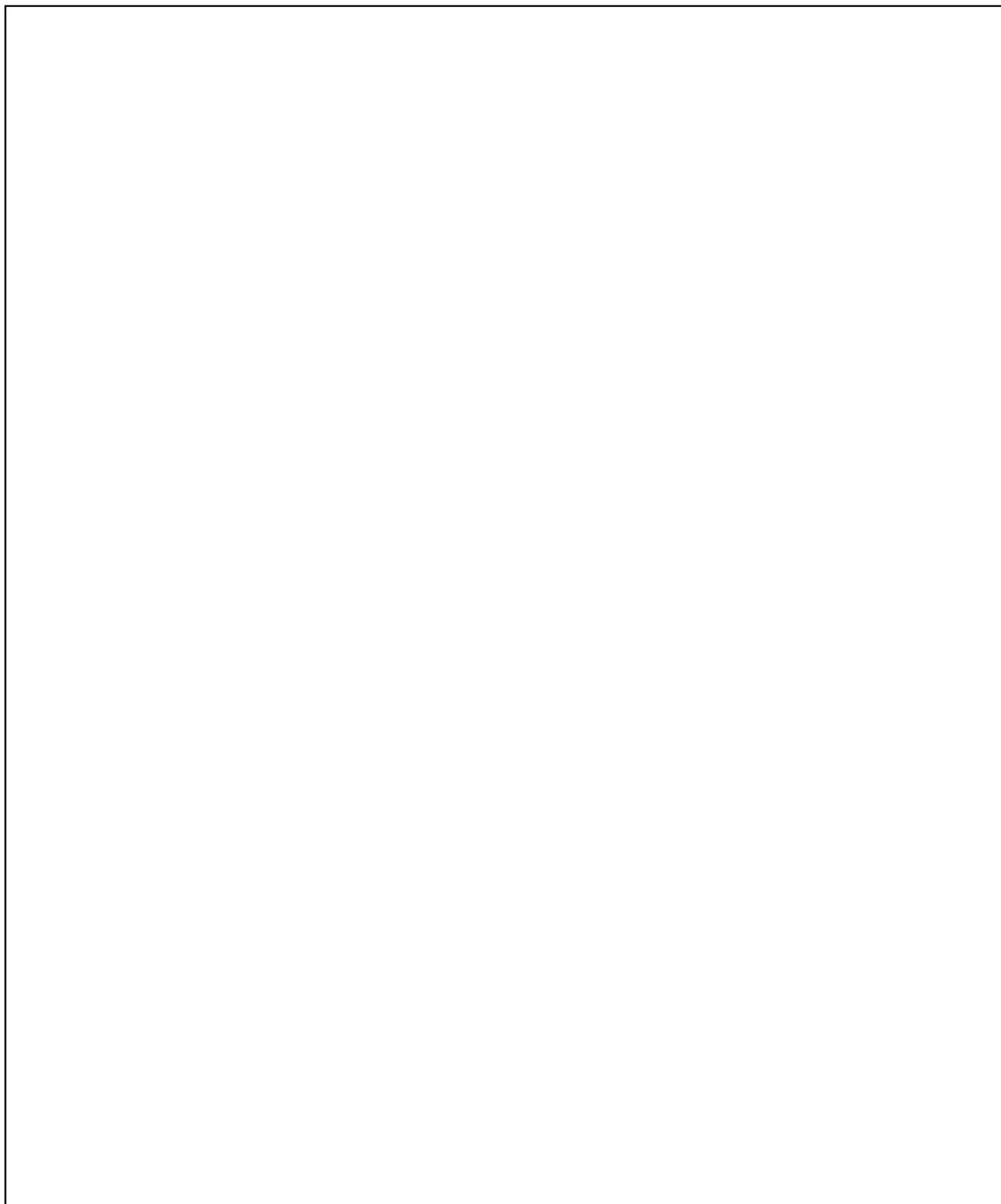
**Co-orientadora:**

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva**

**Recife – 2012**

LAFAYETTE, E. A.	ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TOPOISOMERASE I DE DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS E IMIDAZACRIDÍNICOS		Mestre PPGCF/UFPE 2012
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. José Tadeu Pinheiros

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dalci José Brondanni

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LAFAYETTE, E. A.

Título: ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA E INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TOPOISOMERASE I DE DERIVADOS TIAZACRIDÍNICOS E IMIDAZACRIDÍNICOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências farmacêuticas na área de Síntese e Planejamento de Fármacos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Severino Alves Junior

Instituição: Departamento de Química Fundamental - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Instituição: Departamento de Farmácia - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: PNP/CAPEL - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Recife - 2012

*A Deus por iluminar sempre o meu caminho.*

*Aos meus pais, Maria das Graças e José Gileno, pelo amor, exemplo de vida e ensinamentos valiosos na minha formação pessoal.*

*Aos meus irmãos, Gustavo e Gisana, pela paciência e compreensão durante anos.*

*Ao meu sobrinho Guilherme e afilhado Miguel, que estão ainda a iniciar seu caminho na busca pelos seus sonhos, mas com pequenos gestos, muito já me ensinaram.*

*Ao meu namorado Daniel, por todo seu amor e exemplo de força e dedicação.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força concedida diante dos obstáculos da vida, me proporcionado clareza e determinação nas horas necessárias.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Alves de Lima, minha admiração e gratidão pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, paciência, incentivo e confiança construída ao longo deste caminho.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr. e ao Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, pela parceria, apoio e confiança importantes na execução de atividades essenciais para este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Suely Lins Galdino (*in memoriam*) e ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta pela disponibilidade de desenvolver o projeto.

Aos meus pais, Maria das Graças e José Gileno, pelo amor, confiança e incentivo na busca dos meus objetivos e por todo apoio que me conduziram ao sucesso profissional.

Aos meus irmãos Gustavo e Gisana pela paciência, incentivo e compreensão de minha ausência em alguns momentos.

Ao meu namorado, Daniel, por todo amor e carinho durante todos esses anos, pelo companheirismo, incentivo e paciência no auxílio da minha realização profissional.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial aos professores do Mestrado que contribuíram para enriquecer meu conhecimento.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE pela disponibilidade de execução de alguns experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), entre eles Antônio Sergio, Cleiton Diniz, César, Felipe, Jamerson Oliveira, Luiz Carlos, Sandra Sarinho, Tiago Bento, Talita, Vinicius Barros e Willians Leal, pela convivência diária, momentos compartilhados e ajuda no decorrer da elaboração deste trabalho.

À Sinara Almeida, em especial, pela amizade conquistada, momentos de estudo e descontração, e por todo incentivo e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do LIKA, pela disponibilidade de ajuda durante as atividades realizadas.

A toda minha família, tios e primos pelo amor e carinho sempre demonstrados e pela compreensão de minha ausência em alguns momentos familiares.

Aos meus amigos que não fazem parte da minha vida científica acadêmica, mas que estiveram sempre aptos a ajudar e torcer pela minha conquista.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pelo apoio financeiro, que contribuiu para o bom desenvolvimento deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do anel acridínico.	25
Figura 2 – Estrutura química da proflavina, acriflavina e mepacrina.	26
Figura 3 – Estrutura química da amsacrina e asulacrina.	27
Figura 4 – Estrutura química do DACA análogos.	27
Figura 5 – Derivados tiazacridínicos antitumorais.	33
Figura 6 – Derivados acridínicos anti-inflamatório.	33
Figura 7 – Estrutura química do 2-metóxi- <i>N</i> -(2-(tiofeno-2-il)acridin-9-amina.	34
Figura 8 – Derivados acridínicos como agentes anti-maláricos.	34
Figura 9 – Estrutura química da 9-aminoacridina.	35
Figura 10 – Análogos da acridina e acridona anti-virais.	35
Figura 11 – Padrões de interações de hidrogênio nos pares de bases.	36
Figura 12 – Aspectos da interação de moléculas ao DNA.	37
Figura 13 – Espectro de absorção da tiazacridina.	38
Figura 14 – Espectro de absorção da metformina.	39
Figura 15 – Espectro emissão da fluorescência.	41
Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular da artemisina-acridina.	42
Figura 17 – Estrutura do DNA com especificações dos sulcos maior e menor.	44
Figura 18 – Estruturas químicas de moléculas ligantes em sulco do DNA.	45
Figura 19 – Estrutura química de poliaminas.	46
Figura 20 – Estrutura química do derivado espermina-acridina.	46
Figura 21 – Interação ao sulco do DNA da 9-fenilacridina.	47
Figura 22 – Estruturas químicas de compostos intercaladores ao DNA.	48
Figura 23 – Estrutura química do derivado <i>bis</i> -acridina.	49
Figura 24 – Representação esquemática da interação ao DNA de moléculas contendo duas unidades funcionais: (A) <i>Bis</i> -intercalação; (B) Mono-intercalação; (C) <i>Bis</i> -intercalação com violação do princípio de exclusão do vizinho.	49
Figura 25 – Derivados acridínicos: (A) <i>bis</i> -imidazolidínico; (B) <i>bis</i> -guanidino.	50
Figura 26 – Estrutura química do DAPI.	51
Figura 27 – Estrutura química do ACMA.	51

- Figura 28 – Estrutura do complexo Pt(II): 3,6-diamino-9-[6,6-*bis*(2-aminoetil)-1,6-diaminohexil]acridina. 52
- Figura 29 – Inibidores da topoisomerase I: (A) Camptotecina; (B) Topotecano (C) Irinotecano. 54
- Figura 30 – Estrutura química de moléculas ligantes em sulco inibidores da topoisomerase I. 55
- Figura 31 – Derivados acridínicos inibidores da topoisomerase II. 55
- Figura 32 – Estudo de modelagem molecular de: (A) 9-arylacridina com Topoisomerase I; (B) 9-arylacridina com complexo DNA-topoisomerase I. 56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constante de ligação de moléculas associadas ao DNA.	43
-----------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Síntese de Bernthsen.	28
Esquema 2 – Síntese do ácido 9-acridina-propionico.	29
Esquema 3 – Síntese de 4-(acridin-9-ilmetil)-2 <i>H</i> -(cromen substituída)-2-ona.	29
Esquema 4 – Síntese da 9-metilacridina, método de Friendlander.	30
Esquema 5 – Síntese da 9-metilacridina.	30
Esquema 6 – Reação da formação de sais de acridina.	31
Esquema 7 – Reação de oxidação de acridinas.	31
Esquema 8 – Síntese da 9-acrinaldeido.	31
Esquema 9 – Reação de redução da acridina.	32
Esquema 10 – Reação de redução de acridona a acridina.	32
Esquema 11 – Síntese do éster 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila.	32
Esquema 12 – Síntese de tiazacridinas.	33
Esquema 13 – Reação de transesterificação envolvendo a topoisomerase I.	54
Esquema 14 – Diagrama de síntese dos derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos.	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

UV-vis – Ultravioleta-visível

DACA – N-[2-(dimetil-amino)etil]acridina-4-carboxamida

THF – Tetrahydrofurano

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

RMN <sup>31</sup>P – Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo 31

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

CD – Dicroísmo Circular

ACPH – 9-fenilacridina

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole

ACMA – 9-amino-6-cloro-2-metoxi-acridina

FDA – Food and Drug Administration

AMSA – N-[4-(acridin-9-ilamino-mtoxi-fenil)]-metanosulfonamida

K<sub>b</sub> – Constante de Ligação

PCC – Clorocromato de Piridínio

## RESUMO

Muitos agentes terapêuticos essenciais no tratamento de diversas doenças atuam através da sua capacidade de interagir com o DNA. Esta interação pode muitas vezes levar à uma alteração nas propriedades estruturais e funcionais do DNA, o que influencia sobre suas funções fisiológicas e causa apoptose celular. Compostos com uma estrutura aromática policíclica, tais como acridina e seus derivados são conhecidos por interagir com o DNA e apresentar aplicações clínicas importantes, especialmente como antitumoral. Além de, atuarem através da inibição da atividade da enzima topoisomerase, bloqueando processos de replicação e transcrição do DNA, o que causa destruição das células. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos para estudo da ligação ao DNA e da inibição da topoisomerase I. Todos os compostos tiveram suas estruturas elucidadas e comprovadas por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IV e LC-MS. A análise da ligação ao DNA foi realizada através da espectroscopia de absorção, fluorescência e dicroísmo circular e o estudo da topoisomerase por eletroforese em gel de agarose. Os espectros de Uv-vis, fluorescência e de dicroísmo circular mostraram que os derivados interagem com o DNA tanto por ligação externa quanto por intercalação, apresentando constantes de ligação entre  $1.46 - 6.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . O ensaio com a topoisomerase I evidenciou que em concentrações a partir de 200  $\mu\text{M}$ , estes compostos apresentam a capacidade de inibir a enzima topoisomerase I humana. Tais resultados permitiram evidenciar um mecanismo de ligação ao DNA com as tiazacridinas e imidazacridinas, refletindo o que é visto na literatura e revelando que, estes derivados, são promissores no desenvolvimento de novos agentes análogos de acridina com potenciais sítios de ligação ao DNA.

Palavras-chave: tiazacridinas, imidazacridina, ligação ao DNA, inibição da topoisomerase I.

## ABSTRACT

Many essential therapeutic agents in the treatment of several diseases act through their ability to interact with DNA. This interaction can often lead to a change in the structural and functional properties of DNA, which impacts on their physiological functions and cause cell apoptosis. Compounds containing a polycyclic aromatic structure, such as acridines and its derivatives are known to interact with DNA and provide important clinical applications, especially as antitumour. Besides, act through inhibition of topoisomerase enzyme activity by blocking transcription and replication processes of DNA, which causes destruction of cells. Thus, this work objective at the synthesis and characterization of derivatives thiazacridines and imidazacridine to study binding to DNA and inhibition of topoisomerase I. All compounds had their structure elucidated by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR and LC-MS. Analysis of DNA binding was performed by absorbance, fluorescence spectroscopy and circular dichroism, and topoisomerase study by electrophoresis on agarose gel. The spectra of UV-vis, fluorescence and circular dichroism showed that derivatives interact with DNA by link both externally and by intercalation, with binding constants between  $1.46$  and  $6.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . The assay with topoisomerase I showed that in concentrations from  $200 \mu\text{M}$ , these compounds have the ability to inhibit the enzyme topoisomerase I human. Such results have highlighted a mechanism for DNA binding to thiazacridines and imidazacrine, reflecting what is seen in the literature and revealing that these derivatives are promising for the development of new agents acridine analogs with potential DNA binding sites.

Keywords: thiazacridine, imidazacridine, DNA binding, topoisomerase I inhibitor.

## SUMÁRIO

Agradecimentos	VIII
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XII
Lista de Esquemas	XIII
Lista de Siglas e Abreviaturas	XIV
Resumo	XV
Abstract	XVI
1 Introdução	19
2 Objetivos	22
2.1 Objetivos Gerais	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 Revisão de Literatura	24
3.1 Acridina e seus derivados	25
3.2 Química das Acridinas	28
3.3 Outras Aplicações do Núcleo Acridínico	33
3.4 Estudos da interação ao DNA	35
3.5 Espectroscopia Eletrônica de Absorção	38
3.6. Espectroscopia Eletrônica de Fluorescência	39
3.7. Dicroísmo Circular	41
3.8. Constante de Equilíbrio da Ligação (K <sub>b</sub> )	42
3.9. Ligação em sulco	43
3.10. Intercalação com o DNA	47
3.11. Interação eletrostática	51
3.12. Inibidores da topoisomerase I	53

3.13. Referências	56
4. Metodologia	70
4.1 Materiais e Métodos	71
4.2 Equipamentos	71
4.3. Metodologia	71
4.4. Procedimentos	72
4.4.1. Tiazolidina-2,4-diona	72
4.4.2. 9-Metil-acridina (LPSF/AC-1)	72
4.4.3. Acridina-9-carboxaldeído (LPSF/AC-2)	73
4.4.4. 3-Acridin-9-il--2-ciano acrilato de etila (LPSF/IP-29)	73
4.4.5. 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160)	73
4.4.6. 3-Acridin-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A)	74
4.4.7. Derivados Tiazacridínicos e Imidazacridínicos	74
5. Artigo	75
6. Conclusão	104
7. Perspectivas	106

---

## ***INTRODUÇÃO***

O desenvolvimento de novos fármacos requer uma melhor compreensão dos mecanismos ação, tanto a nível celular como molecular. Muitos agentes terapêuticos importantes no tratamento de diversas doenças são conhecidos por interagir com o DNA para exercerem sua atividade biológica, sobretudo como antitumoral (YANG e WANG, 1999). Por esta razão, o estudo das interações ao DNA com vários ligantes tem sido objeto de considerável interesse na concepção de medicamentos que têm o DNA como alvo biológico (JOSEPH et al, 2004).

As características estruturais originais do DNA, devido ao empilhamento planar entre as bases aromáticas ao longo do esqueleto fosfato-açúcar na hélice, tornam essa biomolécula um alvo particularmente interessante para a idealização de novos fármacos (PLSIKOVA et al., 2012). Esta estrutura concede um sítio de alta afinidade para vários compostos heterocíclicos, tais como acridina e seus derivados que apresentam suas numerosas propriedades biológicas, uma vez que são utilizados como agentes antiparasitários, antitumoral e antibacteriana (BELMONT et al., 2007).

A maioria dos agentes ligantes do DNA é caracterizada pela presença de um cromóforo policíclico planar capaz de se intercalar no DNA e de uma ou duas cadeias laterais básicas, que podem aumentar a afinidade de ligação ao DNA e, em alguns casos, fornecer uma maior solubilidade em condições fisiológicas (ANTONINI, 2004). Os derivados acridínicos apresentam uma estrutura planar no núcleo principal da molécula, o que confere sua capacidade de interagir com a cadeia dupla do DNA.

Contudo, a ampla variedade de efeitos biológicos dos derivados acridínicos está associada não apenas a interação com o DNA, mas também com proteínas, especialmente algumas enzimas-chaves na proliferação celular, as topoisomerases (BELMONT et al., 2007). A ligação ao DNA conduz a formação de um complexo acridina-DNA-enzima, o qual bloqueia a ação das topoisomerases levando a inibição de processos celulares críticos, como a replicação e transcrição do DNA, o que resulta em última instância na morte celular (POMMIER, 2009).

Dessa forma, a versatilidade do núcleo acridínico impulsiona pesquisas para o desenvolvimento de moléculas alvo, estruturalmente mais eficazes e seguras.

Considerando isto, o presente trabalho procurou desenvolver novos derivados tiazacridínicos e imidazacridínico como potenciais ligantes ao DNA, através da síntese, caracterização, bem como avaliação da sua capacidade de interagir com o DNA e de inibir a enzima topoisomerase I.

---

## ***OBJETIVOS***

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Sintetizar novos derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos (LPSF/AC e LPSF/AA) e avaliar a interação com o DNA e atividade de inibição da topoisomerase I.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Sintetizar e determinar as características físico-químicas de novos derivados: 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (LPSF/AC-157), 5-acridin-9-ilmetilideno-3-amino--2-tioxo-tiazolidin-4-ona (LPSF/AC-127), 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A) e 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/AC-5), derivados tiazacridínicos e imidazacridínico, respectivamente;

Caracterizar as estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, infravermelho e espectrometria de massas;

Analisar a interação com o DNA dos novos derivados tiazacridínicos e imidazacridínico por meio da espectroscopia de absorção em UV-visível, de emissão da fluorescência e de dicroísmo circular;

Verificar a capacidade dos novos derivados obtidos de inibir a enzima topoisomerase I humana.

---

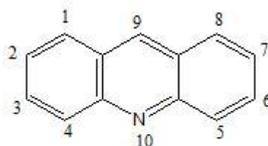
## ***REVISÃO DA LITERATURA***

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Acridinas e seus derivados

Acridina e seus derivados são agentes quimioterápicos amplamente estudados como antimaláricos, antiprotozoários, antibactericidas e antitumorais. Além de serem conhecidos como sondas de ácidos nucleicos relevantes no desenvolvimento de novos agentes biológicos (GHOSH et al., 2010). Estes derivados apresentam como principal característica serem moléculas aromáticas policíclicas planares que se ligam firmemente, mas de forma não covalente e reversível ao DNA (FERGUSON e DENNY, 1991).

Acridinas (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N) são compostos heterocíclicos formados de dois anéis fundidos a um anel piridínico em posição central (Figura 1). Quimicamente, a acridina é um alcaloide de antraceno, também conhecido pelas denominações de: dibenzo-piridina; 10-azaantraceno; 2,3,4,6-dibenzopiridina; 2,3-dibenzoquinolina, entre outros (KUMAR et al., 2012). A substituição do anel heterocíclico faz com que os derivados produzidos detenham atividades biológicas diversas (PATEL et al., 2010).



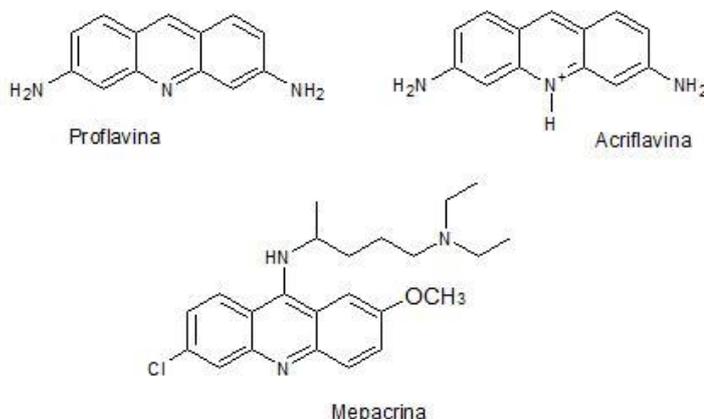
**Figura 1** – Estrutura química do anel acridínico.

Desde o início do século 20, derivados de acridina têm sido cada vez mais utilizados devido às suas propriedades farmacológicas (DENNY, 2002). Segundo Giorgio et al. (2011), já está bem estabelecido que a estrutura planar de anéis tricíclicos é que confere aos derivados a capacidade de interferir em uma grande variedade de processos metabólicos tanto em células procariontas como eucariotas.

A acridina foi isolada em 1870 por Carl Heinrich e Caro Grabe na Alemanha, a partir da análise de uma fração de cinzas de alcatrão (KUMAR et al., 2012), mas

apenas em 1913 teve início a sua utilização na clínica médica, quando Browning descobriu a ação bactericida da proflavina e acriflavina (Figura 2) (ALBERT, 1966).

Desde 1940, a mepacrina vem sendo utilizada como agentes antimalárico (Figura 2), a qual é também usada no tratamento do câncer (GREENWOOD, 1995).



**Figura 2** – Estrutura química da proflavina, acriflavina e mepacrina (ALBERT, 1966)

Dependendo da função do substituinte introduzido, os derivados acridínicos antitumorais se comportam não apenas como agentes intercalantes do DNA, mas também como drogas específicas inibidoras da topoisomerase I e/ou II e inibidores da telomerase (BELMONT et al., 2007).

Com relação à atividade antitumoral, os primeiros agentes terapêuticos contendo núcleo acridínico foram desenvolvidos durante os anos de 1970, o que conduziu ao derivado *m*-amsacrina, introduzido na clínica médica em 1976 (ALBERT, 1966).

Amsacrina, ou *N*-[4-(acridin-9-ilamino-metóxi-fenil)-metanosulfonamida, um derivado 9-anilinoacridina conhecido por exibir atividade citotóxica potente, sendo utilizada clinicamente no tratamento de leucemias agudas e linfomas (BARROS et al., 2012). A principal característica destes compostos é a classificação como agentes intercalantes, formadores de um complexo ternário com topoisomerasas que interfere na atividade da enzima e induzem a apoptose celular (LOZA-MEJÍA et al., 2009). No entanto, a amsacrina não tem sido eficaz no tratamento de tumores sólidos (JELIC et al., 1997).

A introdução de substituintes nas posições 4,5 anel acridínico conduz a formação novo agente, o asulacrina, que é capaz de inibir o crescimento de alguns tumores sólidos (Figura 3) (DENNY, 2002). A terapia combinada da asulacrina com a



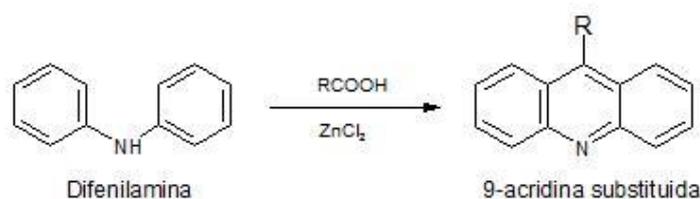
A elucidação dos mecanismos antineoplásicos de agentes intercalantes de DNA comprovaram que esta atividade está associada com: (a) alta afinidade de ligação ao DNA; (b) baixa taxa de dissociação fármaco-DNA; e (c) longo tempo de permanência da substância em um sítio de ligação individual do DNA (DENNY et al., 1985).

Entretanto, a aplicação clínica de compostos intercalantes é limitada por problemas tais como efeitos colaterais, resistência ao fármaco e biodisponibilidade restrita (SANCHÉZ et al. 2006), o que estimula modificações estruturais como a introdução de grupos doadores e/ou retiradores, ou ainda grupamentos volumosos que modificam a distribuição eletrônica no anel.

### 3.2 Química das Acridinas

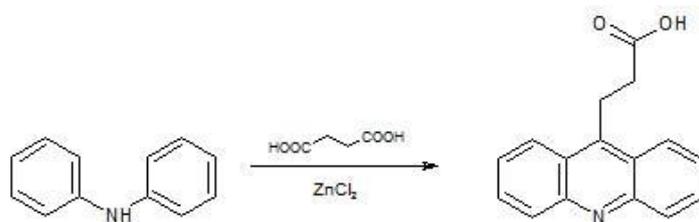
Uma variedade de rotas de síntese do anel acridínico é reportada na literatura, o que possibilita aos pesquisadores escolher a melhor via de síntese, o que pode resultar em melhores rendimentos e menor tempo de reação.

Um dos métodos mais utilizados é a síntese de Bernthsen, que consiste em aquecer uma mistura de ácido carboxílico com difenilamina na presença de cloreto de zinco a 200-270° C (Esquema 1). Um grande número de acridinas e benzacridinas tem sido sintetizado por este método a partir de uma variedade de ácidos carboxílicos e difenilaminas (ACHESON, 1956).



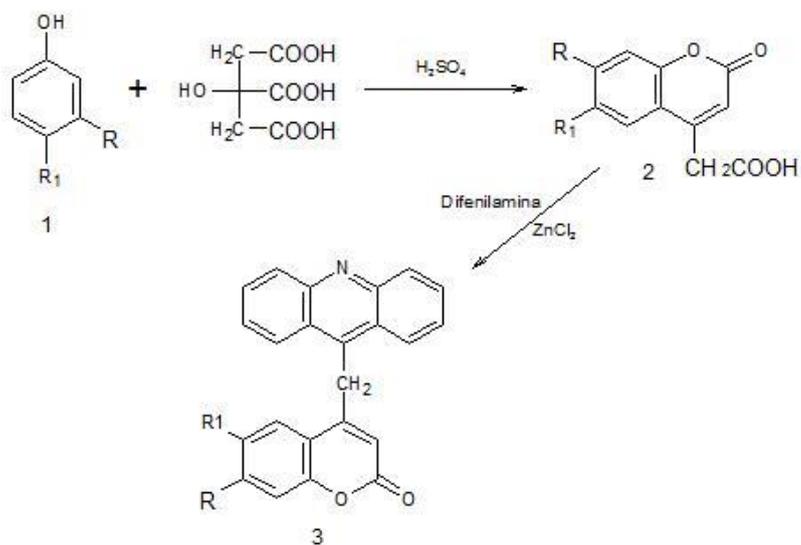
**Esquema 1** – Síntese de Bernthsen (Acheson, 1956)

Estratégia de síntese semelhante (Esquema 2) foi utilizada por David-Cordonnier et al. (2007), que obtiveram o ácido 9-acridina-propiónico a partir de uma difenilamina e ácido succínico em presença de ácido sulfúrico aquoso a 20% e cloreto de zinco como catalisador.



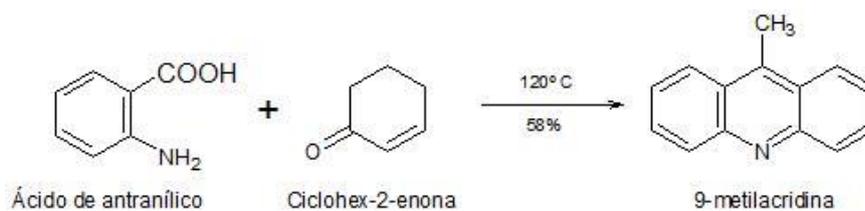
**Esquema 2** - Síntese de ácido 9-acridina-propiónico (DAVID-CORDONNIER et al., 2007)

Patel et al. (2010) prepararam através do método de Bernthsen, derivados acridínicos. Inicialmente foi obtido um derivado com ácido acético 2-oxo-substituído (**2**), a partir de uma condensação com diversos derivados de fenol (**1**). Após esta etapa, os autores sintetizaram de forma eficiente um derivado de acridina 4-(acridin-9-ilmetil) substituída (**3**) através da reação do composto **2** com a difenilamina, na presença de cloreto de zinco (Esquema 3).



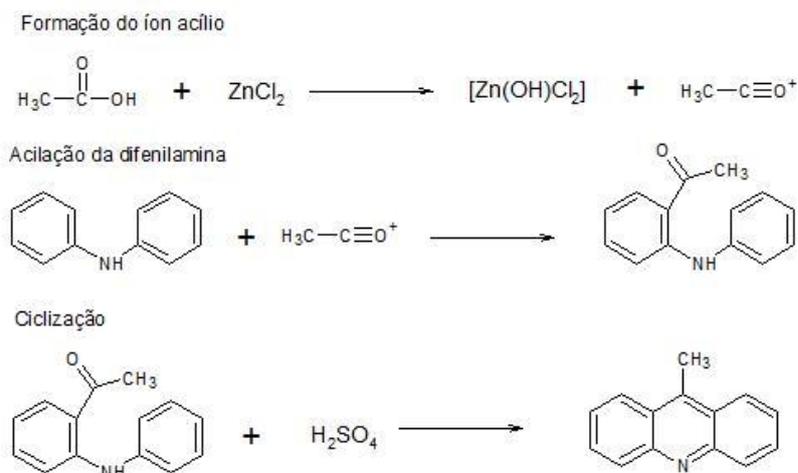
**Esquema 3** – Síntese de 4-(acridin-9-ilmetil)-2H-(cromen substituída)-2-ona (PATEL et al., 2010)

A síntese de Friendlander (Esquema 4), outro método de obtenção, onde um sal de ácido de antranílico é tratado com uma ciclohex-2-enona a uma temperatura de 120° C para se obter a 9-metil-acridina (ACHESON, 1956).



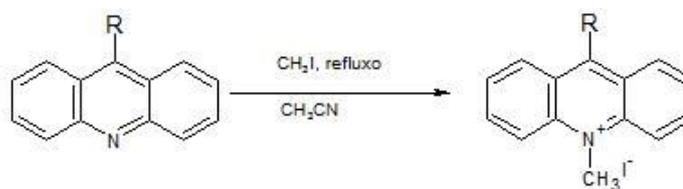
**Esquema 4** – Síntese da 9-metilacridina, método de Friendlander (ACHESON, 1956)

A metodologia adotada pelo nosso grupo de pesquisa (Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – GPIT/UFPE e Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/UFPE) foi a desenvolvida por Tsuge et al. (1963) através da síntese da 9-metil-acridina a partir do ácido acético, cloreto de zinco e difenilamina (Esquema 5). A reação se inicia com ácido acético na presença de cloreto de zinco, levando a formação de um intermediário, o íon acílio, seguido por uma acilação de Friedel Crafts com a difenilamina, que sofre ciclização por adição do ácido sulfúrico.



**Esquema 5** – Síntese da 9-metilacridina (TSUGE et al., 1963)

O núcleo acridínico permite muitas reações. Por exemplo, favorecem muitas reações nucleofílicas. O ataque nucleofílico, em geral, ocorre no carbono C-9, seguido em muitos casos, de processo de oxidação. O átomo de nitrogênio da acridina assegura uma densidade eletrônica ao anel e, conseqüentemente, uma boa nucleofilicidade, como se pode observar através da formação de sais de acridina que são preparados por alquilação (CORSARO et al., 2002). Desta forma, Joseph et al. (2004) obtiveram sais de acridina (Esquema 6) por reação com iodeto de metila.



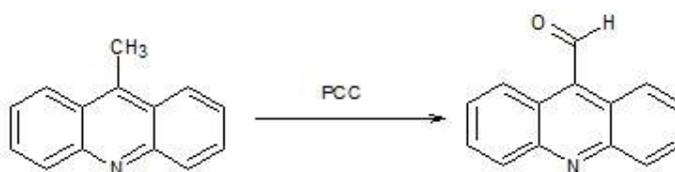
**Esquema 6** - Reação de formação de sais de acridina (JOSEPH et al., 2004)

O esquema 7 mostra a oxidação por ação do dicromato de sódio na presença de ácido acético, originando a acridona que pode ser degradada por permanganato de potássio em meio alcalino, formando ácido quinoline-2,3-dicarboxílico (EICHER e HAUPTMANN, 2003).



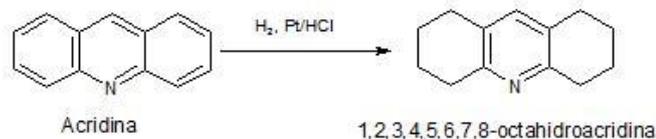
**Esquema 7** – Reação de oxidação de acridinas (EICHER et al., 2003)

Mosher e Natale (1995) realizaram a oxidação do composto 9-metil-acridina utilizando um agente oxidante específico, o clorocromato de piridínio (PCC), na presença de diclorometano e sulfato de magnésio, sob agitação a temperatura ambiente, fornecendo o derivado 9-acridinaldeído (Esquema 8).



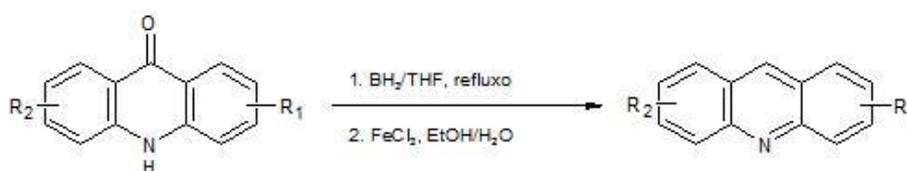
**Esquema 8** – Síntese da 9-acridinaldeído (MOSHER e NATALE, 1995)

Reações de redução de acridina (Esquema 9) podem ocorrer através do tratamento com ácido clorídrico e platina, o que resulta na redução dos anéis dibenzo restando a aromaticidade apenas do anel piridina (ACHESON, 1956).



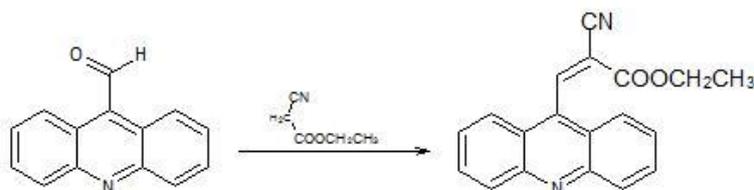
**Esquema 9** – Reação de redução de acridina (ACHESON, 1956)

Desbois et al. (2009) estudaram métodos com derivados de borano para reduzir acridona a acridina (Esquema 10), utilizando uma solução de  $\text{BH}_3$ -THF, seguido de tratamento com  $\text{FeCl}_3$  em etanol/água.



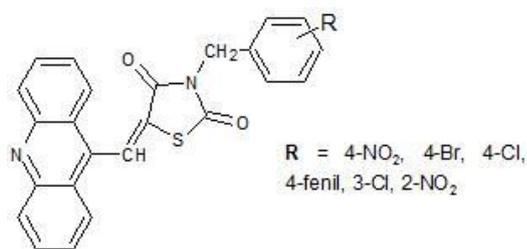
**Esquema 10** – Reação de redução de acridona a acridina (DESBOIS et al., 2009)

Silva (2001) obteve o éster 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila – LPSF/IP-29 (Esquema 11), através de numa reação de condensação de Knoevenagel entre o aldeído da acridina e o cianoacetato de etila, na presença de benzeno como solvente e piperidina como catalisador.



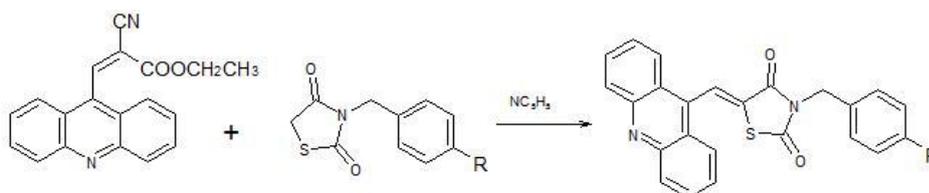
**Esquema 11** – Síntese do éster 2-ciano-acridin-9-il-acrilato de etila (SILVA, 2001)

Silva (2003) utilizando a metodologia de Tsuge et al. (1963), sintetizaram novos derivados tiazacridínicos, e avaliaram a sua atividade frente ao tumor sólido (sarcoma 180). Constataram uma boa atividade inibitória, possuindo na molécula substituintes nitro, bromo e fenil em posição 4 e grupo cloro na posição 3. Esses resultados impulsionaram a síntese e teste da atividade anticâncer de outros análogos da acridina (Figura 5).



**Figura 5** - Derivados tiazacridínicos antitumorais (SILVA, 2003)

Barros et al. (2012), obtiveram tiazacridinas a partir da reação das 3-benzil-tiazolidina-2,4-dionas substituídas com o éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila LPSF/IP-29 (Esquema 12). Estes novos derivados apresentaram uma atividade citotóxica promissora para células de tumores sólidos.

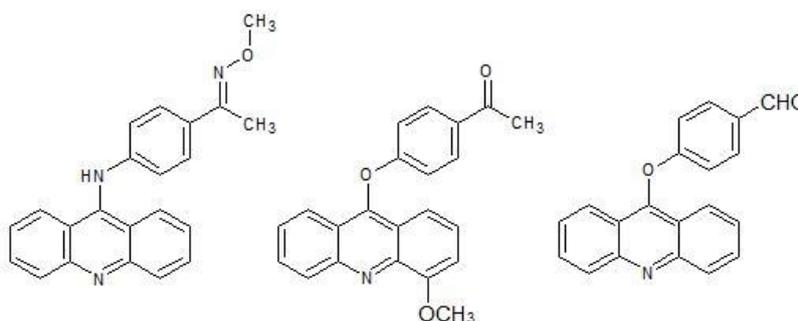


**Esquema 12** – Síntese de tiazacridinas (BARROS et al., 2012)

### 3.3 Outras Aplicações do Núcleo Acridínico

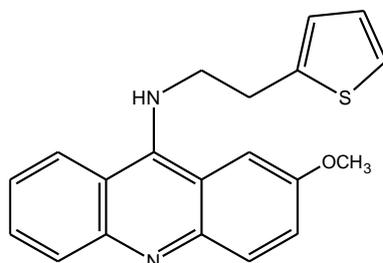
A versatilidade das propriedades biológicas da acridina pode ser verificada nos seguintes relatos.

Chen et al. (2002), sintetizaram derivados 9-anilinoacridina e 9-fenoxiacridina como novos agentes anti-inflamatórios. Verificaram uma ação supressora nos mediadores químicos liberados por mastócitos, neutrófilos e macrófagos, além de não apresentarem citotoxicidade significativa (Figura 6).



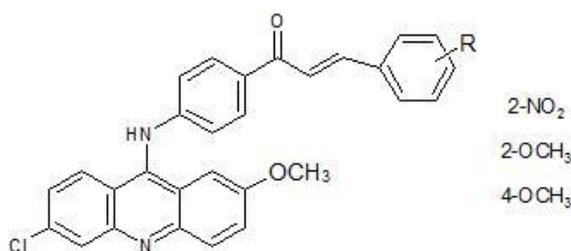
**Figura 6** – Derivados acridínicos anti-inflamatórios (CHEN et al., 2002)

Sondhi et al. (2010), reagiram 9-cloro-2,4-acridinas, aminas substituídas e 9-isotiocianato-2,4-acridinas resultando em derivados aminacridínicos. Onde destacamos a 2-metóxi-*N*-(2-(tiofeno-2il)etil)acridin-9-amina, que apresentou uma redução de 41,17 % do edema (Figura 7).



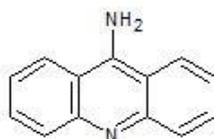
**Figura 7** – Estrutura química do 2-metóxi-*N*-(2-(tiofeno-2il)etil)acridin-9-amina (SONDHI et al., 2010)

Derivados  $\beta$ -benzoilstirenacridínico foram sintetizados e avaliados quanto à atividade antimalárica por Prajapati et al. (2012). Inicialmente, o ácido 4-cloro-2-(4-metóxi-anilino)-benzóico, preparado por condensação do ácido 2,4-dicloro-benzóico com *p*-anisidina, na presença de oxiclreto de fósforo e 4-aminoacetofenona fornecer o 1-(4-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-ilamino)fenil) etanona. A figura 8 mostra a estrutura dos compostos que exibiram boa atividade antimalárica com alta seletividade.



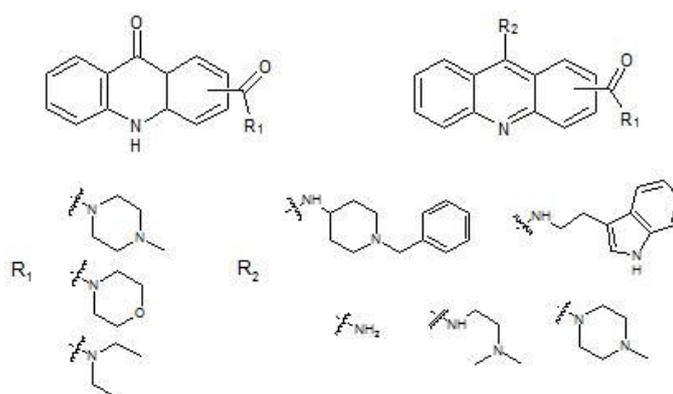
**Figura 8** – Derivados acridínicos como agentes antimaláricos (PRAJAPATI et al., 2012)

Guendel et al. (2009) realizaram um estudo de busca de fármacos anti-HIV mais eficazes através do estudo do mecanismo molecular de análogos amino-acridina. O tratamento de células infectadas resultou na inibição viral, evidenciando uma inibição altamente dependente da presença e localização do grupamento amino (Figura 9).



**Figura 9** – Estrutura química da 9-aminoacridina (GUENDEL et al., 2009)

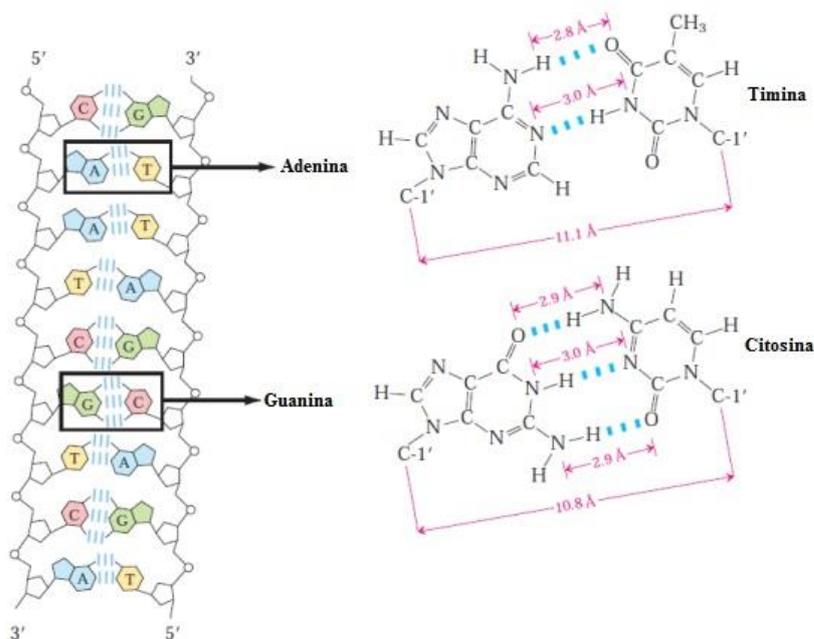
Goodell et al. (2006), por meio da síntese e avaliação da ação anti-herpes de derivados da acridina e acridona (Figura 10), averiguaram através de ensaio de inibição da topoisomerase II o relaxamento do DNA e consequente ação frente o vírus herpes. Como resultado foi visto que análogos da acridina carboxamidas substituídas são capazes de inibir infecções por herpes.



**Figura 10** – Análogos da acridina e acridona anti-virais (GOODELL et al., 2006)

### 3.4 Estudos da interação ao DNA

O DNA é uma importante biomacromolécula (Figura 11) que dispõe de vários sítios de ligação para uma ampla variedade de compostos. Moléculas orgânicas e inorgânicas podem interagir com os ácidos nucleicos através de diferentes modos de ligação. Esta interação pode muitas vezes levar a uma alteração nas propriedades estruturais e funcionais do DNA, o que influencia sobre suas funções fisiológicas e sua interação com outras biomoléculas, tais como proteínas (IHMELS e OTTO, 2005; MA et al., 2011), além de causar danos que levam a várias alterações patológicas nos organismos vivos (LIU et al., 2002). Desta forma, agentes ligantes do DNA podem bloquear os processos de replicação, transcrição ou reparação do DNA e agir como drogas quimioterapêuticas (FERGUSON e DENNY, 2007).



**Figura 11** - Padrões de interação de hidrogênio nos pares de bases (NELSON e COX, 2006)

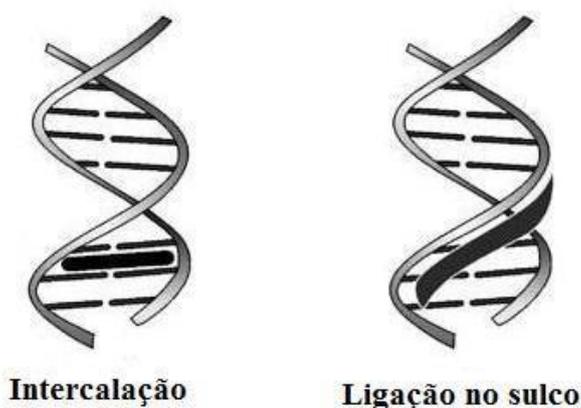
Compostos clássicos com anéis policíclicos fundidos, tais como acridinas e antraciclina, são conhecidos por interagir com o DNA e apresentar aplicações clínicas importantes, especialmente na área de oncologia (SYNDER et al., 2005).

O estudo das interações com o DNA tem sido de grande destaque devido à necessidade de compreender a ligação de moléculas ao ácido nucleico (ZHANG e TANG, 2004). Para Nelson et al. (2007) ficou evidente que algumas das moléculas atuam se ligando ao DNA de forma não covalente com especificidade, graças a presença de grupos funcionais que podem interagir através de forças eletrostáticas.

Muitos ligantes ao DNA contêm três ou quatro anéis fundidos, que absorvem luz na região do UV-visível do espectro (cromóforos) (AVENDÃO e MENENDEZ, 2008). As acridinas e seus derivados foram o primeiro grupo de cromóforos amplamente utilizado para estudos da interação não covalente com o DNA, onde através destes estudos se levou ao conceito de intercalação (JOSEPH et al., 2004). O estudo da intercalação, inserção de um cromóforo planar poliaromático entre os pares de bases da dupla hélice do DNA, com o desenrolamento da hélice, foi demonstrado pela primeira vez com a proflavina (LERMAN, 1961), impulsionando posteriormente o estudo com outros derivados acridínicos.

Em geral, as moléculas podem se associar ao DNA por três modos: ligações eletrostáticas, intercalação e ligação em sulco (Figura 12) (ASLANOGLU, 2006; IHMELS e OTTO, 2005). Dependendo das características estruturais da molécula e

do DNA, muitas moléculas podem apresentar mais de um modo de interação com o DNA (STREKOWSKI e WILSON, 2007).



**Figura 12** – Aspecto da interação de moléculas ao DNA (IHMEELS e OTTO, 2005)

A interação com o DNA pode interromper as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e/ou destruir a estrutura regular helicoidal, o que causa desenrolamento do DNA e resulta em interferência na ação de enzimas que se ligam ao DNA, tais como as topoisomerasas (LORENTE et al., 2004).

Alterações ópticas ocorrem após a formação do complexo entre a molécula e o DNA. Assim, o estudo das propriedades físicas é uma ferramenta útil para avaliação qualitativa e quantitativa do processo de associação fármaco-DNA e confirmação do modo de ligação (JENKINS, 1997). Variadas técnicas existem para auxílio no estudo da ligação do fármaco ao DNA, porém, a fim de se deduzir o modo de interação, é imprescindível uma avaliação das estruturas e características particulares de cada molécula (IHMEELS e OTTO, 2005).

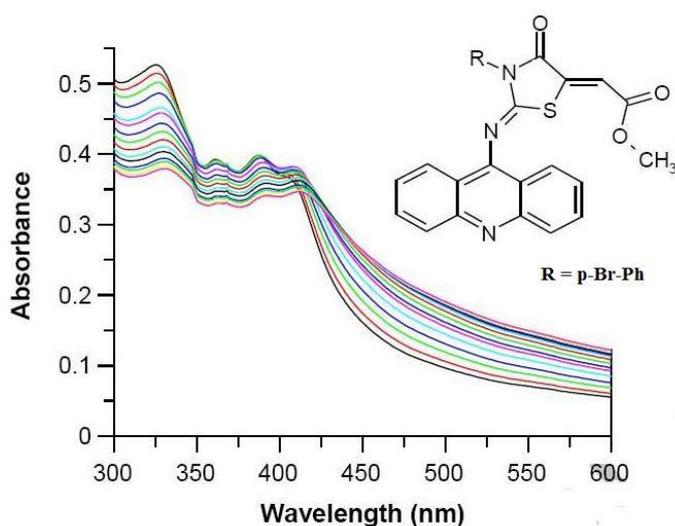
Long e Barton (1990) mencionam três grupos de técnicas utilizadas para análise da interação com o DNA, são eles: 1 - Determinação do coeficiente de sedimentação, viscosidade da solução, mobilidade eletroforética do DNA circular, ou deslocamento de átomos de fósforo do fosfato de RMN-<sup>31</sup>P, servindo para avaliar as alterações da hélice do DNA. 2 - Espectroscopia de absorção, avaliando os máximos de absorção da molécula intercalada com deslocamento ou não para o vermelho. Emissão de fluorescência, verificando a supressão ou aumento da fluorescência do composto intercalador fluorescente. Espectroscopia de alta resolução de RMN-<sup>1</sup>H, verificando os prótons aromáticos na bolsa de ligação. Tais técnicas refletem as interações eletrônicas entre a molécula e os ácidos nucleicos. 3

- Espectroscopia de dicroísmo circular e linear para avaliar a orientação ou rigidez da molécula e técnicas de polarização de fluorescência para monitorar a imobilização da molécula quando ligada ao DNA.

O monitoramento da interação entre moléculas e o DNA através dos métodos espectroscópicos se baseia no fato de que os espectros de absorção e fluorescência eletrônica dos ligantes livres são alterados após a ligação (WILSON et al., 1990). Para um estudo da interação de moléculas ao DNA seguido da confirmação do modo de ligação é, portanto, necessário uma combinação das variadas técnicas disponíveis.

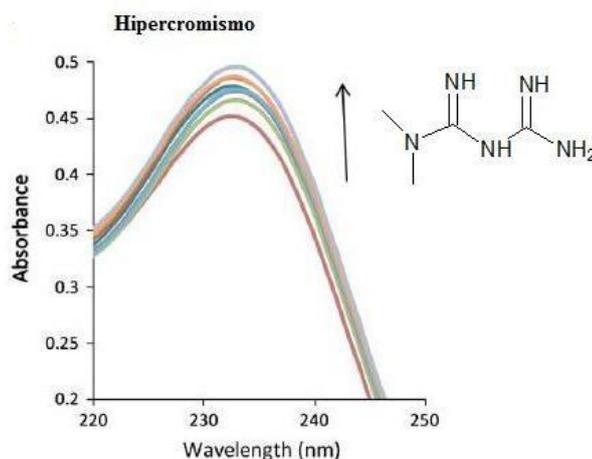
### 3.5 Espectroscopia Eletrônica de Absorção

Segundo Jenkins (1997), os espectros de absorção no UV-visível da molécula que se liga ao DNA são deslocados para um comprimento de onda mais longo (deslocamento para a região do vermelho – efeito batocrômico), com diminuição do valor do coeficiente de extinção molar (efeito hipocrômico). O efeito de hipocromismo e o desvio para o vermelho nos espectros de absorção, em geral, estão associados à ligação do composto na hélice do DNA, que envolve uma interação forte de empilhamento entre um cromóforo aromático da molécula e os pares de bases do DNA (CHEN et al., 2011; DAVID-CORDONNIER et al., 2007). Na figura 13, o espectro de absorção de um derivado tiazacridínico avaliado por Pauliková et al. (2012), com efeitos hipocromico e bathocromico.



**Figura 13** – Espectro de absorção da tiazacridina (25  $\mu\text{M}$ ) após adição de ctDNA (0 – 30  $\mu\text{M}$ ).  
(Pauliková et al., 2012)

Porém outros estudos evidenciam que, o efeito hipercrômico ou de aumento da absorção nos espectros, após adição de quantidades crescentes de DNA é também indicativo de que há uma forte interação entre a molécula e o DNA (SHAHABADI et al., 2010; ULIANA et al., 2012). Shahabadi e Heidari (2012), mostram o hiper Cromismo da N,N-dimetil-biguanidina (metformina) após espectroscopia de absorção em UV-visível (Figura 14).



**Figura 14** – Espectro de absorção da metformina (SHAHABADI e HEIDARI, 2012).

Em geral, hipocromismo é resultado de mudanças conformacionais no DNA, assim como da contração no eixo da hélice. Enquanto que o hiper Cromismo ocorre devido a danos na estrutura da dupla hélice do DNA (ZHOU et al., 2007; KASHANIAN e DOLATABADI, 2009).

### 3.6 Espectroscopia Eletrônica de Fluorescência

A fluorescência é o processo onde um composto luminóforo absorve uma quantidade de energia adequada (fóton) para desprender um elétron de um orbital ocupado para o orbital vazio de menor energia, com subsequente retorno do elétron para o nível de energia do seu estado fundamental original. Ocorrendo, assim, uma emissão de uma quantidade de luz com uma energia correspondente à diferença de energia entre o estado excitado e o nível de estado fundamental, de forma que a

rotação (spin) do elétron permanece inalterada ao longo de todo o processo (KULMALA e SUOMI, 2003).

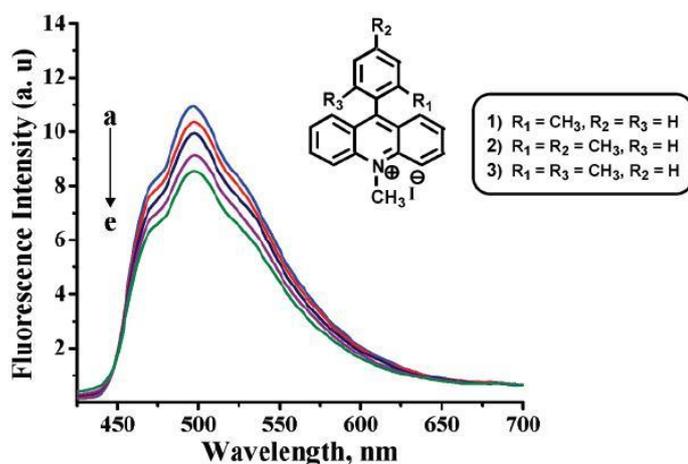
Interações moleculares variadas podem resultar em supressão da fluorescência, incluindo reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia do estado fundamental, formação de complexos e diminuição da colisão entre as partículas (GHARAGOZLOU e BOGHAEI, 2008; SHAHABADI e HEIDARI, 2012).

Estudos da intensidade de fluorescência e medições de extinção da emissão de luz podem detectar a interação de molécula ligante ao DNA. Na ausência de dados de alta resolução estrutural, tais estudos podem também deduzir o modo de ligação, a partir da associação com método de polarização de fluorescência (SUH et al., 2001).

A natureza dos diferentes substituintes que se localizam ao redor do núcleo acridínico ocasiona comportamentos espectroscópicos distintos, o que pode afetar os aspectos cinéticos e termodinâmicos da ligação ao DNA. Estudo da emissão de fluorescência com a 9-amino-6-cloro-2-metóxi-acridina apresentou quase uma total extinção da luz na sua interação com o DNA, enquanto a proflavina mostrou aumento na fluorescência após adição do DNA (BUSTO et al., 2011).

Modificações espectrais dos compostos, no entanto, não confirmam o modo de ligação, ou seja, as alterações visualizadas indicam apenas uma interação da molécula com o DNA (JENKINS, 1997). Métodos tais como estudo da viscosidade e dicroísmo circular, são meios mais específicos e confiáveis para verificar a forma de ligação (SUH e CHAIRES, 1995).

Alguns estudos, porém sugerem modos de ligação a partir de análises espectrais. A investigação espectroscópica de absorção e fluorescência realizada por Gao et al. (2010) com acridonas, mostra que o efeito hipocrômico e batocrômico juntamente com o fenômeno de extinção da emissão de luz reflete a formação de complexos estáveis de intercalação entre o anel principal do cromóforo e os pares de bases de DNA. Kuruvilla e Ramaiah (2007) ao estudarem a ligação ao DNA de sais de acridina também verificaram o efeito de extinção de fluorescência dos derivados (Figura 15).



**Figura 15** – Espectro de emissão da fluorescência: derivado 3 em ctDNA (0, 0.20, 0.43, 0.63 E 1 M mM) (KURUVILLA e RAMAIAH, 2007)

### 3.7 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é um método espectroscópico que se baseia na diferente capacidade de absorção das moléculas expostas a duas luzes polarizadas de igual intensidade (WOODY, 1995). Os espectros de CD são uma ferramenta útil e poderosa para determinar a conformação de biomacromoléculas, a partir do diagnóstico das alterações na morfologia do DNA durante a interação com compostos químicos (GARBETT et al., 2007).

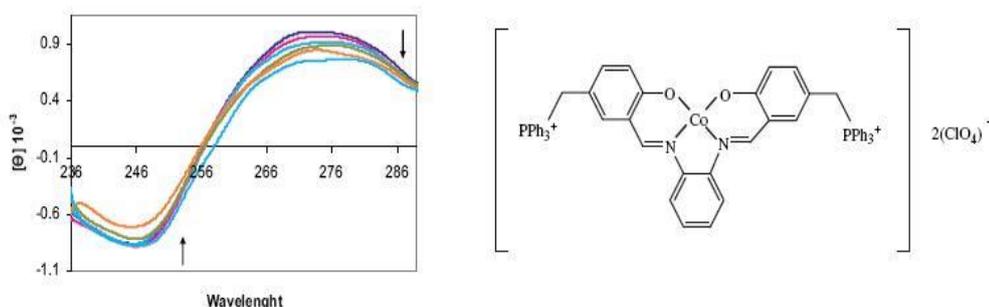
Tal técnica é caracterizada por monitorar o ambiente assimétrico de compostos ligados ao DNA, através da interação entre as bases cromóforas e os grupos fosfatos, obtendo informações do modo de ligação entre molécula-DNA (PSILKOVA et al., 2012) e da orientação do ligante em relação ao DNA (STREKOWSKI E WILSON, 2007).

O espectro de CD da forma B do DNA apresenta dois sinais característicos: uma banda negativa em torno de 245 nm, referente à helipticidade do DNA, e uma banda positiva em 275 nm devido ao empilhamento das bases do DNA (KYPR et al., 2009). Mudanças na estrutura do DNA devido à interação com outras moléculas exibem alterações características em ambas as bandas (CHEN et al., 2008), promovendo modificações na posição e na intensidade das mesmas (ZHANG et al., 2004).

Segundo Sousa et al. (2007), as diferenças conformacionais se devem as alterações no número de pares de bases por volta helicoidal, provocadas, por exemplo, por modificações da temperatura ou da força iônica. Compostos

intercaladores que perturbam interações entre as bases de DNA enfraquecem o empilhamento das bases e provocam uma diminuição nas intensidades de bandas de CD. Enquanto que a simples ligação no sulco de pequenas moléculas mostra pouca ou nenhuma perturbação (SHAHABADI e MOGHADAM, 2012).

A avaliação da interação do DNA com o derivado 9-anilinoacridina (Amsacrina), fármaco utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, por meio de CD mostrou que este composto interage tanto por intercalação quanto por ligação ao sulco (JANGIR et al., 2012). O modo de interação de complexo de cobalto (II) foi estudado através do dicroísmo circular e as alterações no espectro revelaram que o mesmo se intercala ao DNA, através de interações eletrostáticas devido à presença de cargas no complexo (Figura 16) (SHAHABADI et al., 2010).



**Figura 16** – Espectro de dicroísmo circular da artemisina-acridina (SHAHABADI et al., 2010)

### 3.8 Constante de Equilíbrio da Ligação ( $K_b$ )

Constante de ligação ( $K_b$ ) é uma forma estabelecida para averiguar a capacidade dos compostos químicos de se unir ao DNA. O valor calculado é útil para comparação entre moléculas com diferenças estruturais, além de indicar o possível modo de ligação ao DNA. Tais constantes podem ser obtidas através de dados provenientes das análises de espectroscopia de absorção, emissão de fluorescência, dicroísmo circular e outras, que são realizadas com as moléculas na presença de DNA (GAO et al., 2010; JANOVEC et al., 2011; LIU et al., 2010). A tabela 1 exibe o valor da constante de ligação de alguns compostos e sua forma de interação ao DNA.

Tabela 1 – Constante de ligação de moléculas associadas ao DNA.

Composto	Modo de Ligação	K (M <sup>-1</sup> )
Hoechst 33258	G	4.5 x 10 <sup>8</sup>
DAPI	G	5.5 x 10 <sup>8</sup>
Netropsin	G	2.4 x 10 <sup>6</sup>
Espermine	G	2.1 x 10 <sup>5</sup>
Proflavina	I	2.5 x 10 <sup>6</sup>
Propidium	I	3.1 x 10 <sup>5</sup>
DAPI	I	1.2 x 10 <sup>5</sup>
Etídio	I	8.1 x 10 <sup>4</sup>
Ditercalinium	B	5.0 x 10 <sup>8</sup>

Abreviações: G, ligação no sulco; I, intercalação; B, bis-intercalação (STREKOWSKI e WILSON, 2007)

Constantes de ligação típicas para intercaladores são no intervalo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> e são significativamente menores do que as constantes de ligação de agentes ligantes em sulco do DNA, que estão em torno de 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> (IHMEELS e OTTO, 2005).

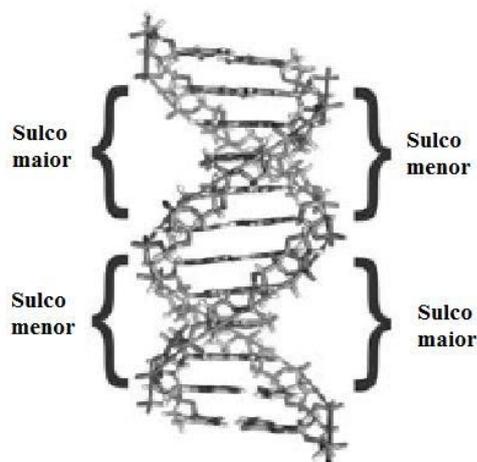
Baixos valores de Kb devem-se, inicialmente, a formas não catiônicas das moléculas estudadas. Interações específicas de moléculas catiônicas orgânicas com o DNA neutralizam cargas de fosfato, contribuindo de modo significativo na energia livre de ligação de moléculas altamente carregadas (STREKOWSKI e WILSON, 2007).

A liberdade rotacional entre o sistema de anel poliaromático e grupamentos ligados a ele pode, também, sugerir um valor da constante de ligação. Pois, uma maior flexibilidade permite uma liberdade rotacional necessária para que a molécula possa se encaixar e/ou se ligar ao sulco do DNA, conduzindo a uma maior capacidade de ligação (KURUVILLA e RAMAIAH, 2007; MAHMOOD et al., 2010).

### 3.9 Ligação em sulco

As bases nitrogenadas dos nucleotídeos são aptas a formarem ligações de hidrogênios específicas, devido à presença de grupos doadores e aceptores de elétrons (NELSON e COX, 2006). O arranjo espacial dos pares de bases através do empilhamento dentro da dupla hélice, leva ao pareamento espacial e conduz a formação dos sulcos maior e menor (Figura 17), que servem de sítios de ligação para outras moléculas (KHAN et al., 2012). Moléculas relativamente grandes, como as proteínas, se ligam preferencialmente ao sulco maior, enquanto que o sítio de ligação de pequenas moléculas é o sulco menor (IHMEELS e OTTO, 2005). A

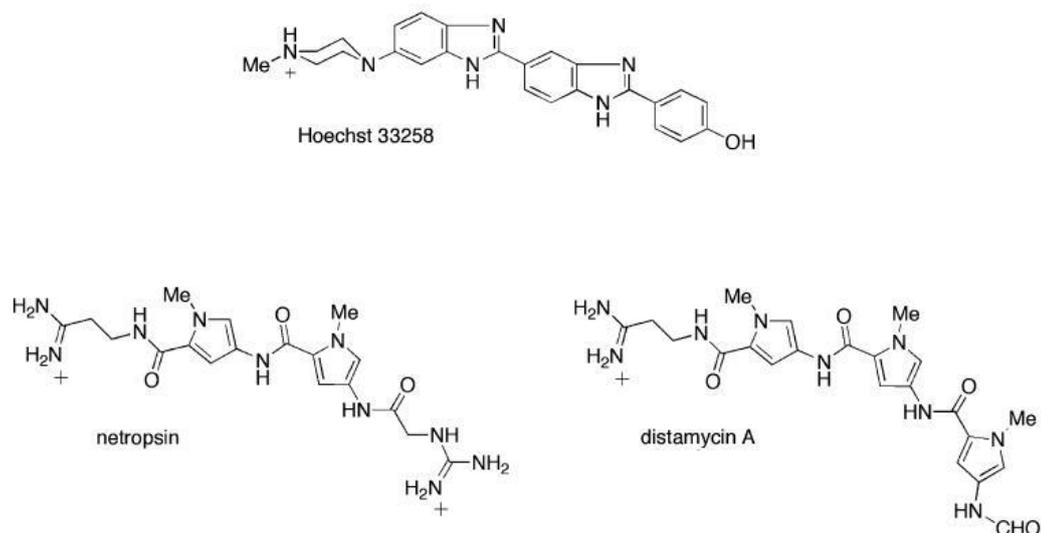
interação com as bases do DNA em ambos os sulcos envolve, em geral, ligação de hidrogênio ou interações de van der Waals (ZHANG e TANG, 2004).



**Figura 17** – Estrutura do DNA com especificação dos sulcos maior e menor (NETO e LAPIS, 2009)

Ligantes do sulco, frequentemente, consistem de compostos aromáticos com sistemas de anéis não fundidos, cuja ligação permite uma flexibilidade conformacional de tal modo que possibilita a molécula a adotar uma conformação mais adequada para se adaptar a curvatura e se encaixar perfeitamente no sulco (IHMELS e OTTO, 2005; STREKOWSKI e WILSON, 2007).

Compostos que interagem na forma de ligação ao sulco demonstram numerosas atividades biológicas, tais como antitumoral, antiprotozoários, antiviral e antibacteriana. No entanto, a maioria das pesquisas com tais agentes concentra seu desenvolvimento em terapias anticâncer (CAI, GRAY Jr., HOFF, 2009). Exemplos de moléculas típicas de ligação em sulco são Hoechst 33258, Netropsin e Distamycin (Figura 18) capazes de interagir com o sulco menor do DNA por conta de sua forma em curva, que corresponde bem com a topologia da cadeia dupla do DNA (NELSON et al., 2007).



**Figura 18** – Estruturas químicas de moléculas ligantes em sulco do DNA (Nelson et al., 2007)

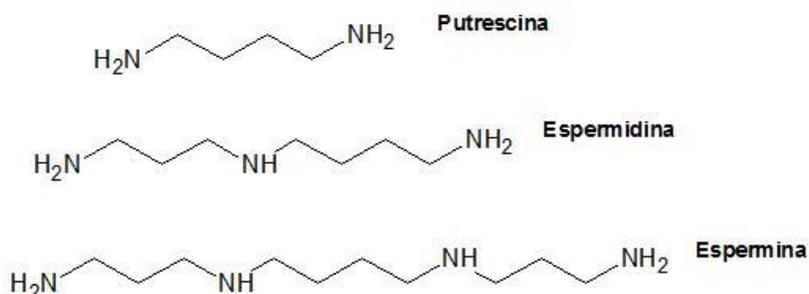
Distamycin e Netropsin possuem uma torção apropriada dos anéis aromáticos, o que permite a ligação de hidrogênio com os pares de bases adenina e timina no sulco menor (BOGER et al., 2000). A natureza da ligação não covalente possibilita a interação com o DNA e mostra que os efeitos citotóxicos estão relacionados com alterações temporárias da função do DNA (BARALDI et al., 2004).

A estrutura do DNA propicia a existência de vários sítios reativos sobre a superfície da dupla hélice, como por exemplo, do grupamento amino das bases nitrogenadas que são susceptíveis a ação da droga no sulco menor (KHAN et al., 2012). A especificidade de ligação de algumas drogas ao sulco menor pode estar muitas vezes relacionada ao reconhecimento da base guanina, através da interação da ligação de hidrogênio ao grupo amino N2 e ao grupamento N3 das bases guanina e adenina. Compostos de platina anticâncer têm como alvo o grupo N7 da guanina, sendo o sítio mais reativo para ligações ao sulco maior do DNA (YANG e WANG, 1999).

Derivados de poliamidas são também típicos ligantes em sulco. Estudos com espermidinas mostram que estas moléculas causam uma flexão e conseqüente condensação do DNA (PASTRÉ et al., 2006). Tais compostos são protonados sob condições fisiológicas e interagem fortemente com os fosfatos de cadeias opostas do DNA e com uma base guanina dentro do sulco (KABIR et al., 2013).

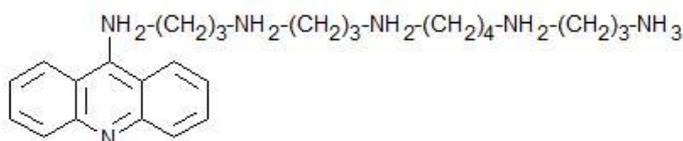
Estudos anteriores sobre poliaminas biogênicas (Figura 19) propuseram que a putrescina e espermidina interagem com o sulco menor de um oligonucleotídeo com

15 unidades de adenina-timina, enquanto espermina podem interagir tanto em sulcos menores como nos sulcos maiores (RUIZ-CHICA et al., 2003).



**Figura 19** – Estrutura química de poliaminas (WANG et al., 2001)

Perez-Flores et al. (2005) realizaram estudos de um conjugado acridina-espermina (Figura 20) e observaram que a ligação no sulco maior é favorecida por sequências de guanina-citosina, enquanto que a interação com sequências de adenina-timina não exibiu preferências para ligações em sulcos.

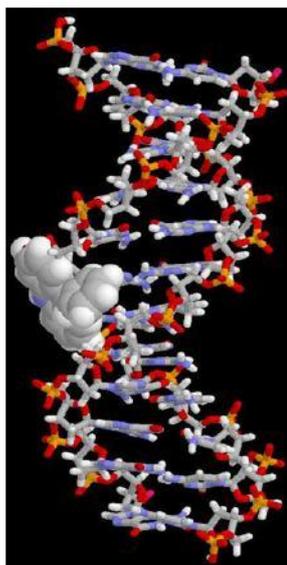


**Figura 20** – Estrutura química do derivado espermina-acridina (FLORES et al., 2005)

A presença de um ligante poliamina ligado covalentemente a acridina não altera a capacidade de intercalação do cromóforo planar da acridina, no entanto, aumenta a afinidade ao DNA, uma vez que a cadeia de poliamina permite modos de ligação adicionais em sulco, além de preservar a atividade inibitória da acridina sobre enzima topoisomerase (WANG et al., 2001).

Conjugados acridina-poliamina são, portanto, sistemas químicos promissores para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes (SANCHEZ-CARRASCO et al., 2008).

Estudos de modelagem molecular, através de sequências específicas de DNA realizado com o composto 9-fenil-acridina (ACPH) revelou que o derivado se liga principalmente ao sulco menor do DNA de modo que uma parte da molécula encontra-se entre dois pares de bases, com interações fortes em sequências ricas em guanina-citosina (Figura 21) (GHOSH et al., 2010).

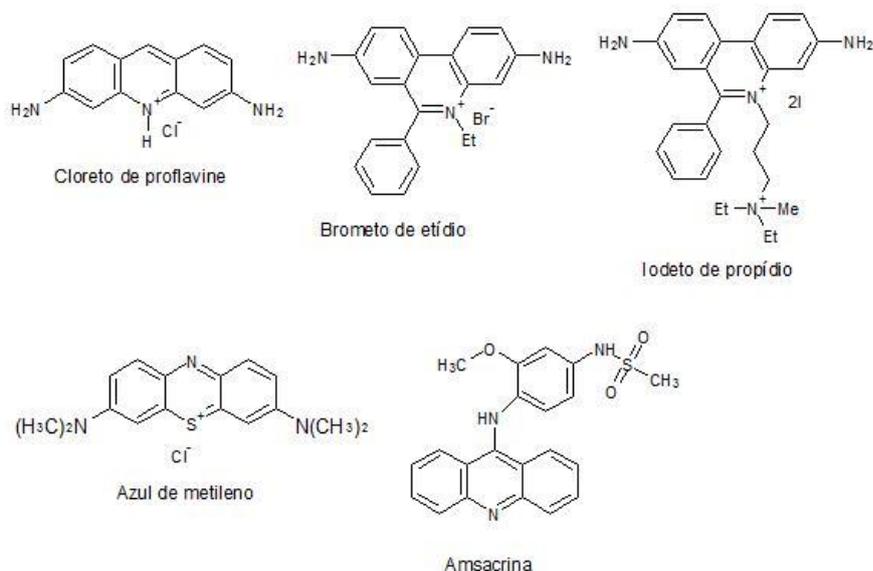


**Figura 21** – Interação ao sulco do DNA da 9-fenilacridina (GHOSH et al., 2010)

### **3.10 Intercalação com o DNA**

Zeglis et al. (2007) definem intercalação como: “pequena molécula orgânica ou complexo de metal capaz de desenrolar o DNA e se empilhar entre os pares de bases”. Numa hélice de DNA, as bases nucleicas estão localizadas em um arranjo quase no mesmo plano, o que permite a inserção de um cromóforo planar aromático entre as bases, com a capacidade de se ligar firmemente, porém de forma reversível (WANG et al., 2001), com conseqüente desenrolamento e alongamento de hélice, o que causa distorção na estrutura do DNA, diferentemente da ligação em sulco (NETO e LAPIS, 2009).

Intercaladores clássicos são moléculas aromáticas fundidas com cargas positivas sobre uma cadeia lateral ligada e/ou um sistema de anel como, por exemplo, cloreto de proflavina e brometo de etídio (STREKOWSKI e WILSON, 2007). Outros compostos conhecidos por se intercalarem ao DNA são derivados de acridina, azul de metileno (Figura 22) (ZHANG et al., 2004), amsacrina (JANGIR et al., 2012).



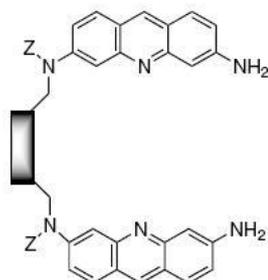
**Figura 22** – Estruturas químicas de compostos intercaladores ao DNA (STREKOWSKI e WILSON, 2007)

Na intercalação, as interações de empilhamento podem ocorrer na presença de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas, observando também efeitos de impedimento estéricos (LORENTE et al., 2004). Para Strekowski e Wilson (2007), apesar da grande quantidade de dados estruturais já conhecidos para os complexos de intercalação, a origem das forças de intercalação ainda não é totalmente compreendido. Geralmente, tem sido considerado que a mesma é resultado de uma interação hidrofóbica em que a molécula aromática é levada para um ambiente hidrofóbico dos pares de bases a partir do ambiente hidrofílico aquoso (NELSON e COX, 2006).

O processo de intercalação de moléculas ao DNA conduz a um efeito chamado de “princípio de exclusão do vizinho”, isto é, a intercalação de uma molécula na dupla hélice do DNA impede a ligação de outro intercalador entre os pares de bases adjacentes a ligação (RAO e KOLLMAN, 1987). Isto ocorre porque a intercalação leva a alterações estruturais no DNA que limita o acesso de outra molécula próximo ao sítio de ligação inicial, por razões estéricas (BIVER et al., 2008).

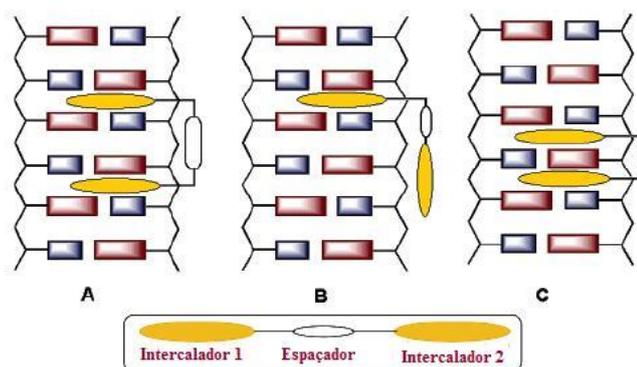
Tal efeito é observado, principalmente, em moléculas chamadas de bifuncionais, ou seja, que contêm duas unidades de intercalação separadas por um espaçador de cadeia que, a princípio, necessita ser de comprimento suficiente para

permitir o encaixe duas vezes (AVENDÃNO e MENENDEZ, 2008). O composto da figura 23, por exemplo, é um derivado *bis*-acridina, onde as porções proflavina são ligadas por elementos de ligação variados (LORENTE et al., 2004)



**Figura 23** – Estrutura química do derivado *bis*-acridina (LORENTE et al., 2004)

Dependendo da natureza do cromóforo e do grupo espaçador, estas moléculas podem em princípio se ligar ao DNA através da intercalação, *bis*-intercalação, ligação em sulco e/ou por interações eletrostáticas (LORENTE et al., 2004). Kuruvilla et al. (2005) mostram que a ligação de moléculas com duas unidades pode ocorrer de três formas: (a) interação de um *bis*-intercalador, seguindo o princípio de exclusão do vizinho, o qual ocupa um espaço entre dois pares de bases; (b) mono-intercalação, quando o grupo espaçador é rígido para abranger dois pares de bases, e apenas um cromóforo se intercala ao DNA; e (c) *bis*-intercalação rara, que viola o princípio de exclusão do vizinho (Figura 24).

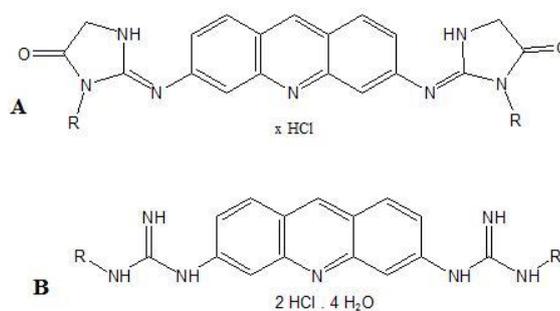


**Figura 24** – Representação esquemática da interação ao DNA de moléculas contendo duas unidades funcionais: (A) *Bis*-intercalação; (B) Mono-intercalação; (C) *Bis*-intercalação com violação do princípio de exclusão do vizinho (KURUVILLA et al., 2005)

A síntese de *bis*-intercaladores vem, nos últimos anos, sendo alvo de interesse por pesquisadores, pois permite a obtenção de agentes quimioterápicos

mais eficazes, devido a maior afinidade de ligação ao DNA, maiores constantes de ligação e taxa de dissociação mais lenta, por incorporação de unidades de intercalação com ligantes polifuncionais (MAHMOOD et al., 2010). Derivados mono e *bis*-acridínicos foram sintetizados e avaliados por Liu et al. (2010), obtendo valor da constante de ligação maior para o derivado *bis*-acridina, sugerindo uma ligação mais forte com o DNA e modo de ligação eficiente através da intercalação.

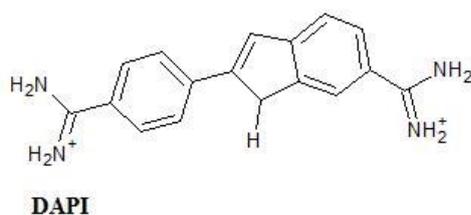
Derivados acridínicos *bis*-imidazolidínico e *bis*-guanidino (Figura 25), foram sintetizados e avaliados por Janovec et al. (2011) e Plsikova et al. (2012), respectivamente, com modificações nas porções laterais com grupamentos alquila. Ambos verificaram que as constantes de ligação dos compostos diminuíram com o aumento do número de carbono.



**Figura 25** – Derivados acridínicos: (A) *bis*-imidazolidínico (B) *bis*-guanidino (JANOVEC et al., 2011; PLSIKOVA et al., 2012)

Outro tipo de intercalação é caracterizada como não clássica, quando compostos poliaromáticos estão envolvidos, pois ocorre simultaneamente a intercalação e ligações no sulcos do DNA (STREKOWSKI e WILSON, 2007). Moléculas com sistema de anéis poliaromáticos fundidos contendo átomos de nitrogênio quaternário são típicos de intercaladores do DNA (FERGUSON e DENNY, 2007), enquanto que moléculas com anéis não fundidos interagem, preferencialmente, por ligação no sulco do DNA (NELSON et al., 2007).

O composto 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Figura 26) é um exemplo de intercalador não clássico, pois seu sistema aromático de anéis não fundidos propicia uma liberdade de rotação suficiente para que a molécula adote uma conformação que se aproxima da curva helicoidal dos sulcos do DNA (WILSON et al., 1990).



**Figura 26** – Estrutura química do DAPI (WILSON et al., 1990)

Contudo, existem moléculas que apresentam como modo de interação principal a ligação em sulco e podem também interagir com pares de bases parcialmente por intercalação (STREKOWSKI e WILSON, 2007).

Em 1961 Lerman sugeriu um modelo de intercalação para o sistema DNA-proflavina, afirmando a existência de um único tipo de complexo com acridinas intercaladas totalmente aos pares de bases, excluindo outros modos de ligação. Aslanoglu (2006) analisou a interação da proflavina com o DNA e também indicou somente a intercalação. Porém estudos mais recentes mostraram que a proflavina apresenta mais de um tipo de interação com o DNA, a intercalação e a ligação externa ou no sulco (GARCIA et al., 2010).

Estudo da análise do comportamento do derivado 9-amino-6-cloro-2-metóxi-acridina (ACMA) (Figura 27) evidenciou que a interação com o DNA não é simples intercalação, pois tanto a ligação intercalante como a ligação externa pode estar presente (BUSTO et al., 2011).



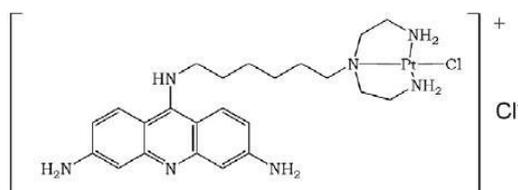
**Figura 27** – Estrutura química do ACMA (BUSTO et al., 2011)

### 3.11 Interação eletrostática

Forças de natureza eletrostática e não eletrostática podem desempenhar um papel fundamental na química dos ácidos nucleicos e na química da interação com o DNA (GARCIA et al., 2010). Interações de ligações eletrostáticas normalmente ocorrem ao longo da face exterior da dupla hélice, entre as espécies catiônicas e o esqueleto de fosfato do DNA carregado negativamente (ZHANG e TANG, 2004).

Biver et al. (2008) evidenciaram que moléculas podem ser constituídas de uma porção central que é a porção responsável pela intercalação, além de grupamentos periféricos que quando carregados positivamente proporcionam uma maior estabilidade para a ligação ao DNA. Em princípio, a contribuição para a carga total de um complexo é concedido não apenas pela presença de um íon, mas também pelo ligante ser protonado a um pH até 7.0 (KHAN et al., 2012).

Biagini et al. (2011) realizaram a síntese de um derivado acridínico contendo um resíduo de platina (Figura 28), sugerindo que enquanto o anel da acridina planar se intercala entre os pares de bases do DNA, o resíduo de platina pode interagir por ligações eletrostáticas ao longo dos grupamentos no sulco do DNA.



**Figura 28** – Estrutura do complexo Pt (II) - 3,6-diamino-9-[6,6-bis(2-aminoetil)-1,6-diaminohexil]acridina (BIAGINI et al., 2011)

Estudos realizados com derivados poliamidas, também elucidam que os mesmos não são agentes de intercalação, mas sim ligantes em sulco, que possivelmente se ligam ao DNA por interações eletrostáticas fortes nos sulcos, com envolvimento de forças hidrofóbicas na complexação (KABIR et al., 2013).

Regiões específicas ao longo da hélice do DNA são sítios preferenciais para a ligação, como por exemplo, sequências ricas em adenina-timina nos sulcos menores devido ao potencial eletrostático negativo nesta porção (YANG e WANG, 1999). Esta observação serve de apoio para pesquisadores no planejamento de compostos estruturalmente mais específicos para ligações mais fortes com o DNA, onde possam estar presentes tanto a intercalação quanto ligações eletrostáticas.

É notável, portanto, que tanto o modo de ligação em sulco quanto a intercalação, apresenta uma dependência considerável da força iônica da molécula, o que sugerem que a atração eletrostática desempenha um papel importante em ambos os modos de ligação (BIVER et al, 2008).

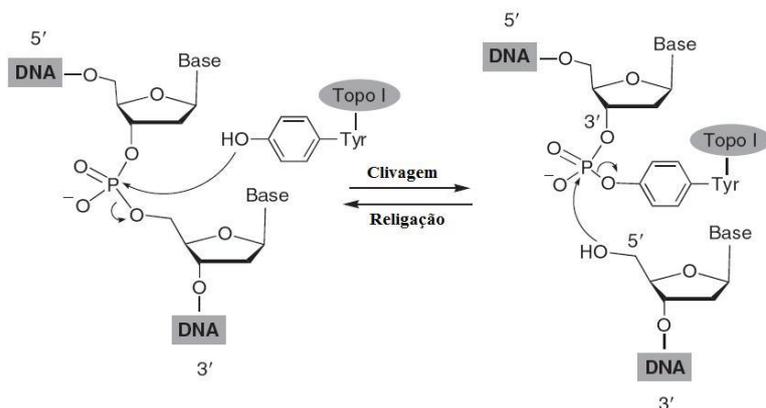
### 3.12 Inibidores da topoisomerase I

As topoisomerasas são enzimas envolvidas no processo de relaxamento do DNA durante inúmeros sistemas críticos celulares, através dos quais conduz a uma quebra transitória em uma ou nas duas fitas de DNA, passando uma ou ambas as fitas ao longo da abertura do DNA e religando as quebras realizadas (LI et al., 2004). Este processo está relacionado com a regulação do DNA superenrolado, que é essencial para a transcrição e replicação, uma vez que a hélice deve ser desenrolada para permitir o funcionamento adequado da maquinaria enzimática envolvida nestes processos (AVENDAÑO e MENENDEZ, 2008).

Estas enzimas catalisam a quebra de ligações fosfodiésteres da molécula de DNA, restituindo-as novamente. A topoisomerase I quebra apenas uma cadeia do DNA, enquanto a topoisomerase II quebra as duas fitas do DNA (NELSON e COX, 2006). Ambas as enzimas são expressas em diferentes níveis nos variados tipos celulares. A expressão da topoisomerase I é marcada nas linhagens celulares de câncer de colo enquanto que das topoisomerasas II são mais frequentes em linhagens celulares de câncer de mama e ovário (HOLDEN et al., 1990), o incentiva os pesquisadores a desenvolverem fármacos capazes de atuar na inibição destas enzimas.

Fármacos capazes de interferir na ação destas enzimas são considerados “venenos topoisomerase”, pois formam um complexo ternário fármaco-enzima-DNA, levando a quebras sucessivas no DNA e destruição de células cancerígenas (BELMONT et al., 2007).

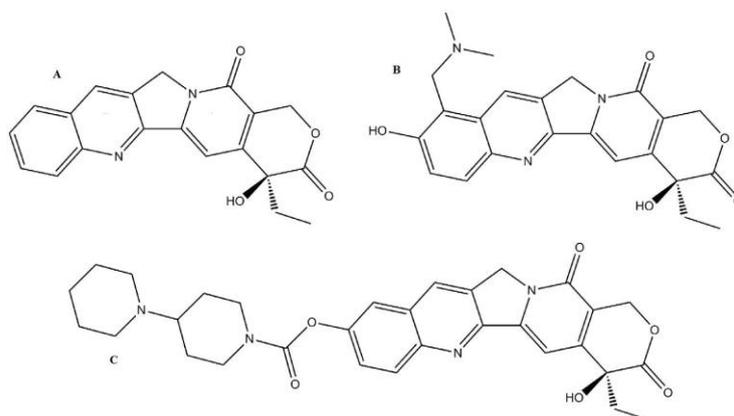
O ciclo catalítico de ambas as enzimas envolve duas etapas de transesterificação (Esquema 13). Na reação de clivagem, forma-se uma ligação covalente através do ataque nucleofílico do grupo hidroxil de um sítio ativo da tirosina da enzima com o grupo fosfato da coluna fosfodiéster do DNA. Na etapa de religação, o grupo 5-hidroxil da desoxirribose ataca a ligação formada anteriormente entre o fosfato e a tirosina (POMMIER, 2009). Nesta fase, a enzima é particularmente vulnerável a grupos de agentes que reversivelmente prende a enzima num complexo entre os pares de bases no local da clivagem, inibindo a religação (DRWAL et al., 2011).



**Esquema 13** – Reação de transesterificação envolvendo a topoisomerase I (AVENDANO e MENENDEZ, 2008)

Inibidores da topoisomerase I, como camptotecina e derivados, convertem a enzima em um veneno celular por inibir o processo de religação, aprisionando-a pela formação de um complexo covalente com o DNA (KOH et al., 2007). A camptotecina é um alcalóide, *Camptotheca acuminata*, descoberta na década de 1980, por inibir a topoisomerase I (WALL e WANI, 1995).

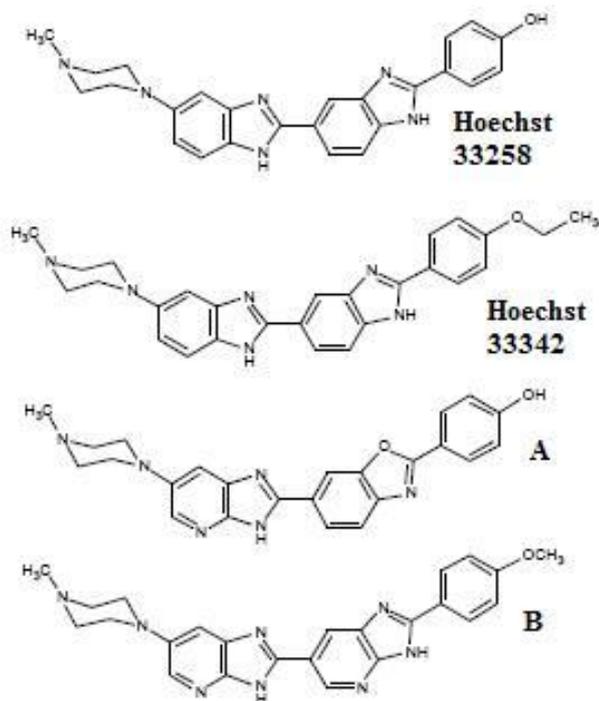
Dois derivados da camptotecina solúveis em água são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para a administração intravenosa: topotecano e irinotecano (Figura 29). Topotecano é utilizado para tratar câncer de ovário e câncer de pequenas células do pulmão (SCLC). O irinotecano (CPT-11) é aprovado pela FDA para tumores colorretais (LACO, 2011).



**Figura 29** – Inibidores da topoisomerase I: (A) Camptotecina; (B) Topotecano; (C) Irinotecano (DRWAL et al., 2011)

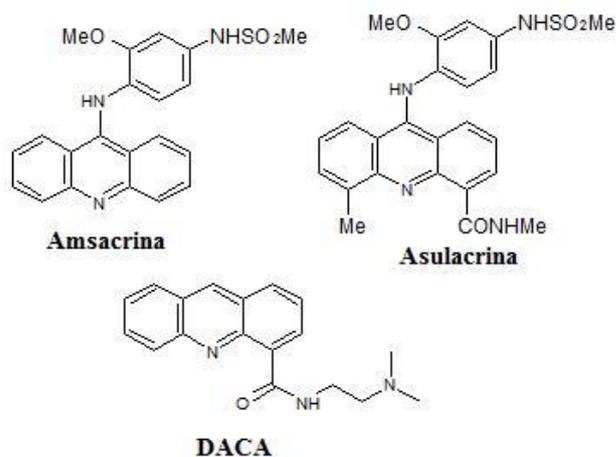
Certos derivados se ligam nos sulcos do DNA são também inibidores da topoisomerase I, como por exemplo, o Hoechst 33258 e Hoechst 33342 que se liga

ao sulco menor nas seqüências de adenina-timina, podendo ainda se intercalar em seqüências ricas em guanina-citosina (BAILLY, 2000). Os análogos de Hoechst, também ligam ao sulco do DNA e inibem a topoisomerase I. Estes são obtidos por substituição dos anéis benzimidazóis por benzoxazol e piridoimidazol (molécula A), e por dois anéis piridoimidazóis (molécula B) (Figura 30).



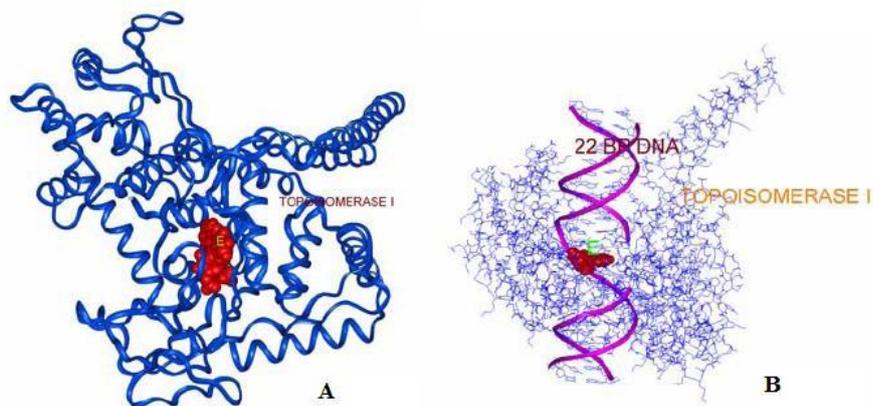
**Figura 30** – Estrutura química de molécula ligantes em sulco inibidores da topoisomerase I (BAILLY, 2000)

Os inibidores da topoisomerase II (Figura 31) incluem moléculas de diferentes famílias, como por exemplo, derivados de acridina (BELMONT et al., 2007).



**Figura 31** – Derivados acridínicos inibidores da topoisomerase II (DENNY, 2002)

Bhowmik et al. (2008) estudaram, através de modelagem molecular, a função de inibição da topoisomerase I de derivados 9-arilacridinas. A figura 32 mostra o resultado da interação de um derivado com a topoisomerase I e com o complexo DNA-enzima, sugerindo que estes derivados acridínicos podem interagir tanto com a enzima topoisomerase I, bem como com o complexo DNA clivado-topoisomerase I.



**Figura 32** – Estudo de modelagem molecular de: (A) 9-arilacridina com topoisomerase I; (B) 9-arilacridina com complexo DNA-topoisomerase I (BHOWMIK et al., 2008)

O estudo realizado com as tiazacridinas e imidazacridinas que é apresentado a seguir correlaciona a síntese, caracterização estrutural e físico-química com as prováveis interações ao DNA e inibição da topoisomerase I humana.

### 3.13. Referências

ACHESON, R.M. Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds. 3<sup>o</sup> Ed. New York: Wiley Interscience, 501 p., 1956.

ALBERT, A. The acridine. 2<sup>o</sup> Ed. London: Edward Arnold Publishers, Ltd. p. 1966.

ASLANOGLU, M. Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of proflavine with DNA. Analytical Sciences. V. 22, p.439-443, 2006.

AVENDAÑO, C.; MENENDEZ, J. C. DNA intercalators and topoisomerase inhibitors. In Medicinal Chemistry of anticancer drugs. 1<sup>o</sup> Ed. Amsterdam: Elsevier, 442 Chapter 7, p. 199-225, 2008.

BAILLY, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*. v. 7, p. 39-58, 2000.

BARALDI, P. G.; BOVERO, A.; FRUTTAROLO, F.; PRETI, D.; TABRIZI, M. A.; PAVANI, M. G.; ROMAGNOLI. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Medicinal Research Reviews*. v. 24, p. 475-528, 2004.

BARROS, F.W.A.; SILVA, T.G.; PITTA, M.G.R.; BEZERRA, D.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; MOURA, M.A.F.B.; ABREU, F.C.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; GOULART, M.O.F. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 20, p. 3533-3539, 2012.

BELMONT, P.; BOSSON, J. GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*. v. 7, p. 139-169, 2007.

BHOWMIK, S. BAGCHI, A. GHOSH, R. Molecular modeling studies of some 9-arylacridines to elucidate their possible roles in Topoisomerase I inhibition. *International Journal of Integrative Biology*. v. 2, p. 8-14, 2008.

BIAGINI, S.; BIANCHI, A.; BIVER, T.; BOGGIONI, A.; NIKOLAYENKO, I.V.; SECCO, F.; VENTURINI, M. DNA binding of a proflavine derivative bearing a platinum hanging residue. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 105, p. 558-562, 2011.

BIVER, T.; SECCO, F.; VENTURINI, M. Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids. *Coordination Chemistry Review*. v. 252, p. 1163-1177, 2008.

BOGER, D. L.; FINK, B. E.; HEDRICK, M. P. Total synthesis of distamycin A and 2640 analogues: a solution-phase combinatorial approach to the discovery of new, bioactive DNA binding agents and development of a rapid, highthroughput screen for determining relative DNA binding affinity or DNA binding sequence selectivity. *Journal of the American Chemical Society*. v. 122, p. 6382-6394, 2000.

BUSTO, N.; GARCIA, B.; LEAL, J.M.; GASPAR, J.F.; MARTINS, C.; BOGGIONI, A.; SECCO, F. ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine) forms three complexes in the presence of DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*. v. 13, p. 19534-19545, 2011.

CAI, X.; GRAY Jr., P.J.; HOFF, D.D.V. DNA minor groove binders: Back in the groove. *Cancer Treatment Reviews*. v. 35, p. 437-450, 2009.

CHEN, G.-J.; QIAO, P.-Q.; XU, G.-J.; XU, J.-Y.; TIAN, J.-L.; GU, W.; LIU, X.; YAN, S.-P. Synthesis, DNA binding, photo-induced DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis studies of copper (II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 105, p. 119-126, 2011.

CHEN, L.-M.; LIU, J.; CHEN, J.-C.; SHI, S.; TAN, C.-P.; ZHENG, K.-C.; JI, L.-N. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex  $[Ru(Melm)_4(dpq)]_{2+}$ . *Journal of Molecular Structure*. v. 881, p. 156-166, 2008.

CHEN, Y.L.; LU, C.M.; CHEN, I.L.; TSAO, L.T.; WANG, J.P. Synthesis and antiinflammatory evaluation of 9-anilinoacridin and 9-phenoxyacridin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 45, p. 4689-4694, 2002.

CORSARO, A.; PISTARÁ, V.; RESCIFINA, A.; ROMEO, G.; ROMEO, R.; CHIACCHIO, U. 1,3-Dipolar cycloadditions of acridine with nitrile oxides. *Arkivoc*. v. viii, p. 5-15, 2002.

DAVID-CORDONNIER, M.H.; HILDEBRAND, M.P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; KEUSER, C.; BENZCHAWEL, K.; LEMSTER, T.; PINDUR, U. Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA-intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors. *European Journal Medicinal Chemistry*. v. 42, p. 752-771, 2007.

DENNY, W.A.; BAGULEY, B.C. Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. *Current topics in Medicinal Chemistry*, v. 3, p. 339-353, 2003.

DENNY, W.A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*. v. 9, p. 1655-1665, 2002.

DENNY, W.A.; ATWELL, G.J.; BAGULEY, B.C.; WAKELIN, L.P. Potential antitumor agents. 44. Synthesis and antitumor activity of new classes of diacridines: importance of linker chain rigidity for DNA binding kinetics and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 28, p. 1568-1574, 1985.

DESBOIS, N.; SZOLLOSI, A.; MAISONIAL, A.; WEBER, V.; MOREAU, E.; TEULADE, J.C.; CHAVIGNON, O.; BLACHE, Y.; CHEZAL, J.M. Simple and convenient conversion of acridones into 9-unsubstituted acridines via acridanes using borane tetrahydrofuran complex. *Tetrahedron Letters*. v. 50, p. 6894-6896, 2009.

DRWAL, M.N.; AGAMA, K.; WAKELIN, L.P.G.; POMMIER, Y.; GRIFFITH, R. Exploring DNA topoisomerase I ligand space in search of novel anticancer agents. *Plos One*. v. 6, p. e25150, 2011

EICHER, T.; HAUPTMANN, S. *The Chemistry of Heterocycles. Structure, Reactions, Syntheses and Applications*. 2<sup>o</sup> Ed. New York: Wiley-VCH, 570 p. 2003.

ELLIOTT, W.L.; HOWARD, C.T.; ROBERTS, B.J.; HOOK, K.E.; VINCENT, P.W.; CORBETT, T.H.; LEOPOLD, W.R. Enhanced therapeutic effect of amsalog (CI-921) in combination with cisplatin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. v. 3, n<sup>o</sup> 6, p. 1153-1159, 1996.

FERGUSON, L.R.; DENNY, W.A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutation Research*. v. 623, p. 14-23, 2007.

FERGUSON, L.R.; DENNY, W.A. The genetic toxicology of acridines. *Mutation Research*. v. 258, p. 123-160, 1991.

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

GARBETT, N.C.; RAGAZZON, P.A.; CHAIRES, J.B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nature Protocols*. v. 2, p. 3166-3172, 2007.

GARCIA, B.; LEAL, J.M.; RUIZ, R.; BIVER, T.; SECCO, F.; VENTURINI, M. Change of the binding mode of the DNA/proflavine system induced by ethanol. *The Journal of Physical Chemistry B*. v. 114, p. 8555-8564, 2010.

GHARAGOZLOU, M.; BOGHAEI, D.M. Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: Fluorescence and circular dichroism studies. *Spectrochimica Acta Part A*. v. 71, p. 1617-1622, 2008.

GHOSH, R.; BHOWIK, S.; BAGCHI, A.; DAS, D.; GHOSH, S. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. *European Biophysics Journal*. v. 39, p. 1243-1249, 2010.

GIORGIO, C.D.; BENCHABANE, Y.; BOYER, G.; PICCERELLE, P.; MÉO, M.D. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. *Food and Chemical Toxicology*. v. 49, p. 2773-2779, 2011.

GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 36, p.857-872, 1995.

GOODELL, J.R.; MADHOK, A.A.; HIASA, H.; FERGUSON, D.M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 14, p. 5467-5480, 2006.

GUENDEL, I.; CARPIO, L.; EASLEY, R.; DUYNE, R.V.; COLEY, W.; AGBOTTAH, E.; DOWD, C.; KASHANCHI, F.; KEHN-HALL, K. 9-aminoacridine inhibition of HIV-1 tat dependent transcription. *Virology Journal*. v. 6, p. 1743-1756, 2009.

HOLDEN, J. A.; ROLFSON, D. H.; WITTEWER, C. T. Human DNA topoisomerase II: evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues. *Biochemistry*. v. 29, p. 2127, 1990.

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

JANGIR, D.K.; DEY, S.K.; KUNDU, S.; MEHROTRA, R. Assessment of amsacrine binding with DNA using Uv-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. *Journal of Photochemistry Photobiology B*. v. 114, p. 38-43, 2012.

JANOVEC, L.; KOZURKOVA, M.; SABOLOVA, D.; UNGVARSKY, J.; PAULIKOVA, H.; PLSIKOVA, J.; VANTOSA, Z.; IMRICH, J. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidionone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v. 19, p. 1790-1801, 2011.

JELIC, S.; NIKOLIC-TOMASEVIC, Z.; KOVCIN, V.; MILANOVIC, N.; TOMASEVIC, Z.; JOVANIVIC, V.; VLAJIC, M. A two-step reevaluation of high-dose amsacrine for advanced carcinoma of the upper aerodigestive tract: a pilot phase II study. *Journal of Chemotherapy*. v. 9, p. 364-370, 1997.

JENKINS, T.C. Optical absorbance and fluorescence techniques for measuring DNA-drug interactions. In *Methods in Molecular Biology. Drug-DNA Interaction Protocols*. v. 90, New Jersey – USA: Keith R. Fox, 278 p. 1997.

JONES, M.; MERCER, A.E.; STOCKS, P.A.; PENSÉE, L.J.I.L.; COSSTICK, R.; PARK, B.K.; KENNEDY, M.E.; PIANTANIDA, I.; WARD, S.A.; DAVIES, J.; BRAY, P.G.; RAWE, S.L.; BAIRD, J.; CHARIDZA, T.; JANNEH, O.; O'NEILL, P.M. Antitumor

and antimalarial activity of artemisinin-acridine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 19, p. 2033-2037, 2009.

JOSEPH, J.; KURUVILLA, E.; ACHUTHAN, A.T.; RAMAIAH, D.; SCHUSTER, G.B. Turning of intercalation and electron-transfer processes between DNA and acridinium derivatives through steric effect. *Bioconjugate Chemistry*. v. 15, p. 1230-1235, 2004.

KABIR, A.; HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. Thermodynamics of the DNA binding of biogenic polyamines: Calorimetric and spectroscopic investigations. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. v 57, p. 445-453, 2013.

KASHANIAN, S.; DOLATABADI, E.N. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*. v. 116, p. 743-747, 2009.

KHAN, G. S.; SHAH, A.; REHMAN, Z.; BARKER, D. Chemistry of DNA minor groove binding agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 115, p. 105-118, 2012.

KOH, Y.; NISHIO, K.; SAIJO, N. Mechanism of action of cancer chemotherapeutic agents: topoisomerase inhibitors. In *The Cancer Handbook*, 2<sup>o</sup> Ed., Wiley, 1616 p. 2007.

KULMALA, S.; SUOMI, J. Current status of modern analytical luminescence methods. *Analytica Chimica Acta*. v. 500, p. 21-69, 2003.

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

KURUVILLA, E. e RAMAIAH, D. Selective Interactions of a few acridinium derivatives with single strand DNA: study of photophysical and DNA binding interactions. *Journal Physical Chemistry B*. v. 111, p. 6549-6556, 2007.

KURUVILLA, E.; JOSEPH, J.; RAMAIAH, D. Novel bifunctional acridine-acridinium conjugates: synthesis and study of their chromophore-selective electron-transfer and DNA-binding properties. *The Journal of Physical Chemistry B*. v. 109, p. 21997-22002, 2005.

KYPR, J.; KEJNOVSKÁ, I.; RENCIUUK, D.; VORLÍČKOVÁ, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*. v. 37, n° 6, p. 1713-1725, 2009.

LACO, G.S. Evaluation of two models for human topoisomerase I interaction with dsDNA and camptothecin derivatives. *Plos One*. v. 6, p. e24314, 2011.

LERMAN, L.S. Structure considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*. v. 3, p. 18-30, 1961.

LI, G.; LEE, C-S.; WOO, M-H.; LEE, S-H.; CHANG, H-W.; SO, J-K. Lignans from the Bark of *Machilus thunbergii* and their DNA Topoisomerases I and II inhibition and Cytotoxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v. 27, p. 1147-1150, 2004.

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

LIU, J.; WANG, Z.-H.; LUO, G.-A.; LI, Q.-W.; SUN, H.-W. The interaction of DNA with dopamine by spectroscopic and electrochemical methods. *Analytical Sciences*. v. 18, p. 751-755, 2002.

LONG, E.C.; BARTON, J.K. On demonstrating DNA intercalation. *Accounts of Chemical Research*. v. 23, n° 8, p. 271-273, 1990.

LORENTE, A.; VAZQUEZ, Y.G.; FERNANDEZ, M.J.; FERNANDEZ, A. Bisacridines with aromatic linking chains. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 12, p. 4307-4312, 2004.

LOZA-MEJÍA, M.A.; OLVERA-VAZQUEZ, S.; MALDONADO-HERNANDEZ, K.; GUADARRAMA-SALGADO, T.; GONZALEZ-SANCHEZ, I.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, F. Synthesis, cytotoxic activity, DNA topoisomerase-II inhibition, molecular modeling and structure-activity relationship of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 3266-3277, 2009.

MA, D.L.; CHAN, D.S.H.; LEE, P.; KWAN, M.H.T.; LEUNG, C.H. Molecular modeling of drug-DNA interactions: virtual screening to structure-based design. *Biochimie*. v. 93, p. 1252-1266, 2011.

MAHMOOD, I.; PAUL, A.; LADAME, S. Synthesis and spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes. *The Journal of Organic Chemistry*. v. 75, p. 204-207, 2010.

MOSHER, M.D.; NATALE, N.R. The preparation of intercalating isoxazoles via a nitrile oxide cycloaddition. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. v. 32, p. 779-781, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 4<sup>o</sup> Ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p. 2006.

NELSON, S.M.; FERGUSON, L.R.; DENNY, W.A. Non-covalente ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mutation Research*. v. 623, p. 24-40, 2007.

NETO, B.A.D.; LAPIS, A.A.M. Recent developments in the chemistry of desoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules*. v. 14, p. 1725-1746, 2009.

PASTRE, D.; PIETREMENT, O.; LANDOUSY, F.; HAMON, L.; SOREL, I.; DAVIS, M. O.; DELAI, E.; ZOZIME, A.; LE CAM, E. A new approach to DNA bending by polyamines and its implication in DNA condensation. *European Biophysics Journal*. v. 35, p. 214-223, 2006.

PASTWA, E.; CIESIELSKA, E.; PIESTRZENIEWICZ, M.K.; DENNY, W.A.; GNIAZDOWSKI, M.; SZMIGIERO, L. Cytotoxic and DNA-damaging properties of N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA) and its analogues. *Biochemical Pharmacology*. v. 56, p. 351-359, 1998.

PATEL, M.M.; MALI, M.D.; PATEL, S.K. Bernthsn synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 32, p. 779-781, 2010.

PAULIKOVA, H.; VANTOVA, Z.; HUNAKOVA, L.; CIZEKOVA, L.; CARNA, M.; KOZURKOVA, M.; SABOLOVA, D.; KRISTIAN, P.; HAMULAKOVA, S.; IMRICH, J. DNA binding acridine-thiazolidinone agents affecting intracellular glutathione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Accepted in 26 september 2012.

PEREZ-FLORES, L.; RUIZ-CHICA, A. J.; DELCROS, J. G.; SANHEZ-JIMENEZ, F. RAMIREZ, F. J. Intercalation and groove binding of na acridine-spermine conjugate on DNA sequences: na FT-Raman and UV-visible absorption study. *Journal of Molecular Struture*. v. 744-747, p. 699-704, 2005.

PLSIKOVA, J.; JANIVÉC, L.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; MIKES, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROČKO, P. IMRICH, J.; KRISTIAN, P.; KASPARKOVA, J.; BRADEC, V.; KOZURKOVA, M. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents. *European Journal Medicinal Chemistry*. v. 57, p. 283-295, 2012.

POMMIER, Y. DNA Topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Review*. v 109, p. 2894-1902, 2009.

PRAJAPATI, S.P.; KAUSHIK, N.K.; ZAVERI, M.; MOHANAKRISHANAN, D.; KAWATHEKAR, N.; SAHAL, D. Synthesis, characterization and antimalarial evaluation of new  $\beta$ -benzoylstyrene derivatives of acridine. *Arabian Journal of Chemistry*. Accepted in 23 july 2012.

RAO, S.N; KOLLMAN, P.A. Molecular mechanical simulations on double intercalation of 9-amino acridine into D(CGCGCGC).D(GCGCGCG) – Analysis of the physical basis for the neighbor-exclusion principle. Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 84, p. 5735-5739, 1987.

RUIZ-CHICA, J.; MEDINA, M.A.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F.; RAMIREZ, F.J. Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1628, p. 11-21, 2003.

SANCHEZ-CARRASCO, S.; DELCROS, J.G.; MOYA-GARCIA, A.A.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; RAMIREZ, F.J. Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA. Biophysical Chemistry. v. 133, p. 54-65, 2008.

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

STEFANI, H. A. Introdução à química de compostos heterocíclicos. v. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 289 p. 2009.

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

SHAHABADI, N.; MOGHADAM, N.H. Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. Spectrochimica Acta Part A. v. 99, p. 18-22, 2012.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. Spectrochimica Acta Part A. v. 97, p. 406-410, 2012.

SILVA, T.G. Síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e acridino-imidazolidínicos. 2003 (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

SILVA, F.S.V.C.B. Síntese e Avaliação Biológica de novos derivados Acridino-tiazolidínico e Benzilideno-imidazolidínicos. 2001 (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.

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

SOUSA, F., PRAZERES, D.M.; QUEIROZ, J.A. Circular dichroism investigation of the effect of plasmid DNA structure on retention in histidine chromatography. *Archives of Biochemistry Biophysics*. v. 467, p. 154-162, 2007.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutation Research*. v. 623, p. 3-13, 2007.

SUH, D.; OH, Y.-K.; CHAIRES, J.B. Determining the binding mode of DNA sequence specific compounds. *Process Biochemistry*. v. 37, p. 521-525, 2001.

SUH, D.; CHAIRES, J.B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 2, nº 6, p. 723-728, 1995.

SYNDER, R.D.; McNULTY, J.; ZAIROV, D.E.; EWING, L.B. The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. *Mutation Research*. v. 578, p. 88-99, 2005.

TSUGE, O.; NISHINOHARA, M.; TASHIRO, M.B. 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<sup>o</sup> 11, p. 1477- 1485, 1963.

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

VALEUR, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 1<sup>o</sup> Ed. New York: Wiley-VCH, 388 p. 2001.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic-thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. Cancer Research. v. 55, p. 753-760, 1995.

WANG, L.; PRICE, H.L.; JUUSOLA, J.; KLINE, M.; PHANSTIEL, O. Influence of polyamine architecture on the transport and topoisomerase II inhibitory properties of polyamine DNA-Intercalator conjugates. Journal Medicinal Chemistry. v. 44, p. 3682-3691, 2001.

WANG, J.C. DNA topoisomerases, Annual Review Biochemistry. v. 65, p. 635-692, 1996.

WILSON, W.D.; BARTON, H.J.; TANIOUS, F.A.; KONG, S.-B.; STREKOWSKI, L. The interaction with DNA of unfused aromatic systems containing terminal piperazino substituents. Intercalation and groove-binding. Biophysical Chemistry. v. 35, p. 227-243, 1990.

WILSON, W.D; TANIOUS, F.A.; BARTON, H.J.; JONES, R.L.; FOX, K.; WYDRA, R.L.; STREKOWSKI, L. DNA sequence binding modes of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry. v. 29, pages, 8452-8461, 1990.

WOODY, R.W. Circular dichroism. Methods in Enzymology. v. 246, p. 34-71, 1995.

YANG, X. L.; WANG, A. H. J. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 83, p. 181-215, 1999.

ZHANG, L.Z.; TANG, G.-Q. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 74, p. 119-125, 2004.

ZEGLIS, B.M.; PIERRE, V.C.; BARTON, J.K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications*. v. 44, p. 4565-4579, 2007.

ZHOU, C.Y.; XI, X.L.; YANG, P. Studies on DNA binding to metal complexes of sal<sub>2</sub>trien. *Biochemistry*. v. 72, p. 37-43, 2007.

---

## ***METODOLOGIA***

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Material e Métodos**

Para a síntese e comprovação estrutural dos novos derivados acridínicos sintetizados, foram utilizados os seguintes equipamentos, placas cromatográficas, reagentes, solventes: Placas Merck silicagel 60 F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm).

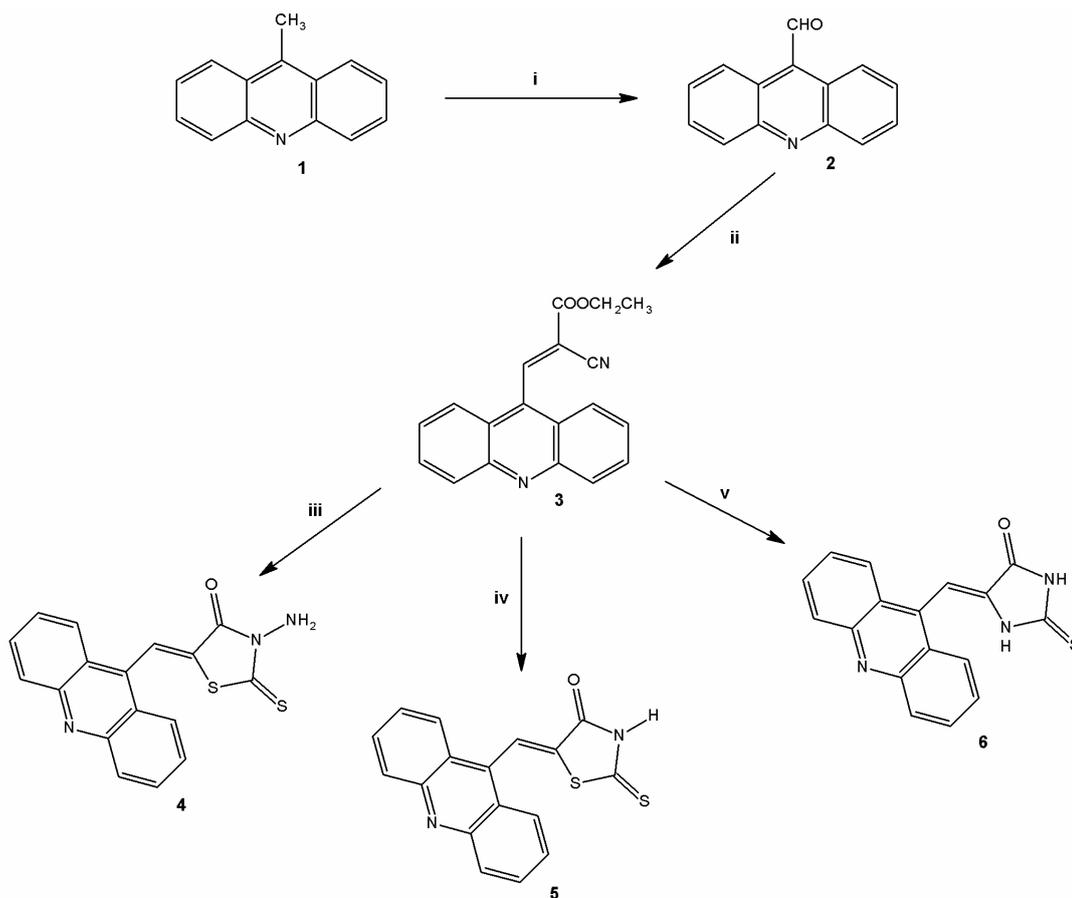
### **4.2 Equipamentos**

- ✓ Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - FTIR Bruker Modelo IFS 66 do DQF da UFPE.
- ✓ Espectrômetro de RMN<sup>1</sup>H - espectrômetro Varian Modelo Plus 300 MHz do DQF da UFPE.
- ✓ Espectrometria de Massa - aparelho LC/MS HCT ultra da Bruker Daltonics.
- ✓ Determinação dos pontos de fusão - Quimis Modelo 340.27 do LPSF
- ✓ Lâmpada de Ultravioleta - Philco do LPSF
- ✓ Rota evaporador - Fisatom do LPSF

### **4.3 Metodologia**

#### **Síntese dos derivados tiazacridínicos e Imidazolidínico**

O diagrama de síntese abaixo apresenta o diagrama de síntese de novos derivados: 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (LPSF/AC-157), 5-acridin-9-ilmetilideno-3-amino--2-tioxo-tiazolidin-4-ona (LPSF/AC-127), 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A) e 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxo-imidazolidin-4-one (LPSF/AC-5) (Esquema 14).



**Esquema 14** - Diagrama de síntese dos derivados tiazacridínicos e imidazacridínico.

## 4.4 Procedimentos:

### 4.4.1 Tiazolidina-2,4-diona

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador sob refluxo, foram adicionados quantidades equimolares de tiouréia e de ácido monocloroacético, previamente dissolvidos em 16 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 80 °C por 18 horas e, em seguida, mantida sob refrigeração durante 24h. Os cristais foram isolados por filtração e purificados através de sucessivas lavagens com água destilada.

### 4.4.2 9-Metil-acridina (LPSF/AC-1)

Em um balão de 500 mL de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador sob refluxo, foram adicionados 5g de difenilamina

(0,029 mols), 20 g de cloreto de zinco (0,147 mols) e 5 mL de ácido acético. A mistura foi aquecida gradativamente até 230 °C e mantida por 8 horas. Após resfriamento, a mistura reacional foi tratada com uma solução ácido sulfúrico a 10 % e, em seguida, alcalinizada pela adição de uma solução aquosa de hidróxido de amônio a 30 %. O produto foi isolado através de extração com acetato de etila e concentrado em rota evaporador a 50 °C. A 9-metil-acridina foi purificada através de cromatografia sob pressão em sílicagel 60, utilizando como sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3.

#### **4.4.3 Acridina-9-carboxaldeído (LPSF/AC-2)**

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados 1 g (0,005 mols) de 9-metil-acridina, 0,006 mols de clorocromato de piridínio e cloreto de metilo. A mistura mantida sob agitação à temperatura ambiente por 8 horas.

#### **4.4.4 3-Acridin-9-il--2-ciano acrilato de etila (LPSF/IP-29)**

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador sob refluxo, foram adicionadas quantidades equimolares da 9-acridina-carboxaldeído (2,182 g – 0,105 mols) e do cianoacetato de etila (3 mL) na presença de 250 µL de trietilamina como catalizador. A mistura reacional foi aquecida a 110°C e mantida 8 horas. O produto foi purificado por cromatografia sob pressão em sílica gel 60, *n*-hexano/AcOEt 6:4.

#### **4.4.5 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160)**

Em um balão de 50 mL foi adicionado a 9-metil-acridina (500 mg – 0,0025 mols), 1 Eq do N-bromosuccinamida, 1 Eq do peróxido de benzoíla em 18 mL de clorofórmio. A reação foi aquecida à refluxo e acompanhada por CCD durante 5 horas. A 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160) foi filtrada e a água-mãe evaporada a secura. O material obtido foi solubilizado em acetato de etila e lavado com uma solução de HCl 1N. A fase aquosa foi alcalinizada com KHCO<sub>3</sub>, havendo a

precipitação do derivado acridínico. O produto foi purificado através de extração com acetato de etila.

#### **4.4.6 3-Acridin-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A)**

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados a tiazolidina-2,4-diona e hidróxido de sódio previamente dissolvido em álcool etílico. A mistura reacional foi agitada durante 10 minutos. Passado este tempo, foi adicionado a 9-bromo-metil-acridina em quantidades equimolares e a mistura foi aquecida e mantida a uma temperatura de 60°C durante 7 horas. O produto foi lavado com água destilada e, depois, purificado com álcool etílico.

#### **4.4.7 Derivados Tiazacridínicos e Imidazacridínicos**

Em um balão de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador, foram adicionados quantidades equimolares do tiazolidina-2,4-diona ou 2-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona ou 2-tioxo-imidazolidin-4-ona e a 3-Acridin-9-il-2-ciano acrilato de etila (LPSF/IP-29) dissolvidos em álcool etílico, na presença de morfolina como catalisador. A mistura reacional foi aquecida e mantida sob refluxo a 50 °C por 4 horas levando à formação dos novos derivados tiazacridínicos ou imidazacridínico que foram purificados através de lavagens sucessivas com água destilada e álcool etílico.



## ***ARTIGO***

## Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacrine derivatives

Elizabeth Almeida Lafayette<sup>a</sup>, Sinara Mônica Vitalino de Almeida<sup>b</sup>, Marina Galdino da Rocha Pitta<sup>a</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>b</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>c</sup>, Suely Lins Gladino<sup>a</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima<sup>a\*</sup>, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior<sup>b</sup>, Ivan da Rocha Pitta<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 **3257-3838**; Fax: +55 81 **2126-8347**

E-mail address: nenalima.mariadocarmo@gmail.com

### Highlights:

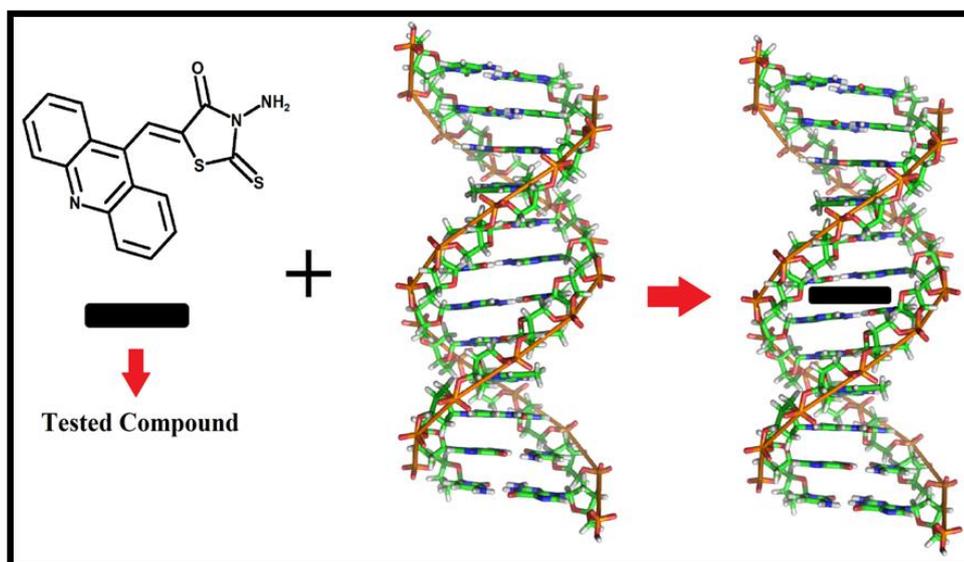
- DNA binding properties of imidazacrine and thiazacridine derivatives were analyzed.
- The compounds showed strong DNA binding activity both by intercalation or external binding.
- Compounds have promising structures for the development of topoisomerase 1 inhibitors

### Abstract

Thiazacridine and imidazacridine derivatives have been shown promising results as tumour suppressors in some cancer cell lines. For a better understanding of action mechanism of these compounds, binding studies of 5-acridin-9-ylmethylidene-3-amino-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**4**), 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**5**), 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (**6**) and 3-acridin-9-ylmetil-thiazolidine-2,4-dione (**7**) with calf thymus DNA (ctDNA) were performed by electronic absorption and fluorescence spectroscopy and circular dichroism spectroscopy. The binding constants were found ranging between 1.46 and 6.01 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. UV-vis, fluorescence and circular dichroism measurements indicated that the compounds interact effectively with ctDNA both by intercalation or external binding, besides the compounds **4**, **6** and **7** demonstrated inhibitory activity to human topoisomerase 1 at 200 μM. Taken together, this study provided insight into DNA binding mechanism of imidazacridines and thiazacridines, however, are promising molecules in development of new compounds.

**Keywords:** thiazacridine, imidazacrine, DNA binding, topoisomerase I inhibitor

## Graphical abstract



### 1. Introduction

DNA intercalators are among the most important and promising therapeutic agents to treat many diseases such as cancer. The discovery and development of novel therapeutic intercalators agents for the treatment of malignancy are some of the most important goals in modern medicinal chemistry.<sup>1</sup> Despite of lacking a detailed mechanistic understanding at molecular level of the intercalation process<sup>2</sup>, it is already known that the binding interaction between external molecules and nucleic acids leads to a significant change in their structures and may have an important influence on their physiological functions.<sup>3</sup> In general, guest molecules may associate to DNA by groove-binding, intercalation or by attractive electrostatic interactions.<sup>4</sup>

Acridine derivatives have been used for commercial purposes for more than a century and recently are investigated as DNA intercalators.<sup>5</sup> These molecules are characterized by the presence of a planar polycyclic system presenting three rings and one or two flexible substituent groups and are well-known probes for nucleic acids as well as being relevant in the field of drug development to establish new chemotherapeutic agents.<sup>6</sup> The biological activity of acridines has been attributed to the planarity of these aromatic structures, which can intercalate within double-stranded DNA, thus interfering with cellular functions.<sup>7-9</sup>

The cytotoxicity of most acridine-based drugs is founded on their ability to suppress topoisomerase activity.<sup>8,10</sup> There are two possibilities for an intercalator to influence the topoisomerase activity and therewith suppress the proliferation of the cell: (a) by the

intercalation, the binding site of the topoisomerase is occupied, and the complex formation between the enzyme and the DNA is hindered; and on the other hand, (b) a ternary complex between DNA, intercalator and topoisomerase may be formed which is significantly more stable than the DNA–topoisomerase complex. The stability of the ternary complex may lead to an enhanced lifetime of the cleaved DNA, i.e., the re-ligation of the strands cannot take place and the strand breaks remain permanent. Thus, the topoisomerase acts as an endogenous poison and may induce apoptosis.<sup>11</sup>

Amsacrine is a 9-anilinoacridine derivative used to treat a wide variety of cancers including leukemia and lymphomas.<sup>12</sup> It was one of the first DNA-intercalating agents to be considered as a topoisomerase II inhibitor. The significant clinical use of several of these compounds is limited by problems such as side effects, drug resistance and poor bioavailability, which have encouraged further modifications to these compounds. At present, almost all the reported antitumor agents in the acridine series have been derived from pattern compounds and they have incorporated changes in the substituents or heterocyclic system modifications.<sup>13</sup>

A strategy that has been used by our group for synthesis of a new class of compounds is by coupling acridine and thiazolidine or imidazolidine nucleus to obtain thiazacridine and imidazacridine derivatives, respectively.<sup>5,14</sup> By assaying their biological activities using diverse techniques based on various mechanisms of action, we found these derivatives to be a new class of drugs that are effective in cancer therapy.<sup>15,16</sup>

Although the promising results from cytotoxic assays performed with thiazacridine and imidazacridine derivatives against cancer cells lines, it is necessary a better understanding of the mechanism of interaction between these compounds and DNA or keys enzymes that can be drug targets, such as topoisomerase. In this way, in the present paper we describe the synthesis, DNA binding study using ctDNA and human topoisomerase I inhibition activity of imidazacrine and thiazacridine derivatives.

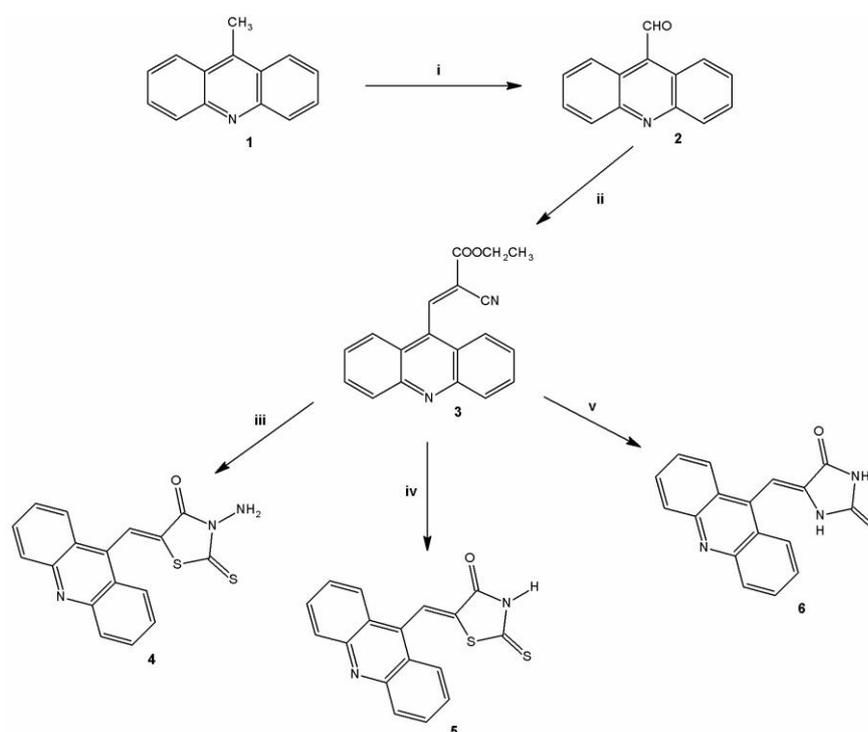
## **2. Results and discussion**

### **2.1. Chemistry**

Derivatives analyzed in this study were all synthesized in the Laboratory of Synthesis and Planning of Drug at the Federal University of the State of Pernambuco (UFPE). The synthesis of acridines derivatives **4**, **5** and **6** was performed according to *scheme 1*. 9-Methylacridine (**1**) was prepared from diphenylamine with zinc dichloride in acetic acid according to Tsuge and co-workers (1963).<sup>17</sup> Subsequently, the oxidation of **1** with pyridinium

chlorochromate (PCC), accomplished according to Mosher and Natale (1995)<sup>18</sup>, gave the 9-acridinaldehyde (**2**). Following the compound **2** was treated with ethyl cyanoacetate to form 2-cyano-acridine-9-yl-acrylate ethyl ester (**3**). In the final step the **3** intermediate is reacted in absolute ethanol and morpholine with 3-amino-2-thioxo-4-thiazolidinone or 2-thioxo-4-thiazolidinone (*Sigma/Aldrich*), yielding the 5-acridin-9-ylmethylidene-3-amino-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**4**) or 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**5**), respectively. This same intermediate **3** is reacted with a 2-thioxo-4-imidazolidinone in the presence of ethanol and piperidine to give 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one derivative (**6**). The purity of new compounds synthesized was verified by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, high resolution mass spectrum and infrared spectroscopy.

Synthesis of 3-acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione derivative (**7**) was performed according to Pitta and co-workers (2012).<sup>14</sup> Fig. 1 shows the chemical structure of **7**.



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) PCC; (ii) ethyl cyanoacetate, triethylamine, 110° C; (iii) 3-amino-2-thioxo-4-thiazolidinone, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 50° C; (iv) 2-thioxo-4-thiazolidinone, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 50° C; (v) 2-thioxo-hidantoína, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH e piperidine, 45 – 55° C.

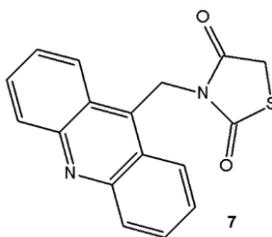


Fig. 1 – Chemical structure of 3-acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione derivative (**7**).

## 2.2. UV–vis spectral absorbance

The interaction of the thiazacridine and imidazacridine derivatives with calf thymus DNA (ctDNA) was monitored by spectrophotometric titrations in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.6) (see section 4.2). According to Sabolová and co-workers (2006)<sup>19</sup>, the UV–vis spectra of the acridine derivatives show a significant absorption in the range of 350–450 nm, typical for transitions between  $\pi$ -electron energy levels of the acridine ring (Supporting Information). Table 1 demonstrates the absorption spectra data of acridine derivatives in absence of ctDNA.

In general, upon DNA binding the molecule is positioned in an environment which is different from that of the uncomplexed molecule in solution. Due to these different features, the electron distribution is distorted upon  $\pi$ -stacking with the bases. This contributes to significant different compound absorption properties in the complexed and uncomplexed forms.<sup>4</sup> Thus, the addition of DNA to a solution of an intercalator results in a characteristic shift of the absorption maximum to longer wavelengths (bathochromic shift or red shift) and a decrease (hypochromicity) or increase (hyperchromicity) of the absorbance.<sup>20-22</sup>

Table 1 – UV–vis absorption data of the acridine derivatives.

Compound	$\lambda_{\max}$ free (nm)	$\lambda_{\max}$ bound (nm)	Extinction coefficient ( $\epsilon$ ) M <sup>-1</sup>	Hypochromicity (%)	Kb M <sup>-1</sup>	Log P
4	346	346	10.340	40.43	1.46 x 10 <sup>4</sup>	3.37
5	345	345	2.420	0	2.37 x 10 <sup>4</sup>	2.93
6	364	368	14.840	28.85	3.25 x 10 <sup>4</sup>	3.44
7	361	361	8.000	15.50	6.01 x 10 <sup>4</sup>	2.24

Compounds **4**, **6** and **7** showed a decrease of the peak intensity in the presence of DNA, while DNA did not absorb light in this region (Fig 2). Conversely, addition of increasing amounts of CT DNA to **5** shows a hyperchromism effect (Fig 3), with decreasing of 52.89% at concentration of 60  $\mu$ M of ctDNA. Comparing hypochromism among the other derivatives demonstrated that compound AC-127 had the most remarkable decrease of the peak intensity (Table 1).

Distinct spectroscopic behaviors stems from the different nature of the substituents located around the main acridine structure, which can affect the kinetic and thermodynamic aspects of DNA binding.<sup>23</sup> Absence or presence of amino moiety at position 3 of thiazolidin-4-one ring can explain the hypochromic or hyperchromic effect presented by **4** and **5** compounds, respectively. Hyperchromism demonstrated by addition of ctDNA to **5** suggests a strong interaction between the compound and DNA which is different from the classical intercalation binding, as demonstrated for metformin by Shahabadi and Heidari (2012)<sup>22</sup>, where they observed a hyperchromism of 9.7%.

Therefore, both hyperchromic as hypochromic effects are spectra features of DNA concerning its double helix structure. The spectral change process reflects the corresponding changes in DNA in its conformation and structure after thiazacridine and imidazacridine binding to DNA. Hypochromism results from the contraction of DNA in the helix axis, as well as from the conformational change of DNA; in contrast, hyperchromism derives from damage of the DNA double-helix structure.<sup>24,25</sup>

In addition to the hypochromic phenomenon, a small bathochromic shift of **6** was also observable in the spectra. Fig 3 shows a red shift ( $\Delta\lambda = 4$  nm), changing the maxima intensity peak from 364 to 368 nm. Differently, no red shift was observed for the other compounds. Hypochromic and bathochromic effects indicate that compound **6** may bind to DNA and form stable complexes by intercalation mode through the stacking of DNA bases.<sup>7</sup> Study performed with acridones derivatives showed that the combining of these two effects indicating strong interaction with the DNA helix, and the mechanism of action sequence-selective minor groove binding combined with DNA intercalation can be supposed.<sup>20</sup>

The absorbance intensity change was used to calculate the DNA binding constants ( $K_b$ ) of the acridine derivatives according to a method of McGhee and von Hippel (1974).<sup>26</sup> Binding parameters from spectrophotometric analysis are summarized in table 1. Typical binding constants for intercalation complexes between organic dyes and DNA range from  $10^4$  to  $10^6$   $M^{-1}$  and are usually significantly smaller than the binding constants of groove binders ( $10^5$  to  $10^9$   $M^{-1}$ ).<sup>4</sup> The larger  $K_b$  value of **7** suggests a stronger binding towards DNA.

In spite of the wealth of structural data known for intercalation complexes, the origin of the intercalation forces is not fully understood. Intercalation has been generally considered to be the result of a hydrophobic aromatic molecule is drawn to a hydrophobic environment of the base pairs from the hydrophilic aqueous environment.<sup>27</sup> Groove binding compounds generally contain unfused aromatic ring systems linked by bonds with torsional freedom that allows the molecules adopt appropriate conformation to fit the helical curvature of the groove

without significant perturbation of the DNA.<sup>21</sup> The rotation freedom between acridine ring and substituent moiety depends on the spacer features. Compound **7** possesses a methylene bridge linking acridine ring and thiazolidine-2,4-dione moiety and therefore, it is supposed that a high flexibility permits the necessary rotation of substituent before intercalation or a better conformation for groove-binding. Differently, the other derivatives exhibit double bond group as spacer which can result at least in part to a restriction in conformational freedom.<sup>28</sup>

Other important feature of structure of intercalators is the presence of cationic groups, because when using cationic intercalators, one observes a significant electrostatic contribution to the binding energy for molecules with a predominantly positive electrostatic potential (charged or, in some cases, highly polar intercalators.<sup>1</sup> Moreover, specific interactions of organic cationic molecules with DNA neutralize phosphate charges and result in the release of condensed counterions. This ion release provides an entropic contribution to the binding free energy.<sup>27</sup> Besides this, it was demonstrated by docking study that a higher number of capable groups of forming hydrogen bonds is associated with better intercalation factor and genotoxicity for acridine compounds.<sup>29</sup>

Studies about binding constant of acridine-imidazolidinone derivatives showed that depending on the nature of the alkyl substituents on imidazolidinone ring, the binding constant decrease with increasing mass of alkyls in the order: ethyl > propyl > butyl > pentyl > hexyl.<sup>8</sup> Amsacrine-DNA link analysis have showed that the binding constant of the formed complex was found to be  $K = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , indicating weak or moderate strength of binding between them.<sup>12</sup>

The cytotoxicity of compounds can be associated with their DNA-binding properties but also with their hydrophobicity interference. The octanol-water partition coefficient (log P) was used by Janovec and co-workers (2011)<sup>8</sup> as a measure of molecular hydrophobicity. The authors verified that imidazolidones acridine derivatives with strong cytotoxic effect showed the highest value of log P. Herein, a partial investigation of the cytotoxic behavior of the produced acridine derivatives was performed using the log of *P* value (table 1).

Among compounds presented here derivative **7** already been tested for anticancer activity in a cell toxicity assay against three human cancer cell lines: central nervous system (SF-295), colon carcinoma (HCT-8) and melanoma (MDA-MB-435), showing only activity against HCT-8, with a 42% inhibition on cell viability.<sup>14</sup> Association between these results with the log P value of derivative **7** is consistent with analysis performed by Janovec and co-workers (2011)<sup>8</sup>, where low hydrophobicity is related to low cytotoxic effect. Based on these findings, it can be supposed that derivative **6** presents the best cytotoxic potential.

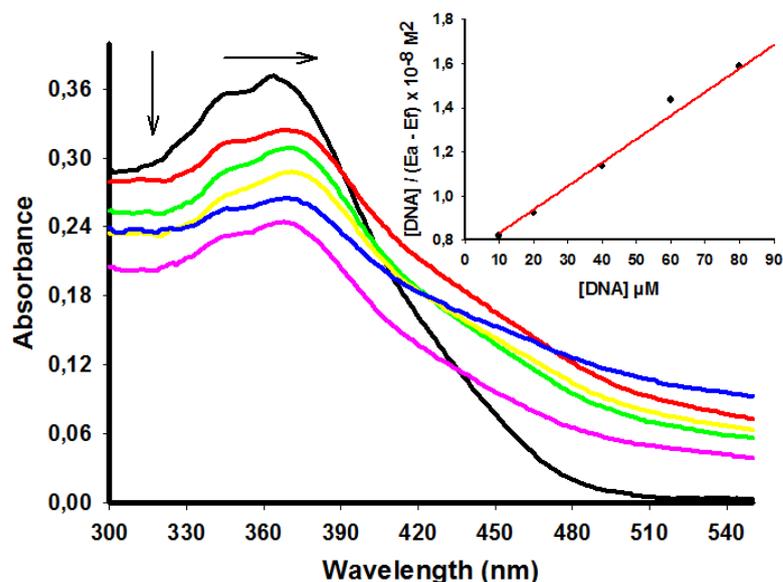


Fig. 2 – Absorption spectra of derivative **6** (25 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60 e 80 μM. Arrows (↓) and (→) refer to hypochromic and bathchromic effects, respectively. Inset: corresponding to the plot of  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  as function of DNA concentration as determined from the absorption spectral data.

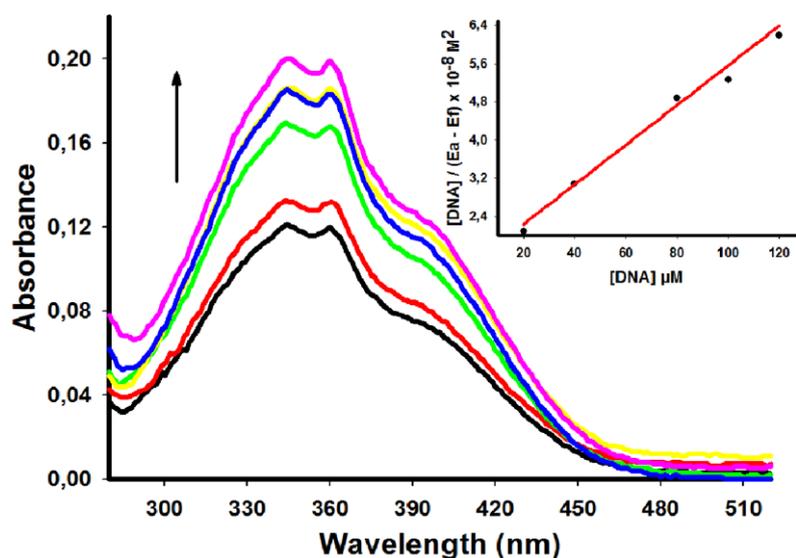


Fig. 3 – Absorption spectra of derivative **5** (50 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60 e 80 μM. Arrow (↑) refers to hyperchromic effect. Inset: corresponding to the plot of  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  as function of DNA concentration as determined from the absorption spectral data.

### 2.3 Fluorescence emission spectra

In order to confirm the interaction of acridine derivatives with ctDNA, binding properties were also investigated by fluorescence spectroscopy. The interaction between DNA

and intercalators can be monitored either by a “light up” effect (increase on its fluorescence intensity upon binding) or, in most cases by a “light off” effect (fluorescence decrease after binding). Differences in fluorescence properties of the DNA-bound compound complexes are influenced by substituents at the peripheral sides of the molecules.<sup>21</sup>

Fluorescence emission was detected after equilibrium was reached to an optimum level. Upon binding to DNA the fluorescence of all compounds was efficiently quenched by the DNA bases, as shown in Fig. 4 and 5, for **6** and **5**, imidazacridine and thiazacridine, respectively. Derivative **5** showed the highest decrease in fluorescence emission, while derivative **7** presented the smaller decrease (table 2). Emission-quenching phenomenon also reflects the interaction between the derivatives and ctDNA, consistent with the results from electronic absorption spectroscopy.<sup>7</sup>

Table 2 – Fluorescence emission data of acridine derivatives in presence of ctDNA.

<b>Compound</b>	<b><math>\lambda</math> excitation (nm)</b>	<b><math>\lambda</math> emission (nm)</b>	<b>I / I<sub>0</sub></b>
4	360	415	1.67
5	356	440	2.27
6	364	418	1.11
7	360	435	1.0

Fluorescence is only observed from the unbound fluorophore. A variety of molecular interactions can result in quenching, including excited-state reactions, molecular rearrangement, energy transfer, ground-state complex formation, and collisional quenching. Quenching normally refers to nonradiative energy transfer from excited species to other molecules. In quenching process, the quencher concentration must be high enough that the probability of collision between the analyte and quencher is significant during the lifetime of the excited species.<sup>22</sup> Analysis of DNA binding of the compound 9-amino-6-chloro-2-methoxy-acridine (ACMA) showed that fluorescence quenching of ACMA by DNA is informative of intercalation, whereas the absorption spectrum may shed light into possible external binding, suggest that the DNA-ACMA interaction is not a simple one and that both the intercalative as external binding can be present.<sup>23</sup> In this way, the kind of interaction of the acridine derivatives produced is consistent both with intercalation as external binding.

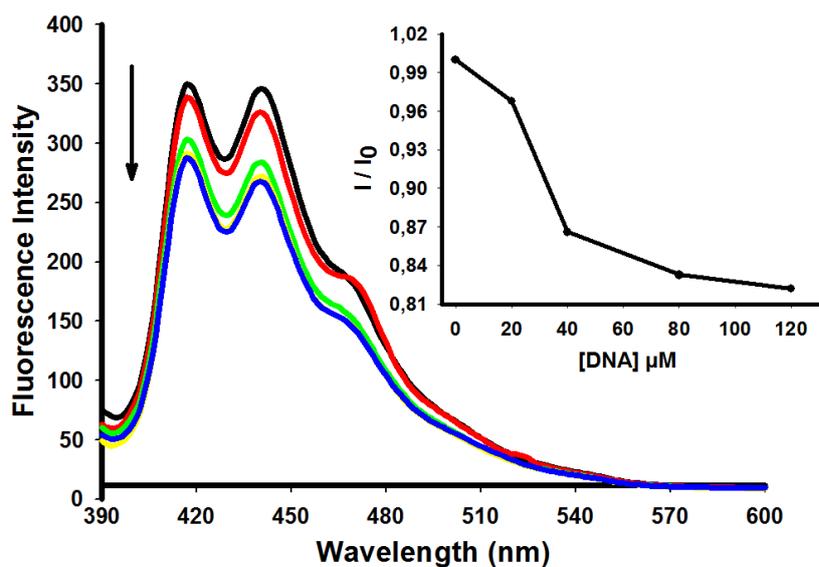


Fig. 4 – Fluorescence spectra of derivative **6** (10 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 20, 40, 80 e 120 μM. Insert: corresponding the fluorescence intensity of bound derivative to ctDNA (I) / fluorescence intensity of free derivative (I<sub>0</sub>).

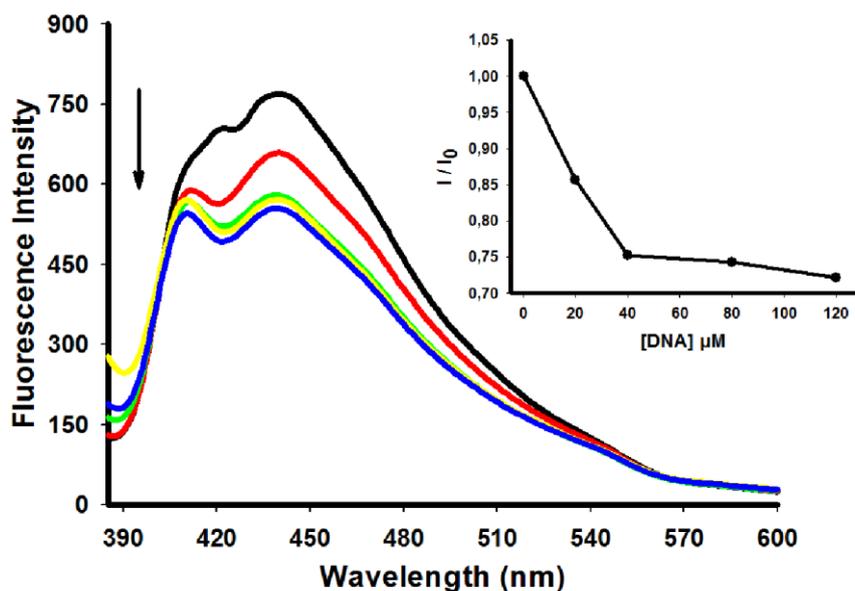


Fig. 5 – Fluorescence spectra of derivative **5** (10 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 20, 40, 80 e 120 μM. Insert: corresponding the fluorescence intensity of bound derivative to ctDNA (I) / fluorescence intensity of free derivative (I<sub>0</sub>).

#### 2.4 CD spectroscopic analysis

Circular dichroism (CD) was used to monitor conformational changes after binding of derivative to ctDNA. The interpretation of CD signals induced by ligand due to coupling with the DNA is monitored in the asymmetric environment of DNA. CD spectra may therefore be used to obtain information about the binding mode.<sup>10</sup>

CD spectrum of ctDNA shows a positive band (273 nm) due to stacking interactions of DNA bases and a negative band (245 nm) characteristic of ellipticity of DNA.<sup>30</sup> Figure 6 depicts changes in these bands in the presence of acridine derivatives, evidencing derivative-ctDNA complex formation. Changes of positive bands were observed for all derivatives, with a higher decrease of molar ellipticity for derivatives **5** and **6**. Larger changes were verified at 245 nm, where the most pronounced perturbations were observed in derivatives **4** and **7**. ctDNA binding with derivative **4** produced a decrease of intensity and a small blue shift, while binding with derivative **7** resulted in an increase of molar ellipticity. Mild perturbations in both bands were observed for derivative **5**.

Intercalating complexes which disrupt interactions between DNA bases and weakens bases stacking should cause a decrease in intensity of CD bands. Reductions in molar ellipticity at remarkably negative band are associated with destabilization and helix unwinding.<sup>31</sup> According to SHAHABADI and co-workers (2010)<sup>32</sup>, classical intercalation reactions tend to alter the intensity of the two bands due to strong interactions stacking of nucleotide bases and more stable conformations (right-handed B conformations of ctDNA), whereas simple groove binding and electrostatic interactions show a lower perturbation or no perturbation whatsoever on the bases stacking and ellipticity bands.

Study conducted with amsacrine (9-anilinoacridine) showed a decrease in intensity at 273 nm, indicating the effect of amsacrine aggregation with DNA and resulting the disturbance in the conformation of the DNA helix B. Such finding suggests a binding mode which is not a simple intercalative type but a binding where a groove binding is also present.<sup>12</sup>

Depending on their structure, compounds can preferentially bind by either groove binding or by intercalation. In the case of unfused-ring systems that do not possess coplanarity within the intercalator-DNA complex, inherent base pair twist may be complemented. It is worth noting that in the vast majority of the unfused compounds studied their intercalation is concomitantly accompanied with groove binding. Conversely, if groove binding is the major interaction mode, experimental evidence has demonstrated that these compounds may also partially interact with base pairs.<sup>6,29</sup> Therefore, intercalation and groove binding should be viewed as a continuum. The mode with the most favorable free energy for a particular ligand will depend on the DNA sequence and conformation as well as on the specific molecular features of the bound molecules.

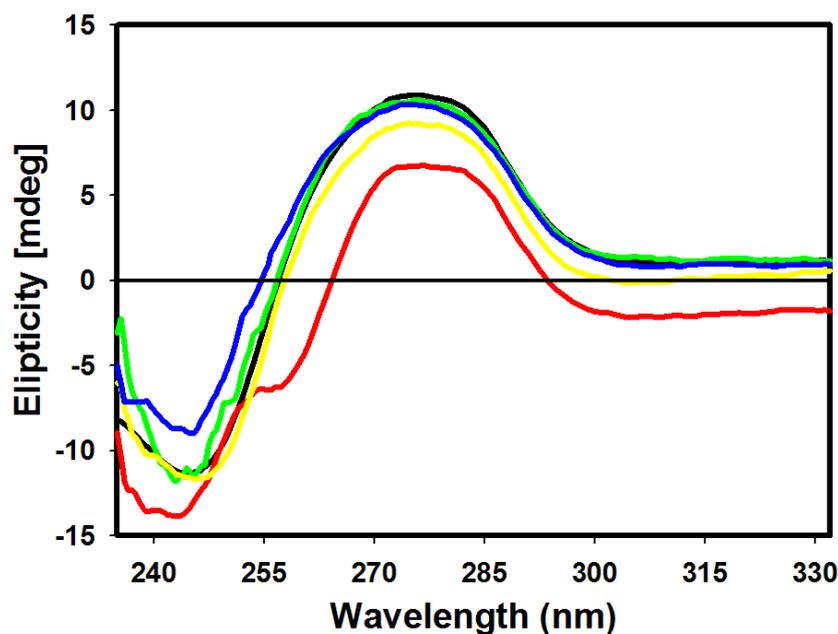


Fig. 6 – Circular dichroism spectra of ctDNA (100  $\mu$ M) in 10 mM Tris HCl buffer pH 7.6, in the presence of **4** (red), **5** (green), **6** (yellow) and **7** (blue) derivatives.

### 2.5 DNA topoisomerase 1 inhibition assay

Topoisomerases are key cellular enzymes that prevent DNA strands from becoming tangled. They cut DNA and cause it to wind and unwind. Topoisomerases adjust DNA's topological structure, transcription, replication and chromosome structure and are regarded as housekeeping genes. Cells die when topoisomerases are inhibited, making it targets for the chemotherapy of human cancers.<sup>33,34</sup> Ligand that occupies the topoisomerase binding site may suppress the association of the enzyme with DNA, thus influencing the topoisomerase activity. DNA intercalators that inhibit enzyme activity or form stabilized ternary complexes with DNA and topoisomerase have a high potential to act as DNA-targeting anticancer drugs.<sup>11</sup>

DNA relaxation assay induced by topoisomerase 1 was performed to evaluate whether the synthesized acridine derivative possess activity to inhibit topoisomerase 1 activity. Derivatives did not show topoisomerase 1 inhibitory activity at 50 and 100  $\mu$ M concentrations because super-coiled DNA was fully relaxed by the enzyme (Fig. 7). However, increasing the concentration of derivatives **4**, **6** and **7** to 200  $\mu$ M, the fraction of super-coiled plasmid form exceeded that of the relaxed one. These findings suggest that these derivatives have promising structures for the development of topoisomerase 1 inhibitors.

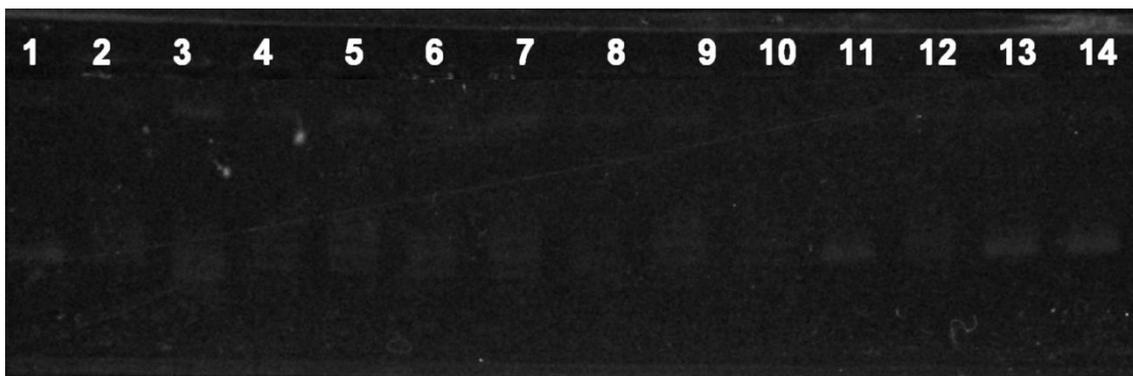


Fig. 7 – Effect of the thiazacridine and imidazacridine derivatives on the relaxation of pUC19 DNA plasmid by human topoisomerase 1. Lane 1, DNA pUC19. Lane 2, topo 1 + DNA pUC19. Lane 3 – 6, topo 1 + DNA pUC19 + compounds 4, 5, 6 and 7 50  $\mu\text{M}$ . Lane 7 -10, topo 1 + DNA pUC19 + compounds 4, 5, 6 and 7 100  $\mu\text{M}$ . Lane 11 – 14, topo 1 + DNA pUC19 + compounds 4, 5, 6 and 7 200  $\mu\text{M}$ .

### 3. Conclusion

The DNA binding properties of imidazacrine and thiazacridine derivatives were examined by absorption, fluorescence and CD spectra, besides human topoisomerase I inhibition activity. Experimental results indicate that the derivatives can bind to ctDNA both by intercalation or external binding. The products proved intrinsic binding constants with ctDNA ranging between  $1.46$  and  $6.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Fluorescence studies showed emission-quenching phenomenon confirming the interaction between derivatives and ctDNA. CD results presented local perturbations of B conformation of DNA due to derivative binding. The topoisomerase I inhibitory activity of these compounds was limited, but they may be potential lead compounds. The study here presented provides insight into DNA binding mechanism of imidazacrine and thiazacridine derivatives.

## 4. Experimental procedures

### 4.1 Materials and instrumentation

Melting points were measured in capillary tube on Quimis 340.27 Model (Quimis, Brasil). Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on silica gel plates from Merck 60 F254 with fluorescent detection at 254 nm. Infra-red (IR) Spectroscopy were recorded on a Bruker IFS66 spectrometer (Bruker, Germany), KBr pellets. The Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR) and Carbon ( $^{13}\text{C}$  NMR) were performed on Varian Model Plus Spectrophotometer (Varian, USA) 300 MHz and 400 MHz, in DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvent. Mass Spectra were recorded on liquid chromatography mass spectrometer LCMS-IT-TOF (Schimadzu, Kyoto, Japan). UV–vis Spectra were measured on an Ultraspec 3000 PRO UV-Visible Spectrophotometer and excitation and emission spectra in a JASCO FP-

6300 (Tokyo, Japan) Spectrofluorometer. Circular Dichroism (CD) measurements were performed in a JASCO-815 Spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

## 4.2 Preparation of the acridine-thiazolidines derivatives **4 – 6**

### 4.2.1 5-acridin-9-ylmethylidene-3-amino-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**4**)

A mixture of 3-acridin-9-yl-2-ciano-acrilate ethyl ester (0.5 g, 0.001656 moles), 3-amino-2-thioxo-4-thiazolidinone (0.2453 g), ethanol (25 mL) and morpholine (25 drops) was stirred for 30 minutes at 50° C. The product was a yellow solid. Formula: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>; M.W.: 337.4187 g/mols; Yield: 80.55%; Melting point: 214 – 216° C; Rf: 0.44 (*n*-hexane/AcOEt 6:4); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.72 (s, 1H, CH), 6.00 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), Aromatic hydrogens: 8.25 – 8.22 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 8.14 – 8.11 (d, 2H, J = 8.1 Hz); 7.95 – 7.89 (m, 2H); 7.71 – 7.66 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 188.6, 162.5, 148.4, 138.2, 131.6, 131.3, 130.2, 129.0, 127.5, 126.1, 122.8. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3308.5, 1733.2, 1608.9 – 1409.8, 1247.0, 760.3. MS (m/z): 338.04.

### 4.2.2 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one (**5**)

3-acridin-9-yl-2-ciano-acrilate ethyl ester (0.5 g, 0.001656 moles), 2-thioxo-4-thiazolidinone (0.22053 g), ethanol (25 mL) and morpholine (25 drops) were used for synthesis. The reaction mixture was stirred for 30 minutes at 50° C. The product was a light green solid. Formula: C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>; M.W.: 322.4041 g/moles; Yield: 36%; Melting point: 244 – 246° C; Rf: 0.66 (*n*-hexane/AcOEt 1:1); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.35 (s, 1H, NH), 8.48 (s, 1H, CH), Aromatic hydrogens 8.24 – 8.22 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 8.15 – 8.12 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.72 – 7.66 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 167.28, 167.26, 148.41, 138.92, 137.13, 131.31, 130.21, 127.53, 126.18, 122.76. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2968.76, 1711.0, 1614.7 – 1475.9, 1211.4, 758.59. MS (m/z): 323.03.

### 4.2.3 5-acridin-9-ylmethylidene-2-thioxoimidazolidin-4-one (**6**)

3-acridin-9-yl-2-ciano-acrilate ethyl ester (0.260 g, 0.00086 moles), 2-thioxo-imidazolidinone (0.1 g), ethanol (6 mL) and piperidine (8 drops) were used. The reaction mixture was kept at temperature of 45 – 55° C under stirring. The product was orange solid. Formula: C<sub>17</sub>N<sub>11</sub>N<sub>3</sub>OS; M.W.: 305.3537 g/moles. Yield: 75 %. Melting point: 250° C (carbonized). Rf: 0.66 (*n*-hexane/AcOEt 6:4). <sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H, NH), 11.65 (s, 1H, NH), Aromatic hydrogens: 8.22 – 8.19 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.10 – 8.07 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.90 – 7.85 (m, 2H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.26 (s, 1H, CH). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):

3188.8 - 3056.1, 2784.4 - 2659.8, 1658.5, 1436.7 – 1342.0, 1193.4, 759.7 – 656.0. MS (m/z): 306.0674.

#### 4.3 UV-vis absorption measurements

UV-vis spectra titrations were developed using 0.01 M Tris buffer, pH 7.6. Calf thymus DNA (ctDNA) was purchased from Sigma and was used without further purification. The solution of ctDNA in Tris buffer was sonicated for 5 min and the DNA concentration was determined using the molar extinction coefficients  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 260 nm.<sup>35</sup> The purity of DNA was determined by monitoring the ratio value of A260/A280. DNA concentration was expressed as micromolar equivalents of the base pairs. Thiazacridine and imidazacridine derivatives were dissolved in methanol or DMSO in a concentration of 1 mM (stock solution) from which working solutions were prepared by dilution using Tris buffer to concentration ranging from 10 to 50  $\mu\text{M}$ . Under compounds optimized concentrations ctDNA titration was performed with constant acridines derivatives concentrations. All measurements were performed at 25 °C in a rectangular quartz cuvette with a 1 cm path length. The intrinsic binding constant ( $K_b$ ) was obtained by fitting the data to equation 1 (McGhee and Von Hippel, 1974):

$$[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1 / K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f) \quad (1)$$

$\varepsilon_a$ ,  $\varepsilon_b$  and  $\varepsilon_f$  are the apparent, bound, and free extinction coefficients, respectively. Plot fitting of  $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$  vs.  $[\text{DNA}]$  used  $K_b$  obtained from the ratio of the slope to the Y intercept. The binding data were fitted using a SigmaPlot 10.0 software.

#### 4.4 Fluorescence measurements

Fluorescence measurements of non-bound derivatives were performed with solution concentration ranging from 10 to 25  $\mu\text{M}$  in 0.01 M Tris buffer, pH 7.6. Emission spectra were recorded in the region 380–700 nm using excitation wavelength 356-364 nm. All measurements were performed at 24 °C in a rectangular quartz cuvette with a 1 cm path length. Fluorescence intensities were expressed in arbitrary units. Fluorescence titrations were conducted by the addition of increasing amounts of ctDNA (0-120  $\mu\text{M}$  bp) directly into the cell containing solutions of derivatives.

#### 4.5 Circular Dichroism

Circular Dichroism (CD) measurements were performed (5 times scans at a speed of 200 nm min<sup>-1</sup> and collection in 0.1-nm steps) in a 1 cm path-length quartz cuvette at 20 °C. Spectra (from 230 to 300 nm) were determined for derivatives (25 μM) prepared in 10 mM Tris buffer, pH 7.6 in the absence or presence of 100 μM of ctDNA, 10 min after mixing. Buffer was used as blank.

#### 4.6 DNA topoisomerase I inhibition assay

Topoisomerase I inhibition activity was determined using 100 ng of pUC19 DNA plasmid (from Sigma) and 1.0 unit of recombinant human DNA topoisomerase I in relaxation buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.05 M KCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.01% bovine serum albumin) after incubation with or without derivatives for 45 min at 37 °C. Tiazacridine and imidazacridine derivatives tested concentrations were 50, 100 and 200 μM. Agarose gel (0.8%) electrophoresis was performed in SB buffer (NaOH + boric acid) at 7 V/cm for 4 h. Bands were stained with ethidium bromide (1 mg/ml) and photographed under UV light.

#### 4.7 Determination of log P values

Derivates log P values were obtained using the program ChemSketch 12.0 Advanced Chemistry Development.<sup>36</sup>

### Acknowledgments

Authors are thankful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Brasil), FACEPE (Fundo de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil) for financial support.

### References

1. B.A.D. Neto, A.A.M. Lapis. Recent developments in the chemistry of desoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules*. 14 (2009) 1725-1746.
2. A. Mukherjee, R. Lavery, B. Bagchi, J.T. Hynes. On the molecular mechanism of drug intercalation into DNA: a simulation study of the intercalation pathway, free energy, and DNA structural changes. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 9747-9755.

3. H.L. Hurley. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 188-200.
4. H. Ihmels, D. Otto. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. *Top. Curr. Chem.* 258 (2005) 161-204.
5. F.W.A. Barros, T.G. Silva, M.G.R. Pitta, D.P. Bezerra, L.V. Costa-Lotuf. M.O. Moraes, C. Pessoa, M.A.F.B. Moura, F.C. Abreu, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, M.O.F. Goulart. *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 3533-3539.
6. R. Ghosh, S. Bhowik, A. Bagchi, D. Das, S. Ghosh. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. *Eur. Biophys. J.* 39 (2010) 1243-1249.
7. C. Gao, F. Liu, X. Luan, C. Tan, H. Liu, Y. Xie, Y. Jin, Y. Jiang. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 7507-7514.
8. L. Janovec, M. Kozurkova, D. Sabolova, J. Ungvarsky, H. Paulikova, J. Plsikova, Z. Vantosa, J. Imrich. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidionone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1790-1801.
9. Q. Liu, J. Zhang, M. Wang, D. Zhang, Q. Lu, Y. Huang, H. Lin, X. Yu. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5302-5308.
10. J. Plsikova, L. Janovec, J. Koval, J. Ungvarsky, J. Mikes, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, J. Imrich, P. Kristian, J. Kasparkova, V. Bradec, M. Kozurkova. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* 57 (2012) 283-295.
11. Y. Pommier. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* 109 (2009) 2894-2902.
12. D.K. Jangir, S.K. Dey, S. Kundu, R. Mehrotra. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. *J. Photochem. Photobiol., B.* 114 (2012) 38-43.
13. I. Sanchez, R. Reches, D.H. Caignard, P. Renard, M.D. Pujol. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 340-352.
14. M.G.R. Pitta, E.S. Souza, F.W.A. Barros, M.O. Moraes, C.O. Pessoa, M.Z. Hernandez, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 3326-3334
15. M.C. Pigatto, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, R. Vessecchi, M. D. Assis, J. S. Santos, T.D. Costa, N. P. Lopes. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4245-4251.

16. M.C. Pigatto, F.T. Uchoa, B. Torres, S. Haas, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, N.P. Lopes, T.D. Costa. Pre-clinical pharmacokinetics of the acridine antitumour candidate AC04 and its 1-oxo-metabolite plasma profile. *Xenobiotica*. 42 (2012) 1-7.
17. O. Tsuge, M. Nishinohara, M.B. Tashiro. *Bull. Chem. Soc, Jpn.* 36 (1963) 1477- 1485.
18. M.D. Mosher, N.R. Natale. The preparation of intercalating isoxazoles via a nitrile oxide cycloaddition. *J. Heterocycl. Chem.* 32 (1995) 779-781.
19. D. Sabolova, M. Kozurkova, P. Kristian, I. Danihel, D. Podhradsk, J. Imrich. Determination of the binding affinities of plasmid DNA using fluorescent intercalators possessing na acridine skeleton. *Int. J. Biol. Macromol.* 38 (2006) 94-98.
20. M. H. David-Cordonnier, M. P. Hildebrand, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Keuser, K. Benzchawel, T. Lemster, U. Pindur. Design, synthesis and biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA-intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 752-771.
21. E. Kuruvilla, P. Nandajan, G.B. Schuster, D. Ramaiah. Acridine-viologen dyads:selective recognition of single-strand DNA through fluorescence enhancement. *Org. Lett.* 10 (2008) 4295-4298.
22. N. Shahabadi, L. Heidari. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. *Spectrochim. Acta A, Part A.* 97 (2012) 406-410.
23. N. Busto, B. Garcia, J.M> Leal, J.F. Gaspar, C. Martins, A. Boggioni, F. Secco. ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine) forms three complexes in the presence of DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 19534-19545.
24. C.Y. Zhou, X.L. Xi, P. Yang. Studies on DNA binding to metal complexes of sal2trien. *Biochemistry.* 72 (2007) 37-43.
25. S. Kashanian, E.N. Dolatabadi. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* 116 (2009) 743-747.
26. J.D. McGhee, P.H. Von Hippel. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of larg ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469-489.
27. L. Strekowski, B. Wilson. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat. Res.* 623 (2007) 3-13.
28. I. Mahmood, A. Paul, S. Ladame. Synthesis and spectroscopic and DNA-binding properties of fluorogenic acridine-containing cyanine dyes. *J. Org. Chem.* 75 (2010) 204-207.

29. R.D. Synder, J. McNulty, D.E. Zairov, D.E. Ewing, L.B. Hendry. The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. *Mutat. Res.* 578 (2005) 88-99.
30. J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuk, M. Vorlickova. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1713-1725.
31. N. Shahabadi, N.H. Moghadam. Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta A, Part A.* 99 (2012) 18-22.
32. N. Shahabadi, S. Kashanian, F. Darabi. DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: the effect of metal on the mode of binding. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4239-4295.
33. S. Bhowmik, A. Bagchi, R. Ghosh. Molecular modeling studies of some 9-arylacridines to elucidate their possible roles in topoisomerase I inhibition. *Int. J. Integr. Biol.* 2 (2008) 8-14.
34. M.N. Drwal, K. Agama, L.P.G. Wakelin, Y. Pommier, R. Griffith. Exploring DNA topoisomerase I ligand space in search of novel anticancer agents. *Plos One.* 6 (2011) e25150.
35. A. Wolfe, G.H. Shimer Jr., T. Meehan. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry.* 26 (1987) 6392-6396.
36. ACDLabs/ChemSketch. Disponível em: <http://www.acdlabs.com>.

## Supporting Information

### Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacrine derivatives

Elizabeth Almeida Lafayette<sup>a</sup>, Sinara Mônica Vitalino de Almeida<sup>b</sup>, Marina Galdino da Rocha Pitta<sup>a</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>b</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>c</sup> Suely Lins Gladino<sup>a</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima<sup>a\*</sup>, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior<sup>b</sup>, Ivan da Rocha Pitta<sup>a</sup>.

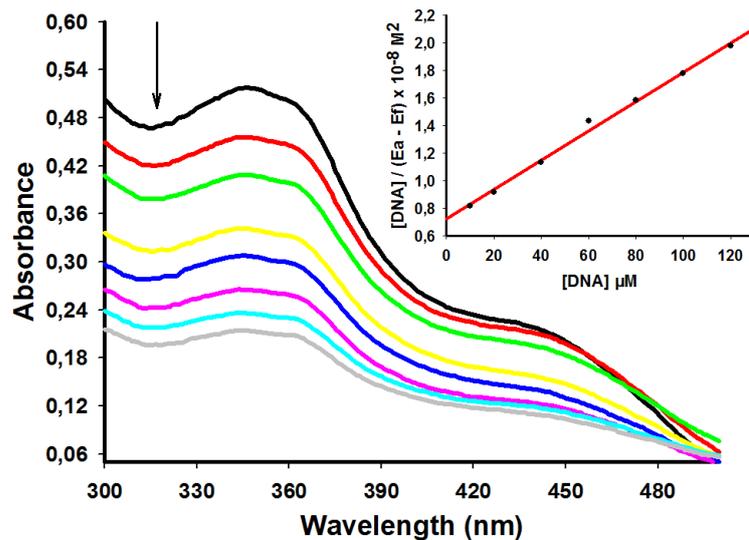
<sup>a</sup>Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

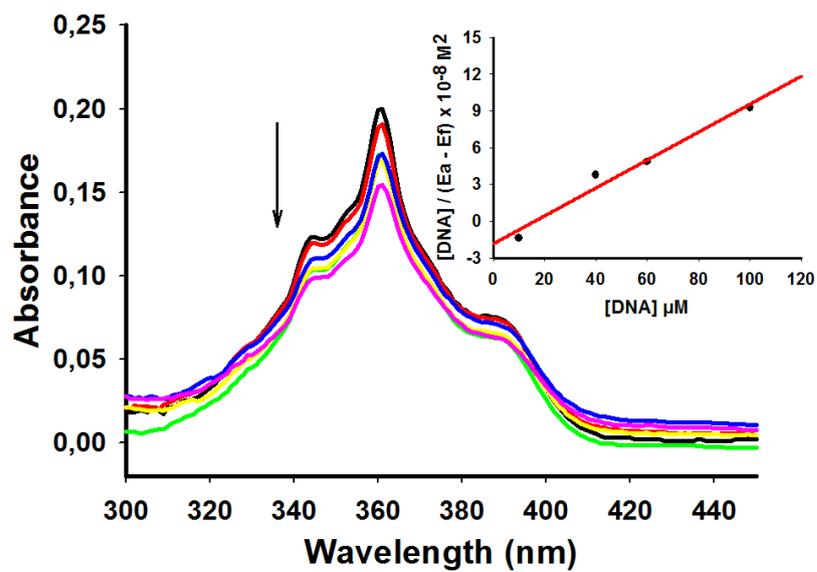
<sup>c</sup>Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brazil.

Fax: +55 81 2126-8347 E-mail: [nenalima.mariadocarmo@gmail.com](mailto:nenalima.mariadocarmo@gmail.com)

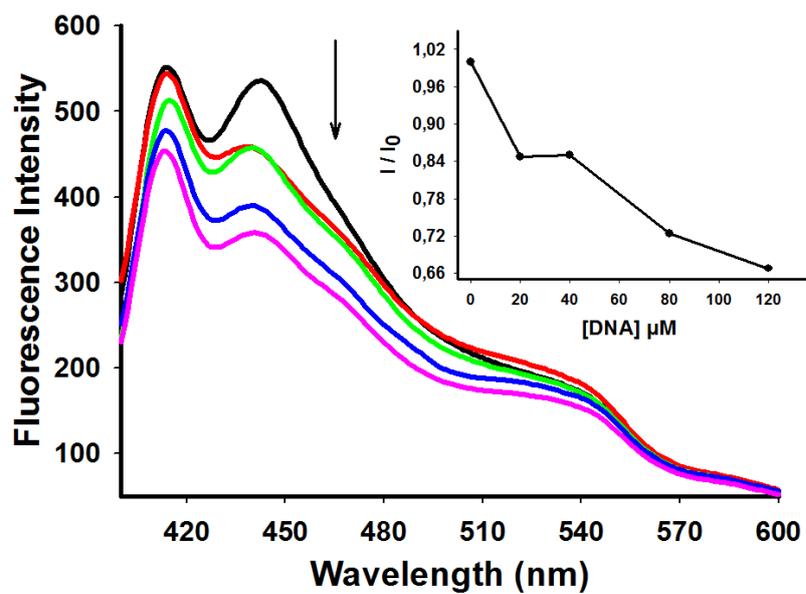
Table of Contents	Pages
<b>Figure S1</b> Absorption titration of derivative <b>4</b> .....	<u>2</u>
<b>Figure S2</b> Absorption titration of derivative <b>7</b> .....	3
<b>Figure S3</b> Fluorescence changes of derivative <b>4</b> .....	4
<b>Figure S4</b> Fluorescence changes of derivative <b>7</b> .....	5
<b>Figure S5</b> Optical properties of derivative <b>4</b> .....	6
<b>Figure S6</b> Optical properties of derivative <b>5</b> .....	7
<b>Figure S7</b> Optical properties of derivative <b>6</b> .....	8
<b>Figure S8</b> Optical properties of derivative <b>7</b> .....	9



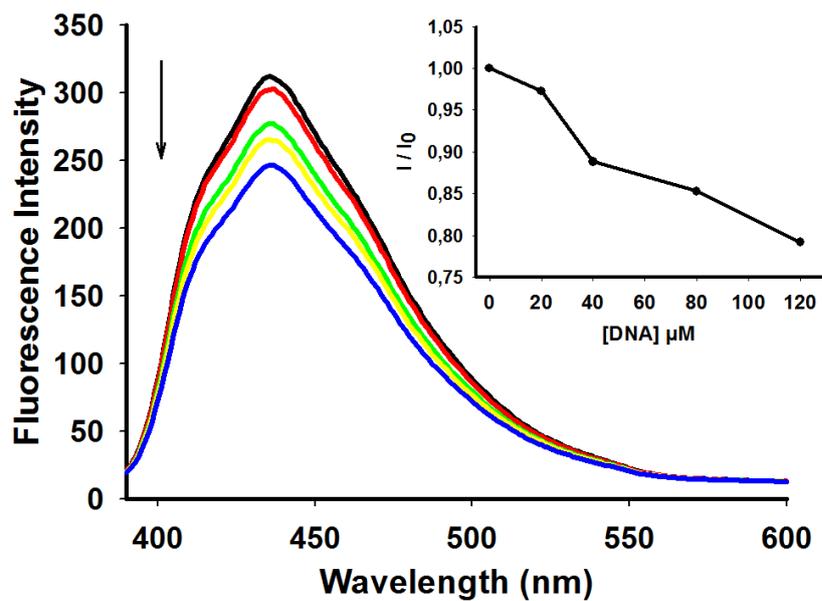
**Figure S1.** Absorption titration of derivative **4** (50  $\mu\text{M}$ ) with increasing concentrations of ctDNA.  $[\text{DNA}] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100$  e  $120 \text{ } \mu\text{M}$ . Arrows ( $\downarrow$ ) refer to hypochromic effects. Inset: corresponding to the plot of  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  as function of DNA concentration as determined from the absorption spectral data.



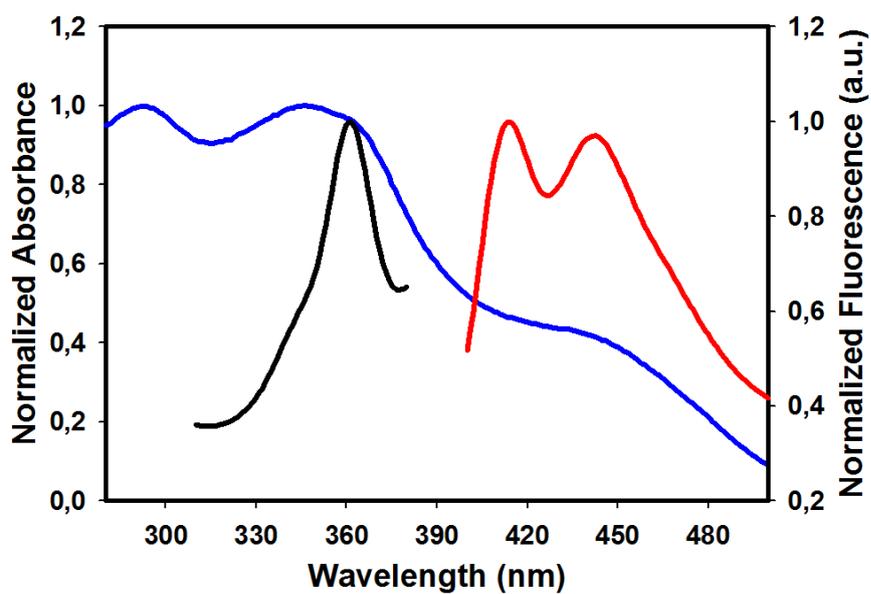
**Figure S2.** Absorption titration of derivative **7** (25  $\mu\text{M}$ ) with increasing concentrations of ctDNA.  $[\text{DNA}] = 0, 20, 40, 60, 100$  e  $120 \mu\text{M}$ . Arrows ( $\downarrow$ ) refer to hypochromic effects. Inset: corresponding to the plot of  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  as function of DNA concentration as determined from the absorption spectral data.



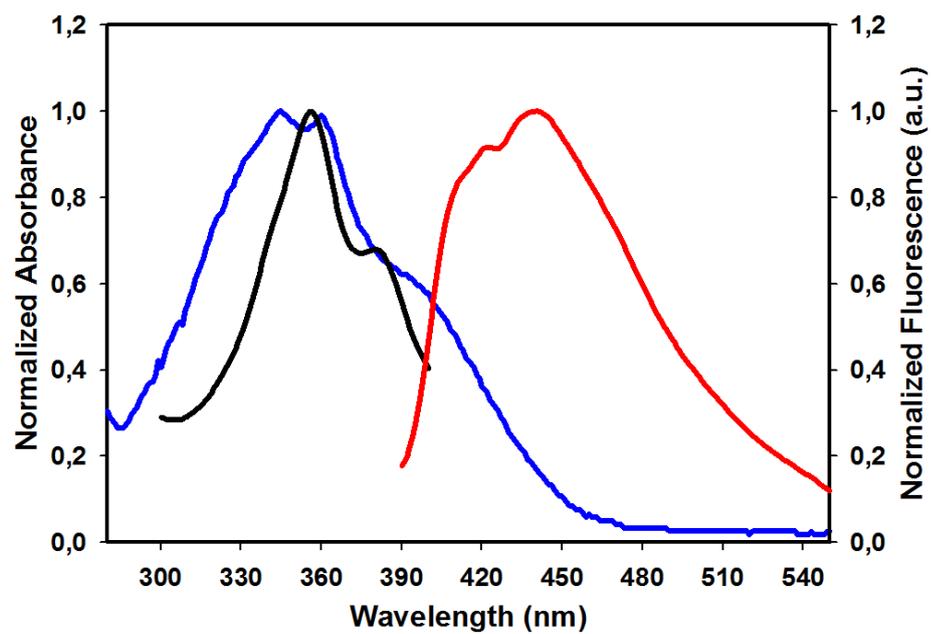
**Figure S3.** Fluorescence changes of derivative **4** (10 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 20, 40, 80 e 120 μM. Insert: corresponding the fluorescence intensity of bound derivative to ctDNA (I) / fluorescence intensity of free derivative (I<sub>0</sub>).



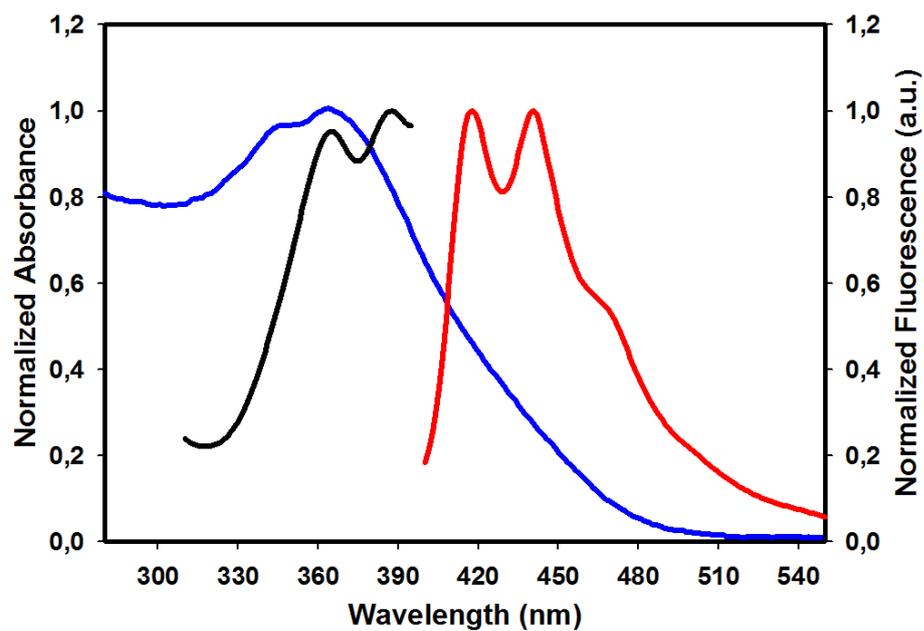
**Figure S4** – Fluorescence changes of derivative 7 (10 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0, 20, 40 e 120 μM. Insert: corresponding the fluorescence intensity of bound derivative to ctDNA (I) / fluorescence intensity of free derivative (I<sub>0</sub>).



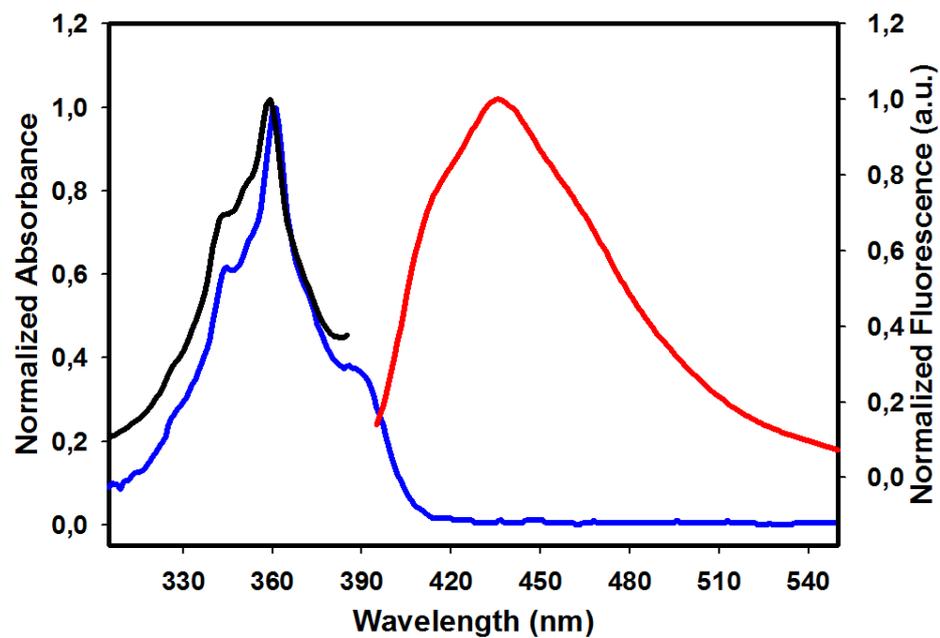
**Figure S5.** Absorption (blue), excitation (black), emission (red) spectra of derivative **4**, at concentrations 50, 10 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, in Tris-HCl buffer. Excitation at 360 nm and emission at 415 nm.



**Figure S6.** Absorption (blue), excitation (black), emission (red) spectra of derivative **5**, at concentrations 50, 10 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, in Tris-HCl buffer. Excitation at 356 nm and emission at 440 nm.



**Figure S7.** Absorption (blue), excitation (black), emission (red) spectra of derivative **5**, at concentrations 25, 10 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, in Tris-HCl buffer. Excitation at 364 nm and emission at 418 nm.



**Figure S8.** Absorption (blue), excitation (black), emission (red) spectra of derivative **5**, at concentrations 25, 10 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, in Tris-HCl buffer. Excitation at 360 nm and emission at 435 nm.

---

## ***CONCLUSÕES***

O estudo das propriedades de ligação de compostos químicos ao DNA é essencial no avanço do conhecimento sobre o mecanismo de ação das moléculas candidatas a novos fármacos. A rota de síntese utilizada para obtenção de novos derivados tiazacridínicos e imidazacridínicos foi efetiva, e a análise da interação com o DNA dos derivados realizada através de técnicas de espectroscopia de absorção, fluorescência e dicroísmo circular, foi eficiente. Observações nos espectros, como alterações nos picos máximos de absorção e extinção da fluorescência confirmaram a interação dos derivados ao DNA. Mudanças significativas no espectro de CD evidenciaram uma perturbação na conformação do DNA, ocasionada pela interação dos compostos. Os resultados indicam que os derivados acridínicos podem se ligar ao DNA tanto por ligações no sulco quanto por intercalação a dupla hélice. O ensaio da topoisomerase mostrou uma atividade limitada dos derivados em inibir a ação da enzima topoisomerase I humana, porém são promissores no desenvolvimento de novos agentes análogos de acridina com potenciais sítios de ligação ao DNA.



## ***PERSPECTIVAS***

1. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos derivados tiazacridínicos e imidazacridínico em linhagens de células tumorais humanas;
2. Realizar estudo de modelagem molecular dos derivados, que permita conhecimento sobre a interação com os pares de bases do DNA;
3. Analisar a viscosidade do DNA na presença dos derivados tiazacridínicos e imida zacridínico;
4. Avaliar a capacidade de inibir a atividade da enzima topoisomerase II;
5. Sintetizar derivados *bis*-acridínicos e realizar estudo da interação ao DNA, para comparação com mono-acridinas.