

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



ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE

**SÍNTESE DE DERIVADOS INDÓLICOS/ACRIDÍNICOS E AVALIAÇÃO DA
INTERAÇÃO COM DNA ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA
UTILIZANDO BROMETO DE ETÍDIO COMO SONDA FLUORESCENTE**

Recife – 2016

ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE

**SÍNTESE DE DERIVADOS INDÓLICOS/ACRIDÍNICOS E AVALIAÇÃO DA
INTERAÇÃO COM DNA ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA
UTILIZANDO BROMETO DE ETÍDIO COMO SONDA FLUORESCENTE**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de Doutora em
Ciências Farmacêuticas na área de Síntese e
Planejamento de Fármacos.**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientador:

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife – 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L161s Lafayette, Elizabeth Almeida.
Síntese de derivados indólicos/acridínicos e avaliação da interação com DNA através de técnicas de espectroscopia utilizando brometo de etídio como sonda fluorescente / Elizabeth Almeida Lafayette. – 2016.
167 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. Indol. 2. Acridina. 3. DNA. 4. Antitumoral. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-168)

ELIZABETH ALMEIDA LAFAYETTE

**SÍNTESE DE DERIVADOS INDÓLICOS/ACRIDÍNICOS E AVALIAÇÃO DA
INTERAÇÃO COM DNA ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA
UTILIZANDO BROMETO DE ETÍDIO COMO SONDA FLUORESCENTE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, na área de Síntese e Planejamento de Fármacos.

Aprovada em: 27/05/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)
Departamento de Antibióticos - UFPE

Prof.. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Interno)
Departamento de Ciências Biológicas - UEPB

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Departamento de Antibióticos - UFPE

Profa. Luiza Rayanna Amorim de Lima (Examinador Externo)
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Examinador Externo)
Departamento de Medicina - UPE

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^a. Dr^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife - 2016

A Deus por iluminar sempre o meu caminho.

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

A Daniel César da Silva, por todo amor transmitido através de seu companheirismo e dedicação; por seus ensinamentos e exemplo de vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo pela co-orientação no progresso das pesquisas realizadas.

Ao meu pai, José Gileno, pelo amor, confiança e incentivo durante esta etapa da minha vida, e aos meus irmãos Gustavo e Gisana, pela paciência e compreensão de minha ausência em alguns momentos.

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

Aos meus amigos da pós-graduação: Anekécia, Antônio Sergio, Cézar, Jamerson, Miguel, Nayara, Sybelle, Tiago e Willians, por todo apoio no decorrer da elaboração deste trabalho e pela convivência diária.

À Sinara Almeida, pela amizade, por todos os momentos de estudo e de pesquisa no LIKA, obrigada pelo incentivo e pelos momentos de descontração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas do grupo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica - Lqit, entre eles: Amélia, Íris, Pedro, Keriolaine, Alana, Daura que acompanharam minha jornada de pesquisa.

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

A todos aqueles que estando bem próximo ou mesmo distante, desempenharam seu papel na torcida por mais uma conquista minha.

RESUMO

O DNA é um significativo receptor celular, onde muitos compostos químicos exercem seus efeitos antitumorais. A ligação de drogas ao DNA pode afetar a sua transcrição e a expressão da informação genética nas células, influenciando assim, na inibição do crescimento de células antitumorais, que é a base da concepção de fármacos mais eficazes. Moléculas com núcleos indóis e acridínicos são biologicamente ativas e possuem atividades como antitumoral, antituberculose, anti-inflamatória e antiasmática; associado não apenas a interação com o DNA, mas também com proteínas, especialmente algumas enzimas-chaves na proliferação celular, as topoisomerases. Com base nestas informações, este trabalho teve como objetivo a síntese de onze novos derivados indólicos com anéis 3-amino-2-tioxtiazolidin-4-ona, 2-tioxtiazolidin-4-ona, tiazolidin-4-ona e 2-tioxtimidazolidin-4-ona condensados como cadeias laterais e a síntese de oito novos derivados acridínicos com diferentes tiosemicarbazidas condensadas. Além disso, objetivou-se verificar a atividade antitumoral, investigar a capacidade de interação o DNA e atividade antitopoisomerase dos novos derivados obtidos. Os derivados foram sintetizados com êxito, com ponto de fusão em faixa de pureza e com estruturas elucidadas e comprovadas por espectrometria de massas (MS), infravermelho (IV), técnicas espectroscópicas unidimensionais de RMN¹H e RMN¹³C, e algumas técnicas espectroscópicas bidimensionais, como COSY¹H-¹H e HSQC¹H-¹³C. A avaliação antitumoral foi realizada com diferentes linhagens de células cancerígenas, por meio do ensaio antiproliferativo MTT e Sulforrodamina B. A análise da ligação ao DNA foi conduzido através da espectroscopia de absorção e da fluorescência utilizando o brometo de etídio (BE) como sonda fluorescente. Os derivados testados exibiram mudanças em suas propriedades espectroscópicas após a interação com ctDNA (DNA de timo bovino), com efeitos hipocrômico e hiperocrômico, além de alterações na forma com desvio para a região do vermelho e do azul. Na série das acridinas testadas, o composto mais ativo no teste antiproliferativo foi o derivado não substituído (LT.26) na porção tiosemicarbazona, e o derivado com o substituinte cloro (LT.27) mostrou-se o mais eficiente na ligação com o DNA. Dentre os derivados indólicos, o composto com o grupamento amino livre e não substituído no anel indólico (SE.01) se destacou com eficácia nas linhagens de leucemias testadas e com o alto valor da constante de ligação ao DNA, Kb de 5.69×10^4 , aliado a maior supressão da fluorescência, Ksv = 1.81×10^4 , assegurando a participação do grupamento amino na interação com o DNA. O derivado indólico SE.05 apresentou destaque importante como compostos promissor, com atividade antitumoral para uma linhagem de mama testada, por apresentar potência superior ao controle positivo, a doxorrubicina. O derivado bis-indólico (TE.04) sintetizado, apresentou também eficácia nas linhagens de câncer testadas, entretanto com menor capacidade de ligação ao DNA. O derivado indólico SE.01 e TE.04 destaque foram conduzidos a uma avaliação da inibição da enzima topoisomerase I humana, porém mostraram-se ineficientes na inibição até a concentração de 50 µM analisada. Tais resultados mostram que o núcleo indol e acridínico, associados a heterocíclicos tiazolidínicos, imidazolidínicos e tiosemicarbazonas, são promissores como agentes antitumorais, com potencial capacidade de interação com o DNA.

Palavras-chave: Indol. Acridina. DNA. Antitumoral.

ABSTRACT

DNA is a major cellular receptor, where many chemical compounds exercise their antitumor effects. The DNA binding drugs may affect its transcription and expression of genetic information in cells, thereby influencing, in inhibiting the growth of antitumor cells, which is the basis for design of more effective drugs. Molecules with indoles and acridines ring are biologically active and have activities such as anticancer, anti-tuberculosis, anti-inflammatory and anti-asthmatic; associated not only the interaction with DNA, but also to proteins, especially some key enzymes in cell proliferation, topoisomerases. Bases on this information, this study had as objective to the synthesis of eleven new indole derivatives with heterocyclic rings 3-amino-2-thioxo-thiazolidin-4-one, 2-thioxo-thiazolidin-4-one, thiazolidin-4-one and 2-thioxo-imidazolidin-4-one condensed as side chains; and synthesis of eight new derivatives acridine with different condensed thiosemicarbazides. Moreover, the objective was to determine the antitumor activity, investigate their ability to interact DNA and anti-topoisomerase activity. The derivative were synthesized successfully, with a melting range in purity and elucidated structures and proven by mass spectrometry (MS), infrared (IR), spectroscopic one-dimensional ^1H NMR, ^{13}C NMR, and some dimensional spectroscopic techniques such as COSY ^1H -1H and HSQC ^1H - ^{13}C . The antitumor evaluation was performed with different cancer cell lines, using the antiproliferative assay MTT and sulforodamina B. Analysis of DNA binding was executed by absorption spectroscopy and fluorescence using ethidium bromide (EB) as a fluorescent probe. The derivatives tested exhibited changes in their spectroscopic properties, after interacting with ctDNA (DNA calf thymus), with hypochromic and hyperchromic effects and changes in form with deviation to the region of the red and blue. In the series of acridines tested, the most active compound in the antiproliferative test was the unsubstituted derivative (LT.26) in thiosemicarbazone moiety, and acridine derivative with the chloro substituent (LT.27) proved to be the most efficient in binding to DNA. Among the indole derivatives, the compound with the free amino group and unsubstituted in the indole ring (SE.01) was highlighted effectively tested on leukemia lines and the high value of the DNA binding constant, K_b of 5.69×10^4 ally to greater suppression of fluorescence, K_{sv} of 1.41×10^4 , ensuring the participation of the amino group in the interaction with DNA. The indole derivative SE.05 presented significant attention as promising compounds with antitumor activity for a breast line tested by presenting power greater than the positive control, doxorubicin. The bis-indole derivative synthesized (TE.04) also exhibit efficacy in cancer cell lines tested, however with lower DNA binding capacity. The indole derivatives SE.01 and TE.04 highlighted were conducted an evaluation of the inhibition of the enzyme topoisomerase I human, but proved to be inefficient in inhibition to the concentration of 50 μM analyzed. These results show that the indole and acridine nucleus, associated with thiazolidine and imidazolidine heterocyclic and thiosemicarbazones, are promising as antitumor agents with the potential ability to interact with DNA.

Keywords: Indole. Acridine. DNA. Antitumoral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do derivado tiazacridina obtido via hibridação molecular	26
Figura 2. Derivado químico obtido por Addla et al (2012) via hibridação molecular	26
Figura 3. Estrutura química do indol e alcaloides indólicos	28
Figura 4. Alcaloides indólicos com atividade antitumoral	29
Figura 5. Diversidade de atividades biológicas do núcleo indol	34
Figura 6. Derivados indólicos e atividade farmacológica correspondente	36
Figura 7. Estrutura química do anel acridínico	37
Figura 8. Estrutura química da amsacrina e asulacrina	40
Figura 9. Derivados tiazacridinas e imidazacridinas que apresentam propriedades intercaladoras do DNA e inibidoras da enzima topo I	41
Figura 10. Estruturas químicas de novos derivados acridina-tiazolidinas com poder intercalador ao DNA e atividade antiproliferativa	41
Figura 11. Modos de interação das moléculas com o DNA	43
Figura 12. Derivados imidazolidínicos e valores da constante de ligação	44
Figura 13. Espectro de absorção de 5-metil-5 <i>H</i> -indol[3,2- <i>c</i>]-quinolina	45
Figura 14. Espectro de fluorescência do complexo DNA na presença de quantidades crescentes (a-h) de 1,8-dihidroxi-antraquinona	46
Figura 15. Estrutura do DNA com especificações dos sulcos maior e menor	47
Figura 16. Estrutura química de moléculas ligantes no sulco do DNA	47
Figura 17. Estrutura química de compostos intercaladores ao DNA	49
Figura 18. Complexo ternário correspondente ao topotecano-DNA-topoisomerase	51
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H do derivado SE.04	73
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C do derivado SE.04	74
Figura 21. Espectro de DEPT do derivado SE.04	74
Figura 22. Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do derivado SE.04	75
Figura 23. Espectro de HSQC ¹³ C- ¹ H do derivado SE.04	75
Figura 24. Espectro de infravermelho do derivado SE.04	76
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H do derivado SE.05	77
Figura 26. Espectro de RMN ¹³ C do derivado SE.05	78
Figura 27. Espectro de DEPT do derivado SE.05	78
Figura 28. Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do derivado SE.05	79

Figura 29. Espectro de HSQC ^1H - ^{13}C do derivado SE.05	79
Figura 30. Espectro de infravermelho do derivado SE.05	80
Figura 31. Espectro de absorção do derivado SE.01, SE.02, SE.03 e SE.04 (80 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	92
Figura 32. Espectro de absorção do derivado SE.05, SE.06 e SE.07 (80 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	93
Figura 33. Espectro de absorção dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 (50 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	94
Figura 34. Espectro de absorção dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05 (50 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	95
Figura 35. Espectros de emissão do BE ligado ao ctDNA na ausência e na presença dos derivados Lqit/SE.01, SE.02, SE.03 e SE.04	98
Figura 36. Espectros de emissão do BE ligado ao ctDNA na ausência e na presença dos derivados Lqit/SE.05, SE.06 e SE.07	99
Figura 37. Intensidade de fluorescência relativa de derivados indólicos Lqit/SEs	101
Figura 38. Espectro de emissão de fluorescência dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 (15 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	102
Figura 39. Espectro de emissão de fluorescência dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05 (15 μM) em quantidades crescentes de ctDNA	103
Figura 40. Ensaio da Inibição da Topoisomerase I dos derivados indólicos Lqit/SE.01 e Lqit/TE.04	104
Figura 41. Espectros de absorção UV-Vis dos derivados acridínicos LT.26, LT.42, LT.46, LT. 47 (50 μM) com concentrações crescentes de ctDNA	121
Figura 42. Espectros de absorção UV-Vis dos derivados acridínicos LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (50 μM) com concentrações crescentes de ctDNA	122
Figura 43. Espectros de fluorescência dos derivados acridínicos LT.26, LT.42, LT.46, LT. 47 (15 μM) com concentrações crescentes de ctDNA	124
Figura 44. Espectros de fluorescência dos derivados acridínicos LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (15 μM) com concentrações crescentes de ctDNA	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas dos derivados indólicos	85
Tabela 2. Dados da espectroscopia de absorção UV-vis e de emissão de fluorescência dos derivados indólicos na ausência e na presença de ctDNA	86
Tabela 3. Atividade antiproliferativa in vitro em IC ₅₀ (μM) dos derivados indólicos Lqit/SEs	89
Tabela 4. Atividade antiproliferativa in vitro em IC ₅₀ (μM) dos derivados indólicos Lqit/TEs	91
Tabela 5. Características físico-químicas dos derivados acridínicos	118
Tabela 6. Valores de GI ₅₀ e TGI (μM) dos compostos Lqit/LTs testados, doxorubicina (DOX) e amsacrina (<i>m</i> -AMSA) usados como controle positivo	120
Tabela 7. Dados da espectroscopia de absorção UV-vis e de emissão de fluorescência dos derivados acridínicos, na ausência e na presença de ctDNA	123

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação da obtenção primária do indol a partir do Índigo	30
Esquema 2. Estruturas de ressonância do núcleo indol e do carbocátion por alquilação em C-3 e C-2 do anel	31
Esquema 3. Estrutura de ressonância do indolil e substituição <i>N</i> -indólica	31
Esquema 4. Representação da síntese de Fischer e Madelung na obtenção de derivados indólicos	32
Esquema 5. Síntese de Bernthsen	38
Esquema 6. Síntese de ácido 9-acridina-propionico	38
Esquema 7. Síntese da 9-metilacridina	39
Esquema 8. Síntese dos derivados indólicos Lqit/SEs	55
Esquema 9. Síntese dos derivados da série 3-((1H-indol-3-il-metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.01 - Lqit/TE.02)	57
Esquema 10. Síntese dos derivados da série 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-((1H-indol-3-il-metileno)-amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05)	59
Esquema 11. Etapas do mecanismo reacional de obtenção dos derivados Lqit/SEs	66
Esquema 12. Mecanismo reacional da obtenção dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02	67
Esquema 13. Mecanismo reacional da obtenção dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05	68
Esquema 14. Síntese de derivados acridínicos-tiosemicarbazones	108
Esquema 15. Mecanismo de formação dos compostos intermediários Lqit/LTs	112
Esquema 16. Mecanismo de formação dos compostos acridina-tiosemicarbazonas	112

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Lqit - Laboratório de Química e Inovação Terapêutica

ctDNA - DNA de timo bovino

ISA - isatina (1*H*-indol-2,3-diona)

PCC - clorocromato de piridínio

QSAR - relação estrutura-atividade quantitativa

TOPO – enzima topoisomerase

BE - Brometo de etídio

DOX - Doxorrubicina

UV-Vis - Ultravioleta-Visível

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

DEPT - Intensificação sem distorção por transferência de polarização

COSY - Espectroscopia Correlacionada

HSQC - Correlação Quântica Única Heteronuclear

TGI - Inibição total do crescimento celular

GI₅₀ – Inibição do crescimento em 50% das células

HL-60 – Células de leucemia humana

MCF-7 – células de adenocarcinoma de mama

T47D - células de carcinoma mamário

NCI-ADR/RES – células tumorais de ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas

U251 - glioma

UACC-62 – células de melanoma

NCI-H460 – células tumorais de pulmão

PC-3 - células de adenocarcinoma de próstata

HT29 – célula de adenocarcinoma de cólon humano

OVCAR-03 – célula tumoral de ovário

786-0 - célula tumoral de rim

K562 – célula tumoral de leucemia

DMSO - dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1 Introdução	18
2 Objetivos	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 Revisão de Literatura	23
3.1 Câncer	23
3.2 Química Medicinal	25
3.3 Indóis	27
3.3.1 Reatividade do núcleo indol	29
3.3.2 Aplicações do núcleo indol	33
3.4 Derivados Tiazolidínicos e Imidazolidínicos	36
3.5 Acridinas	37
3.5.1 Aplicações do núcleo acridínico	39
3.6 Estudo da Interação com o DNA	42
3.6.1 Espectroscopia de Absorção Uv-Vis	45
3.6.2 Espectroscopia de Fluorescência	46
3.6.3 Ligações nos Sulcos	46
3.6.4 Intercalação	48
3.7 Atividade Antitopoisomerase	49
4. Avaliação da interação com o DNA de novos derivados indólicos, análise da atividade antitumoral in vitro e antitopoisomerase	53
4.1 Metodologia - Química	53
4.1.1 Materiais e Equipamentos	53
4.1.2 Procedimentos Experimentais	54
4.1.2.1 Síntese da Tiazolidin-2,4-diona	54
4.1.2.2 Metodologia de obtenção dos derivados indólicos Lqit/SEs	54
4.1.2.3 Metodologia de obtenção dos derivados indólicos Lqit/TEs	57
4.2 Metodologia - Antiproliferativo	59
4.2.1 Antiproliferativo por ensaio de MTT dos derivados Lqit/SEs	59
4.2.2 Antiproliferativo por ensaio da sulforrodanina B dos derivados Lqit/TEs	60
4.3 Metodologia - Ensaio de ligação com o DNA	61
4.3.1 Materiais e Equipamentos	61

4.3.2 Experimentos de Ligação com o DNA	61
4.3.2.1 Preparação do ctDNA	61
4.3.2.2 Espectroscopia de absorção eletrônica	61
4.3.2.3 Estudo do deslocamento do Brometo de Etídio com derivados	62
Lqits/SEs	
4.3.2.4 Espectroscopia de fluorescência dos derivados Lqit/TEs	63
4.4 Metodologia - Antitopoisomerase	64
4.5 Metodologia - Determinação do Log P	64
4.6 Resultados e Discussão - Química	65
4.6.1 Mecanismo Reacional da Síntese dos Derivados indólicos Lqit/SEs	65
4.6.2 Mecanismo Reacional da Síntese dos Derivados Indólicos Lqit/TEs	67
4.6.3 Análise Espectroscópica dos Derivados Indólicos	68
4.6.4 Características Físico-Químicas dos derivados Indólicos	85
4.7 Resultados e Discussão - Antiproliferativo	86
4.7.1 Antiproliferativo dos Derivados Lqit/SEs	86
4.7.2 Antiproliferativo dos Derivados Lqit/TEs	88
4.8 Resultados e Discussão - Ensaio de Ligação com o DNA	90
4.8.1 Espectroscopia de Absorção Eletrônica	90
4.8.2 Espectroscopia de Fluorescência	97
4.8.2.1 Propriedade de ligação dos derivados Lqit/SEs no complexo BE-DNA	98
4.8.2.2 Propriedade de ligação dos derivados Lqit/TEs ao DNA	101
4.9 Resultados e Discussão - Antitopoisomerase	103
5. Síntese, ligação com o DNA e atividade antiproliferativa de novos derivados de acridina	106
5.1 Metodologia - Química	106
5.1.1 Materiais e Equipamentos	106
5.1.2 Procedimento experimental de obtenção dos derivados de acridina	107
5.2 Metodologia - Antiproliferativo	108
5.2.1 Antiproliferativo por Ensaio de Sulforrodamina B	108
5.3 Metodologia - Ensaio com o DNA	108
5.3.1 Materiais e Equipamentos	109
5.3.2 Experimentos de ligação com o DNA	109
5.3.2.1 Preparação do ctDNA	109

5.3.2.2 Espectroscopia de absorção eletrônica	110
5.3.2.3 Espectroscopia de fluorescência	110
5.4 Metodologia - Determinação do Log P	111
5.5 Resultados e Discussão - Química	112
5.5.1 Mecanismo Reacional dos Derivados Acridínicos	112
5.5.2 Dados espectroscópicos dos Derivados Acridínicos	113
5.5.3 Características físico-químicas dos Derivados Acridínicos	117
5.6 Resultados e Discussão - Antiproliferativo	118
5.7 Resultados e Discussão - Estudo da Ligação com o DNA	121
6. Considerações Finais e Perspectivas	127
Referências	
Apêndices	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo de ligação de moléculas pequenas ao DNA tem sido uma área ativa e crescente nos últimos anos. O DNA é uma biomolécula, cuja sequência dos pares de base controla a hereditariedade da vida, constituindo assim um alvo primário para a maioria das terapias antitumorais. Uma vez que o DNA é um significativo receptor celular, muitos fármacos exercem seus efeitos antitumorais através da ligação ao DNA (QIAO, 2008), sendo agentes de excepcional importância na biologia do câncer devido ao seu potencial uso terapêutico.

A ligação de moléculas ao DNA pode afetar a sua transcrição, replicação e a expressão da informação genética nas células-alvo, influenciando assim, suas funções fisiológicas e inibindo o crescimento celular (ZHU, 2014). Este mecanismo é a base da concepção de fármacos mais eficazes. Por conseguinte, o estudo da interação de drogas e DNA desempenha um papel-chave na farmacologia e é de grande relevância para a síntese de novos compostos dirigidas ao DNA (BI, 2008).

Na terapia do câncer, muitas moléculas pequenas interagem com o DNA por intercalação entre pares de bases, através de ligações nos sulcos principal e/ou secundário e por interação eletrostática (DUSKOVA et al., 2012; ZHANG et al., 2010).

Um grande número de agentes antitumorais atualmente utilizados, exercem seus efeitos atuando sobre o DNA (ALI e BHATTACHARYA, 2014). Importância particular tem sido dada aos produtos naturais, como por exemplo, pequenas moléculas de alcaloides que têm potencial para formar complexos moleculares com DNA por intercalação ou ligações nos sulcos com uma toxicidade relativamente baixa (PALCHAUDHURI AND HERGENROTHER, 2007). O núcleo indol é um heterociclo com propriedades características devido a presença do anel pirrol, rico em elétrons. Este anel é capaz de realizar interações não covalentes com outras moléculas por formação de ligações de hidrogênio na porção NH (SHIMASAKIA, 2009).

Moléculas com núcleos indóis são comuns na natureza e são biologicamente ativas, tais como triptofano, serotonina e vários alcaloides provenientes de plantas (FUMAGALI et al., 2008). O anel de indol tem sido considerado como um núcleo importante encontrado em muitos compostos ativos que possuem as seguintes atividades biológicas: anticancerígena, antituberculose, anti-inflamatório e antiasmática (BISWAL et al., 2012; SHARMA, KUMAR E PATHAK, 2010). Todas estas atividades vêm sendo atribuídas a esse grupo indol.

Assim como o núcleo indol, derivados contendo o anel da acridina apresentam uma estrutura planar no núcleo principal da molécula, o que confere sua capacidade de interagir com a cadeia dupla do DNA. Apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos, 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).

Com base nestas informações, o nosso grupo de pesquisa tem sintetizado novos derivados indólicos associados com anéis 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona, 2-tioxo-tiazolidin-4-ona, tiazolidin-4-ona e 2-tioxo-imidazolidin-4-ona condensados como cadeias laterais, a fim de investigar a sua capacidade de interação, afinidade e modo de ligação com o DNA.

Quando moléculas se ligam ao DNA, geralmente exibem mudanças marcantes nos seus espectros de absorção e/ou fluorescência em comparação com suas características livres em solução, além de alterações na viscosidade do DNA (GENG et al., 2013). Por outro lado, sondas fluorescentes podem ser utilizadas para obter informações sobre a estrutura do DNA (ANITHA et al., 2013). O brometo de etídio (BE) é um poderoso agente mutagênico amplamente usado em pesquisas bioquímicas para a visualização de ácidos nucleicos (NAFISI et al., 2007) que podem fornecer informações sobre a natureza da afinidade de ligação ao DNA.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs a síntese de novos derivados indólicos e acridínicos, associados a grupos heterocíclicos variáveis: a fim de avaliar a interação com o DNA, as atividades antiproliferativas frente a algumas linhagens de células tumorais e a inibição da enzima topoisomerase.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar novos derivados indólicos associados aos grupos tiazolidínicos e imidazolidínicos (Lqit/SEs e Lqit/TEs) e derivados acridínicos-tiossemicarbazonas (Lqit/LTs), para avaliar a capacidade de interação com o DNA, atividade antiproliferativa e antitopoisomerase.

2.2 Objetivos Específicos

Sintetizar e determinar as características físico-químicas de onze novos derivados indólicos, associados a heterocíclicos tiazolidínicos e imidazolidínicos, e oito novos derivados acridínicos associados a tiossemicarbazonas;

Caracterizar as estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), carbono (RMN ^{13}C), infravermelho (IV) e espectrometria de massas (MS);

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos novos derivados sintetizados frente a diferentes linhagens de células cancerígenas;

Analisar a interação com o DNA dos derivados, através da espectroscopia de absorção UV-visível e espectroscopia de fluorescência utilizando brometo de etídio como sonda fluorescente;

Verificar a capacidade de inibição da atividade das enzimas topoisomerase I humana dos derivados indólicos que mais se destacaram na ligação com o DNA.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer

O termo "câncer" é uma expressão genérica para um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. A multiplicação das células em organismos multicelulares saudáveis é cuidadosamente regulada com o propósito de atender às necessidades específicas de cada indivíduo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de neoplasias malignas (INCA, 2015). As células cancerosas diferem das células normais pelo fato de continuarem a crescer, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase (HANAHAAN e WEINBERG, 2011).

A origem da célula cancerígena é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose, causados por mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003). Os carcinógenos químicos (particularmente aqueles presentes no tabaco e resultantes de sua combustão e metabolismo), bem como determinados agentes, como os azocorantes, aflatoxinas e benzeno, foram claramente implicados na indução de câncer (COOPER, 2001; DEVLIN, 2007). Muitos dos agentes carcinogênicos químicos encontram-se no meio ambiente humano e relacionam-se a hábitos sociais, alimentares ou ocupacionais.

Diversos mecanismos existem e estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna. Entretanto, a maior parte deles interferem na divisão celular (ALMEIDA et al., 2005). Assim, o conhecimento sobre o ciclo celular é de fundamental importância no processo de carcinogênese. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. Na fase S, há duplicação do DNA e durante a fase M, segregação de todos os componentes celulares entre as células filhas. As fases G1 e G2 correspondem aos períodos em que as células se preparam para execução das fases S e M, respectivamente. Quando as células não proliferam, elas entram em estado de quiescência, conhecido como G0, no qual o DNA encontra-se super-enrolado (NELSON e COX, 2010). A principal função do

ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Quando a replicação, a reparação do DNA ou a reunião dos cromossomos for aberrante, as células normais detêm o seu avanço no ciclo celular até que a condição seja corrigida. Porém, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação fica impossível e a célula inicia a apoptose (MA et al., 2011).

As alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas as etapas de iniciação da carcinogênese. Duas classes de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular (LUO et al., 2009). Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005). Como consequência, a célula cancerígena apresenta perda da função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. Diante disso, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica (ZITVOGEL et al., 2008).

A análise minuciosa do perfil e das características de um tumor para prever o prognóstico e tratamento ideal tem sido o objetivo principal da oncologia, seguido da detecção precoce de células cancerosas no organismo, para um início rápido de tratamento e, consequentemente, aumento das chances de cura e sobrevida do paciente. O conhecimento do mecanismo molecular da doença e das formas de intervenção que a previnem e controlam é, portanto, essencial para a identificação de estratégias de controle e diagnóstico.

O tratamento do câncer requer uma ou mais intervenções, tais como remoção cirúrgica, radioterapia, terapia hormonal e quimioterapia (VIDEIRA, REIS e BRITO, 2014). A quimioterapia surgiu na década de 40 com a utilização das mostardas de nitrogênio que são poderosos agentes alquilantes e antimetabólitos. Após o sucesso inicial do uso desses compostos, várias outras drogas antitumorais foram desenvolvidas. A estratégia mais utilizada da quimioterapia tem por objetivo a destruição das células neoplásicas, as quais possuem como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Por outro lado, a quimioterapia tem como efeitos secundários importantes em células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010).

Devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo de rápido crescimento, o grande desafio para o tratamento dos mais diversos tipos de cânceres é a descoberta de fármacos capazes de fazer distinção entre essas células, atuando apenas nas células tumorais (ALMEIDA et al., 2005). Neste contexto, a modificação estrutural de substâncias tem sido uma ferramenta importante na descoberta de novas drogas, com o objetivo de aumentar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades indesejáveis (SILVERMAN, 1992). Assim, desenvolver fármacos capacidade-alvo significa produzir moléculas direcionadas para alvos moleculares específicos envolvidos em vias que geram capacidades tumorais particulares. (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

3.2 Química Medicinal

Química Medicinal é uma disciplina de caráter inter e multidisciplinar, uma vez que conhecimentos de várias áreas como biologia molecular, bioquímica, fisiologia, patologia, química orgânica, química inorgânica e química quântica são necessários para a formação e atuação dos estudos em Química Medicinal. Desempenhando assim, função central no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

As estratégias modernas de planejamento de novos compostos bioativos estão fundamentadas no conhecimento prévio dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo fisiológico ou patológico (SALUM, 2011) e na definição das interações moleculares existentes no complexo fármaco e alvo terapêutico (WHITTY, 2008), incorporando, além da descoberta de novas moléculas bioativas, os estudos do metabolismo e das relações entre estrutura química e atividade (GUIDO, ANDRICOPULO E OLIVA, 2010).

A identificação de moléculas bioativas, que possam ser estruturalmente modificadas para adequação de propriedades que conduzam a um elevado potencial terapêutico, é um dos maiores desafios nos projetos de planejamento de novos candidatos a fármacos. Geralmente, o alvo terapêutico é representado por uma enzima ou receptor e o planejamento do novo ligante é realizado introduzindo-se modificações moleculares clássicas no substrato natural e/ou sintético, já conhecido para este receptor (BARREIRO E BALZANI, 2009).

Entre os métodos mais frequentemente utilizados no planejamento racional de novos ligantes ou compostos-protótipos encontra-se a hibridação molecular. Essa estratégia é baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na estrutura química de dois ou mais compostos bioativos conhecidos e que através de uma fusão dessas subunidades leva a

uma nova entidade química híbrida. O derivado resultante apresenta uma arquitetura molecular que mantém as características das moléculas originais (SAMALA et al., 2014).

Vários trabalhos envolvendo a hibridação molecular já foram publicados por diversos pesquisadores. Recentemente, nosso grupo de pesquisa (LAFAYETTE et al., 2013) sintetizou nova entidade química proveniente da hibridação molecular da acridina com núcleo da 3-amino-2-tioxi-tiazolidin-4-ona, com atividades biológicas amplamente conhecidas, obtendo derivado tiazacridina (Figura 1) que apresentaram capacidade de interagir com DNA tanto por intercalação quanto por ligação nos sulcos.

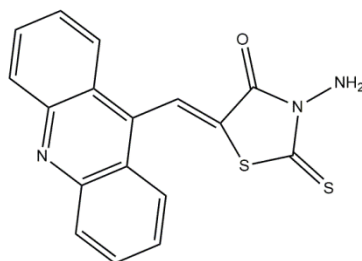


Figura 1. Estrutura química do derivado tiazacridina obtido via hibridação molecular (Lafayette et al., 2013).

Addla e colaboradores (2012) também fizeram uso da hibridação molecular para síntese de uma nova série de 1-benzil-2-butil-4-cloroimidazol-5-carboxaldeído incorporado a variados compostos de 4-aza-fluorenona. Os resultados demonstraram potencial importância da hibridação molecular no desenvolvimento de um derivado (Figura 2) com ação poderosa contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*.

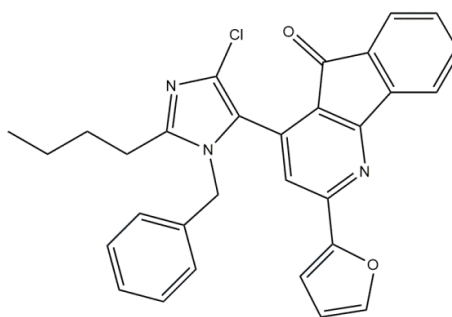


Figura 2. Derivado químico obtido por Addla et al (2012) via hibridação molecular.

A estratégia de hibridação molecular é uma ferramenta versátil para a modificação estrutural de um composto, pois fornece novas classes de fármacos mais seletivos e mais eficazes na forma de derivados híbridos. Esta técnica possui, então, a habilidade de utilizar

compostos com atividades distintas e gerar novos fármacos com ações farmacológicas duais, como por exemplo, anti-inflamatória e antitumoral, antimicrobiana e analgésica, entre outras.

Dentre o grande arsenal de moléculas existentes, podemos destacar as derivadas de heterocíclicos como principais protótipos para a obtenção de novos fármacos. A importância dos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que diz respeito ao fato de inúmeros usos como medicamentos (MARTINS et al., 2009). Podemos ressaltar um grupo de compostos mononucleares de cinco membros que apresentam dois heteroátomos inseridos no anel, nitrogênio e enxofre, com grupo carbonila nas posições 2 e/ou 4 do anel, que são as tiazolidinas e imidazolidinas. A estes grupos são atribuídas diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, tuberculostático, antitumoral, esquistossomicida, anti-malária, entre outras (ASATI et al., 2014; NEVES et al., 2011).

Incorporado a estas atividades biológicas, encontra-se um núcleo bastante interessante e presente em muitos compostos farmacologicamente ativos, que é o indol (NICOLAU e SNYDER, 2003), descrito como estrutura privilegiada dotado de funções diversas devido a presença do átomo de nitrogênio no anel, o que desperta grande expectativa no desenvolvimento de fármacos mais eficazes (CINAR e KARABACAK, 2013).

3.3 Indóis

O indol é um composto orgânico aromático constituído por um anel benzeno ligado a um anel pirrol. Estrutura heterocíclica predominantemente encontrada em produtos naturais de várias plantas, que está presente em muito compostos biologicamente ativos (NICOLAU E SNYDER, 2003). A família de compostos contendo o núcleo indol inclui um enorme número de produtos farmacêuticos, alcaloides e de agentes potencialmente terapêuticos (SUNDBER, 2010). Por isso, existe uma procura contínua por procedimentos sintéticos para novos análogos de indóis condensados com diferentes heterocíclicos.

Alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas amplamente na natureza. Os alcaloides indólicos são os derivados do L-triptofano, que apresentam um amplo espectro de atividade farmacológica, como analgésica, anti-inflamatória, bactericida, estimulante e depressora do sistema nervoso central (FUMAGALI et al., 2008). A triptamina e a serotonina, com atividades cerebrais, são exemplos de alcaloides indólicos simples com ampla distribuição na natureza. Na figura 3 são mostrados exemplos de alcaloides indólicos.

Um dos derivados considerados importantes do indol é a isatina (1*H*-indol-2,3-diona, ISA). Derivado metabólico da adrenalina que está presente no cérebro, tecidos e fluidos

humanos (IGOSHEVA et al., 2005) e é encontrado também distribuído na natureza, em produtos naturais de algumas plantas do gênero *Isatis* (FARGHALY et al., 2009). Derivados da isatina-3-tiosemicarbazona como a isatina-3-semicarbazona, a isatina-3-tiosemicarbazona e a 5-bromoisatina-3-tiosemicarbazona possuem atividade antitumoral e ligantes ao DNA (ALI et al., 2014), além de serem agentes antibacterianos, antivirais (FINKIELSZTEIN et al., 2008) e tuberculostáticos (KARALI et al., 2007).

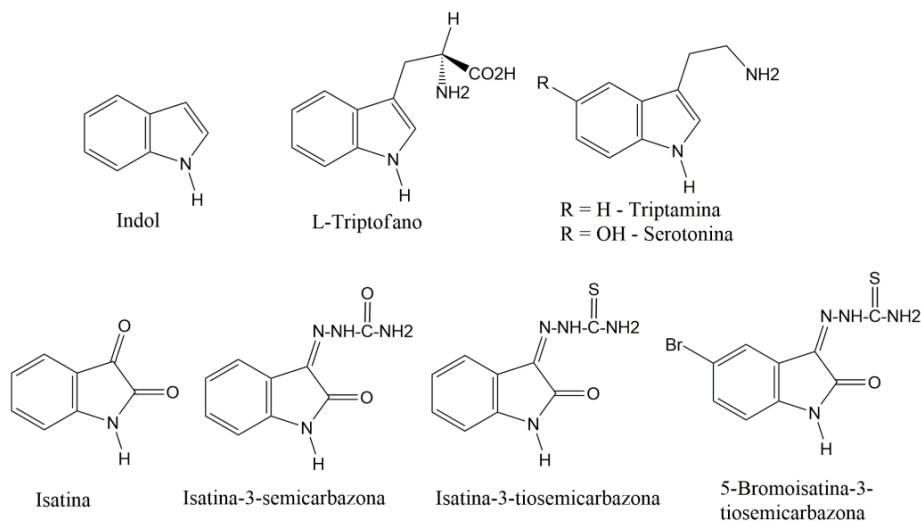


Figura 3. Estrutura química do indol e alcalóides indólicos.

Ainda relacionado a derivados indólicos naturais, compostos isolados da folha da árvore *Voacanga africana* demonstraram alta toxicidade contra tumores de células, como o indol-3-carbinol (Figura 4) utilizado no tratamento contra o câncer de mama (MACEBEO et al., 2009).

Apesar de todas as atividades farmacológicas interessantes mencionadas até agora, um dos maiores impactos de fármacos derivados de alcalóides indólicos foram, sem dúvida, os isolados da *Catharantus roseus*: a vinblastina e vincristina (Figura 4) (DONNICI et al., 2005). Essas duas substâncias apresentam sucesso na quimioterapia desde a sua introdução clínica como drogas antitumorais, hoje utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer (GIGANT et al., 2005).

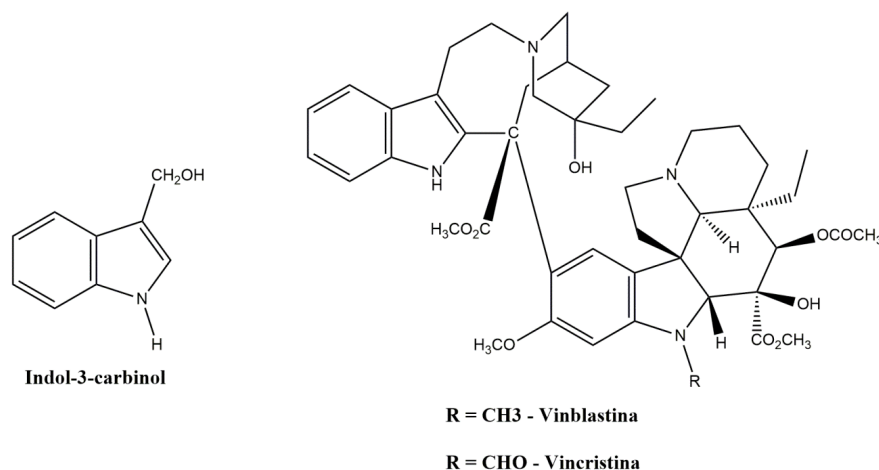
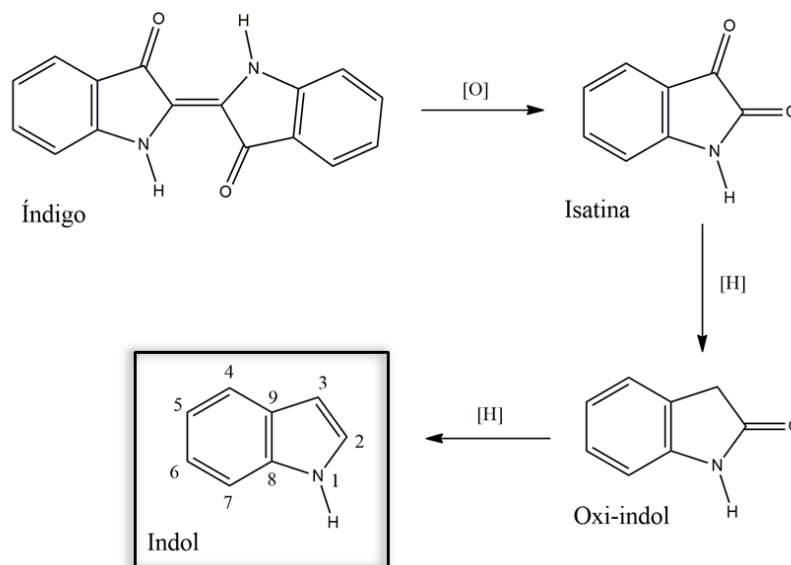


Figura 4. Alcaloides indólicos com atividade antitumoral

A descoberta dos alcaloides indólicos substituídos e o conhecimento das propriedades biológicas permitiram aumentar o interesse por esse grupo, a partir do qual vários estudos foram inicializados com o intuito de compreender a reatividade do anel indol (LI et al., 2000) e contribuir no desenvolvimento de metodologias para a construção destes compostos e, posterior, aumento de suas ações farmacológicas.

3.3.1 Reatividade do núcleo indol

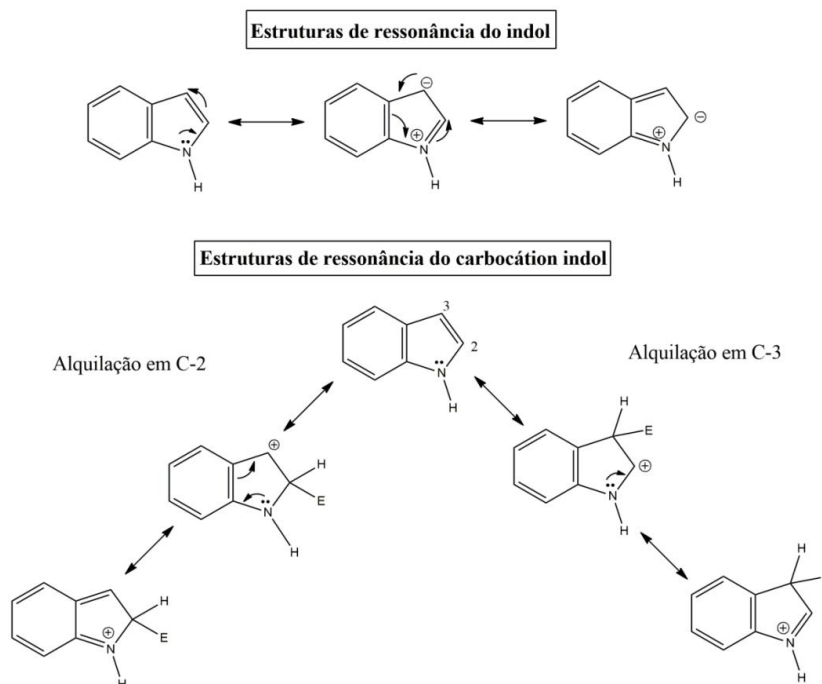
A química do indol teve sua origem com a investigação da estrutura do índigo, um corante azul extraído de plantas do gênero *Indigofera*. Em 1866, o indol foi obtido pela primeira vez por Baeyer e Knop a partir da reação de oxidação com o índigo, com formação da isatina seguida por duas etapas de redução, passando pelo intermediário oxi-indol e ao final do núcleo indol (Esquema 1) (GRIBBLE, 2007).



Esquema 1. Reação da obtenção primária do indol a partir do Índigo.

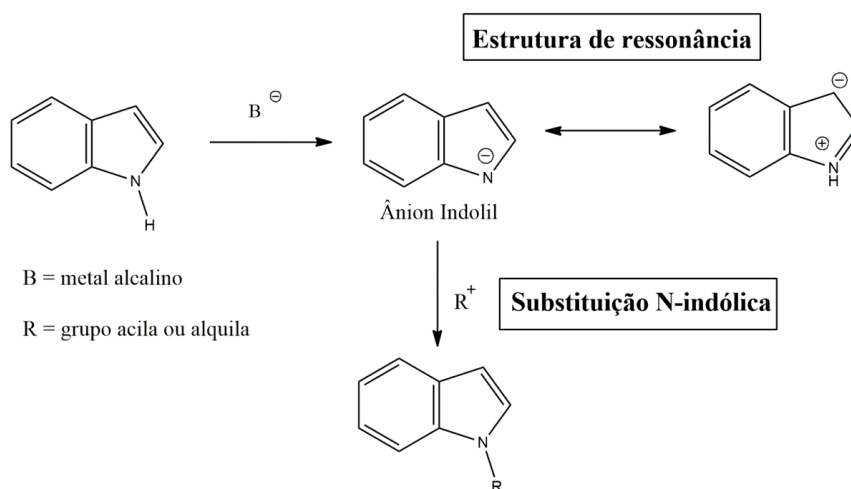
O sistema heterocíclico aromático do indol é altamente reativo. A participação do par de elétrons do nitrogênio no sistema aromático faz dele um composto rico em elétrons, tornando-o bastante reativo frente a reações de substituição eletrofílica (SUNDBERG, 2010). O anel indólico apresenta um sítio reativo acentuado no C-2 e C-3, principalmente na posição 3, devido a estabilidade de uma de suas formas ressonantes com cargas (Esquema 2) (JOULE E MILLS, 2010). Cálculos teóricos sobre a reatividade de cada átomo foram realizados em heterocíclicos aromáticos (MARTINEZ et al., 2003) e, no caso do indol, os resultados apontaram que os átomos mais reativos para ataque eletrófilo são C-3 com 0.18, seguida do C-2 com 0.05. Estes dados são de fundamental importância para prever e justificar reações no núcleo indólico.

Do ponto de vista da estabilização relativa dos intermediários de reação, uma alquilação no C-3 conduz a formação de um carbocátion na posição C-2 do núcleo indólico, o qual pode ser estabilizado por ressonância pelo par de elétron não compartilhado do nitrogênio, sem comprometimento da aromaticidade do anel benzênico. Ao contrário do que ocorre com a formação de um carbocátion em C-3, quando ocorre entrada de um eletrófilo no C-2 (SCHWALM, 2010).



Esquema 2. Estruturas de ressonância do núcleo indol e do carbocátion por alquilação em C-3 e C-2 do anel.

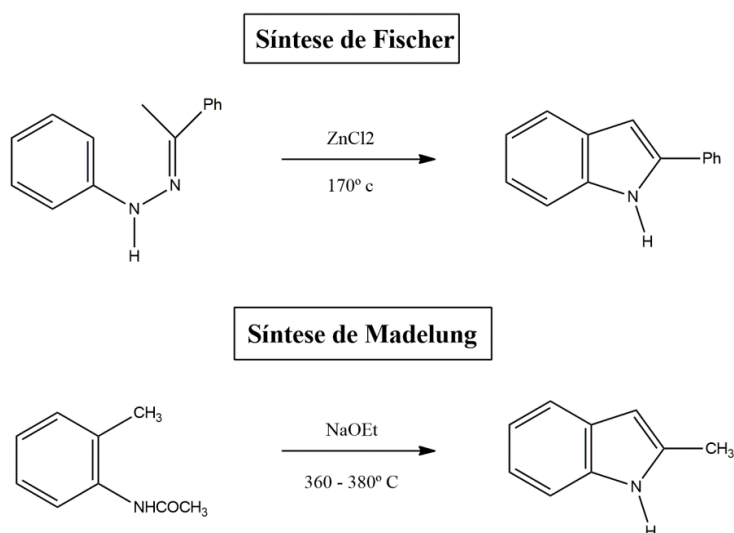
Na análise do grupo pirrol (pK_a 23), a relativa acidez do hidrogênio indólico (pK_a 20,6) (GRIBBLE, 2007) pode contribuir na atuação de uma base forte como hidreto de sódio na captura do H-1 e formação do ânion indolil, o qual dispõem de duas principais estruturas de ressonância (Esquema 3), com carga negativa em N-1 e C-3 da estrutura indólica (SOMERS, KRYACHJO e CEULEMANS, 2004). Por conseguinte, o ânion indolil se comporta como um nucleófilo e proporciona um meio de rota para *N*-acilação e *N*-alquilação, na presença de base contendo sódio e potássio (SUNDBERG, 2010).



Esquema 3. Estrutura de ressonância do indolil e substituição *N*-indólica.

A rota mais amplamente utilizada na preparação de indóis foi estabelecida através da Síntese de Fisher, a qual consiste no tratamento de fenilhidrazonas em meio ácido, com liberação de amônia. Método acessível utilizado na obtenção de indóis com vários substituintes e cadeias laterais nas posições 2 e 3 (JOULE e MILLS, 2010). Mais recentemente, Gore, Baskaran e Koning (2012) sintetizaram derivados indólicos com excelente rendimento (97%) por meio da reação de fenilhidrazina com variedades de cetonas em condições suaves (70° C) e mistura de ácido tartárico:dimetiluréia (30:70).

Outra alternativa na obtenção de indóis é através da síntese de Madelung, que envolve a ciclização intramolecular de uma N-(2-alkilfenil)alquilamida com uma base forte, mais comumente alcóxido de sódio, sob temperaturas elevadas de 300-400 °C (BOBKO et al., 2012). As limitações mais notáveis em muitos procedimentos de obtenção do indol, como longo tempo de duração e altas temperaturas (TABER e TIRUNAHARI, 2011), impulsionaram pesquisadores a buscar modificações na rota de Madelung. Sob condições de reação da (3-aminopiridin-2-il)-acetonitrila com ácido isonicotínico, diclorometano e variação nas bases utilizadas, Jadhav e colaboradores (2013) obtiveram derivados 3-ciano-azaindólicos em temperatura ambiente com rendimentos de 60% e duração de 4 horas, utilizando a *N,N*-diisopropiletilamina como base. No esquema 4 abaixo é mostrado a representação da síntese de Fischer e Madelung.



Esquema 4. Representação da síntese de Fischer e Madelung na obtenção de derivados indólicos.

Anéis de indóis são estruturas privilegiadas em várias áreas da química, pela versatilidade de atividades biológicas frequentemente encontrada em compostos orgânicos contendo este núcleo inserido. Estudos da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) de compostos relacionados forneceram evidências que o núcleo indol é um significativo centro reativo de moléculas (SUNDBERG, 2010).

3.3.2 Aplicações do núcleo indol

Continuamente, um grande número de esforços para sintetizar diferentes compostos heterocíclicos são feitos na tentativa de obter novos derivados promissores nas atividades biológicas propostas. Ainda que o núcleo indol seja um grupo pequeno, o mesmo é bastante explorado por pesquisadores devido não apenas ao amplo espectro de atividades oriundas do anel indólico, mas também proveniente dos seus derivados substituídos (BISWAL et al., 2012).

Uma ampla revisão foi realizada por Sharma, Kumar e Pathak (2010) sobre a importância biológica do núcleo indol. Estes, demonstraram estudos e a eficiência em diversos efeitos farmacológicos (figura 5), entre eles: anti-inflamatório e analgésico, antimicrobiano, antitumorais, inibidor do HIV, inibidor da lipooxigenase, tuberculostático, antihipertensivo, antihistamínico e outros. Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores, Biswal e colaboradores (2012) também relataram a variedade de atividades de derivados contendo o núcleo indol, engrandecendo ainda mais estes compostos com ações antiasmática, antiarrítmico, inibidor da RNA polimerase e antiesquezofrênico.

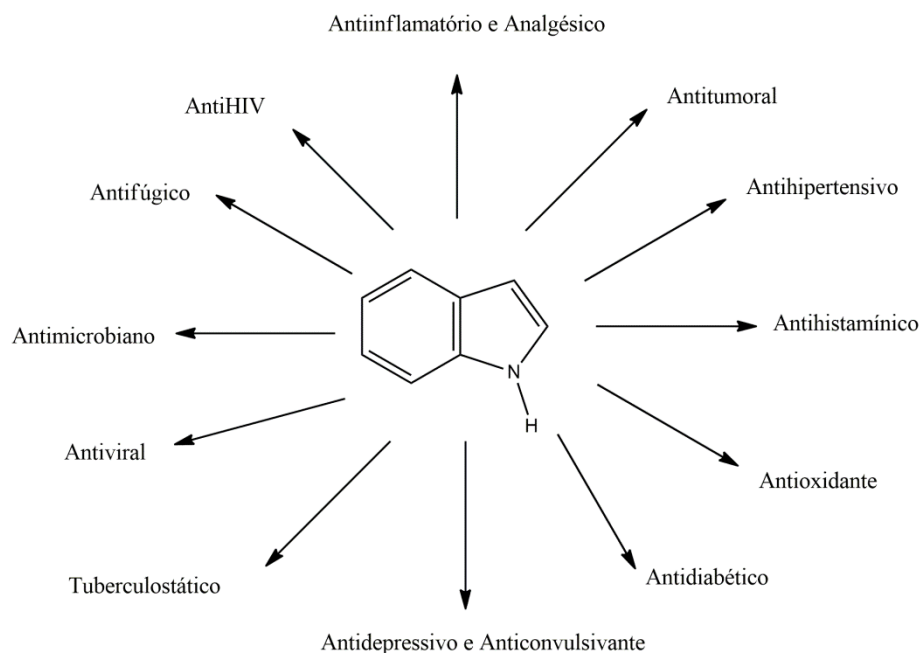


Figura 5. Diversidade de atividades biológicas do núcleo indol.

Compostos indólicos substituídos foram recentemente sintetizados e analisados quanto a sua atividade antitumoral. Derivados indólicos 2,4-disubstituídos furo[3,2-b] obtidos e avaliados frente a linhagens de células tumorais humanas, mostraram-se eficazes, com maior evidência para o (5-((2-(hidroximetil)-4*H*-furo[3,2-b]indol-4-il)metil)furan-2-il)metanol (A) como o agente mais promissor por exibir atividade anticâncer altamente seletivo e atividade inibitória contra células cancerosas renais A498 (ZHUANG et al., 2013). Inúmeras pesquisas realizadas constataram eficiência na atividade antitumoral relacionada a presença do grupamento indol, entre eles podemos citar o derivado 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimetoxifenil)-6-(1-metil-1*H*-indol-3-il)nicotinonitrila (B) (ZHANG et al., 2011); derivados metil-4-isopropoxi-6-metoxi-1*H*-indol-2-carboxilato (C) e metil-6-amino-4-ciclohexilmetoxi-1*H*-indol-2-carboxilato (D) (JI et al., 2014).

Heda e colaboradores (2009) obtiveram indóis halogenados e avaliaram sua atividade antimicrobiana através do método de difusão de disco, mostrando melhores resultados de concentração inibitória mínima de 50 µg/mL para os derivados (E) e (F) nas culturas de bactéria (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*) e fungos (*Aspergillus ninger* e *Fusarium oxysporum*), respectivamente.

Uma variedade de doenças e eventos fisiopatológicos como inflamação, câncer e distúrbios neurodegenerativos estão, muitas vezes, associadas a ação de radicais livres no sistema biológico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998) e muitos derivados indólicos são considerados potentes captadores de radicais livres (TALAZ et al., 2009). Uma série de indóis

com uma porção barbitona inserida foram sintetizados e avaliados com relação a atividade antioxidante e clivagem do DNA, exibindo excelente ação antioxidante o composto (G) com substituintes hidrogênio, metil e cloro, mostrado na figura 6 (BIRADAR, SASIDHAR E PARVEEN, 2010).

Muitos cientistas, ainda têm realizado consideráveis pesquisas na síntese e avaliação de derivados indólicos como inibidores da enzima ciclooxigenase (COX), através da analogia ao fármaco indometacina, um dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mais amplamente utilizados que dispõe de uma porção indol em sua estrutura (ESTEVÃO et al., 2012). Recentemente novos derivados indólicos foram obtidos através da reação de 5-substituído-1*H*-indol-3-carboxaldeído e 1-metilindol-3-carboxaldeído com acetofenonas apropriadas, seguido de investigação da sua atividade anti-inflamatória. Os dados *in vitro* demonstraram dois derivados mais potentes: o composto (H) mostrou atividade para COX-1 ($IC_{50} = 8.6 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), enquanto o (I) exibiu atividade inibitória para COX-1 ($IC_{50} = 8.1 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$) e COX-2 ($IC_{50} = 9.5 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$), quando comparado com valores da indometacina (COX-1; $IC_{50} = 0.7 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ e COX-2; ($IC_{50} = 10.0 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$) (OZDEMIR et al., 2015).

Derivados indólicos também são obtidos com a finalidade de serem explorados quanto a um potencial agente anticonvulsivante e antidepressivo (FALCO et al., 2006). Através da inserção de elementos estruturais de medicamentos estabelecidos ao núcleo indol-*N*-1,2,4-triazina, evidenciou-se a eficácia dos derivados (J) e (L), amplificando assim, as atividades biológicas inerentes/relativa a compostos contendo o anel indol (AHUJA e SIDDIQUI, 2014).

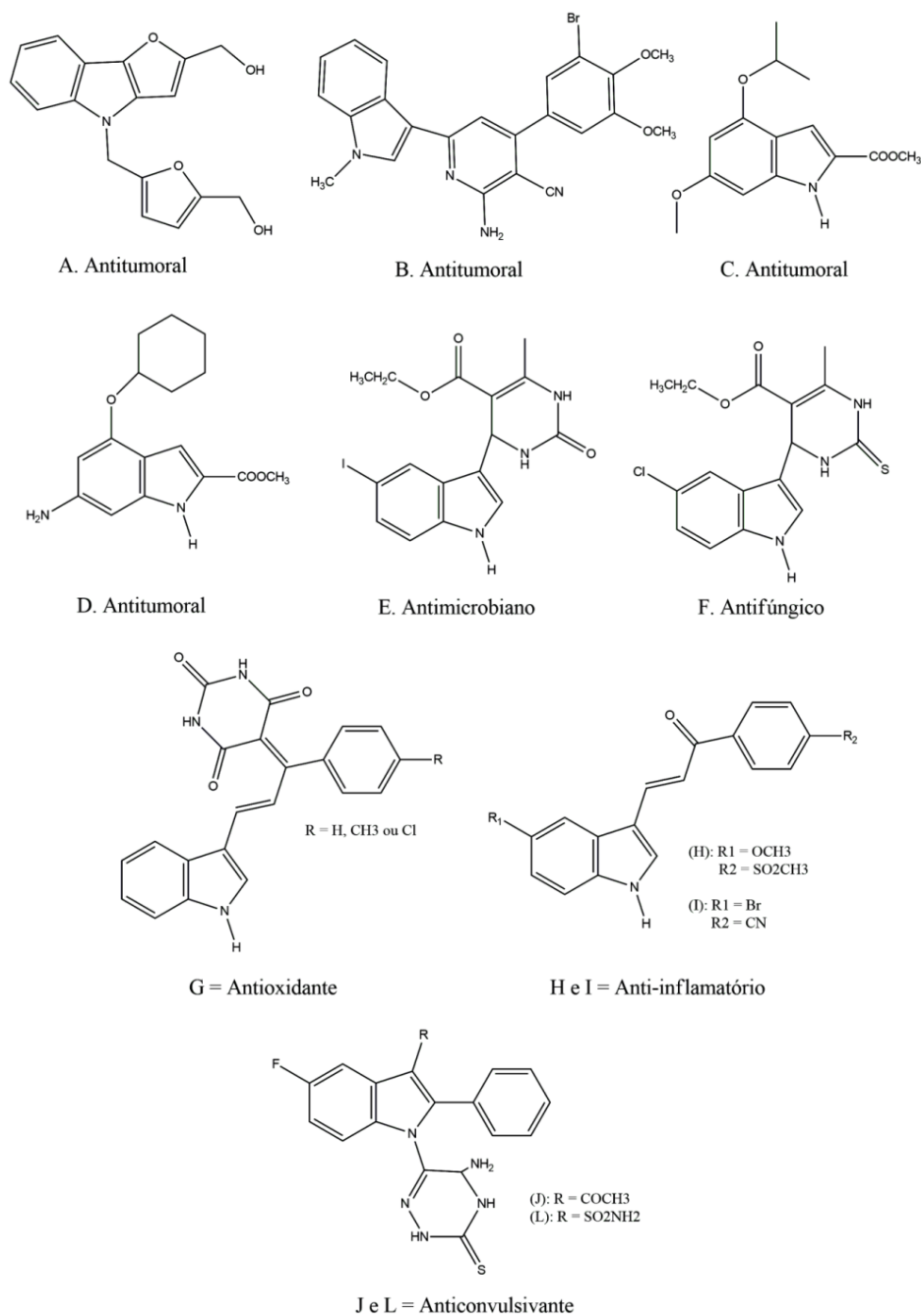


Figura 6. Derivados indólicos e atividade farmacológica correspondente.

3.4 Derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos

A introdução de novos substituintes ao anel indol é uma estratégia de grande importância para a produção de variadas moléculas, com o objetivo de buscar novos candidatos a fármacos para tratamento mais seguro e eficaz. Compostos derivados de tiazolidina e imidazolidina representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido as suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades

biológicas, as quais podem ser obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos (ASATI et al., 2014; NEVES et al., 2011).

Uma diversidade de propriedades farmacológicas tem sido documentada para derivados tiazolidínicos, mostrando atividade fungicida, analgésica, antitumoral, antiulcerativa e bacteriostática (LIU et al., 2014). Já os derivados imidazolidínicos são conhecidos por suas atividades antimicrobiana, anticonvulsivante e, principalmente, antitumoral e esquistossomicida (OLIVEIRA, 2010).

As diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas à reatividade química de ambos os anéis, o que permite reações de condensação com aldeídos e cetonas ao carbono C-5, além de N-alkilação com grupo NH na posição 3 do anel. Estas reações promovem modificações físico-químicas e estruturais (LIESEN et al., 2008) e, conseqüentemente, melhoram a afinidade dos anéis à biomacromoléculas (OLIVEIRA et al., 2008). Tais derivados apresentam, ainda, a capacidade de atravessar a membrana celular e nuclear, o que permite a entrada no interior do núcleo, fator essencial para a atividade antitumoral, visto que alcança o principal alvo biológico, o DNA (VIEIRA, 2004).

3.5 Acridinas

Acridinas ($C_{13}H_9N$) são compostos heterocíclicos formados de dois anéis fundidos a um anel piridínico em posição central (Figura 7). 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).

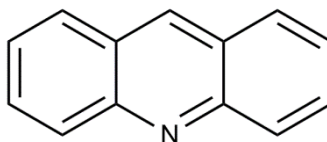
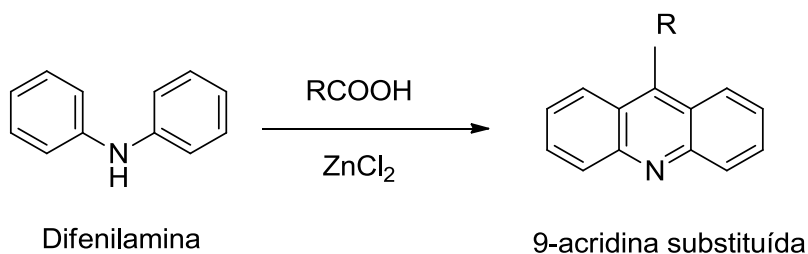


Figura 7 – Estrutura química do anel acridínico.

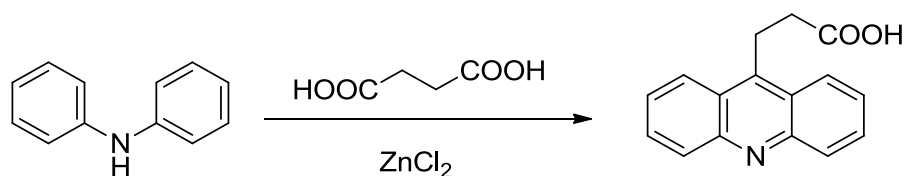
Uma variedade de rotas de síntese do anel acridínico é reportada na literatura, o que possibilita aos pesquisadores escolher a melhor via de síntese, o que pode resultar em melhores rendimentos e menor tempo de reação. Um dos métodos mais utilizados é a síntese de Bernthsen, que consiste em aquecer uma mistura de ácido carboxílico com difenilamina na

presença de cloreto de zinco a 200-270° C (Esquema 5). 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 5 – Síntese de Bernthsen (Acheson, 1956)

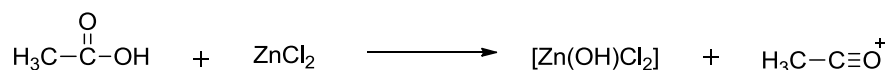
Estratégia de síntese semelhante (Esquema 6) foi utilizada por David-Cordonnier et al. (2007), que obtiveram o ácido 9-acridina-propiónico a partir de uma difenilamina e ácido succínico em presença de ácido sulfúrico aquoso a 20% e cloreto de zinco.



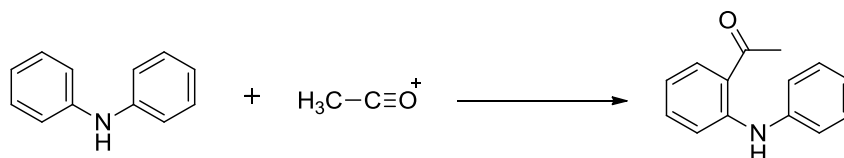
Esquema 6 - Síntese de ácido 9-acridina-propiónico (DAVID-CORDONNIER et al., 2007)

A metodologia adotada pelo nosso grupo de pesquisa 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 7). 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.

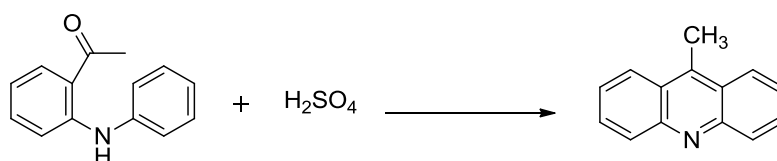
Formação do íon acílio



Acilação da difenilamina



Ciclização



Esquema 7 – 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).

3.5.1 Aplicações do núcleo acridínico

Acridina e seus derivados são agentes quimioterápicos amplamente estudados como antimaláricos, antiprotozoários, bactericidas 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, 2007). Dependendo da função do substituinte introduzido, os derivados acridínicos antitumorais se comportam não apenas como agentes intercalantes do DNA, mas também como inibidoras específicas 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, é 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 topoisomerases 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 8) (DENNY, 2002). A terapia combinada da asulacrina com a cisplatina mostrou uma ação significativamente superior ao tratamento isolado, com um mecanismo de ação através da inibição da topoisomerase II, sugerindo que tal associação pode ter um potencial clínico relevante (ELLIOTT et al., 1996). A atividade antitumoral dos derivados de acridina é atribuída às suas propriedades intercaladoras ao DNA das células alvo e/ou inibição enzimática das topoisomerases I ou II (GAO et al., 2010; BARROS et al., 2012)

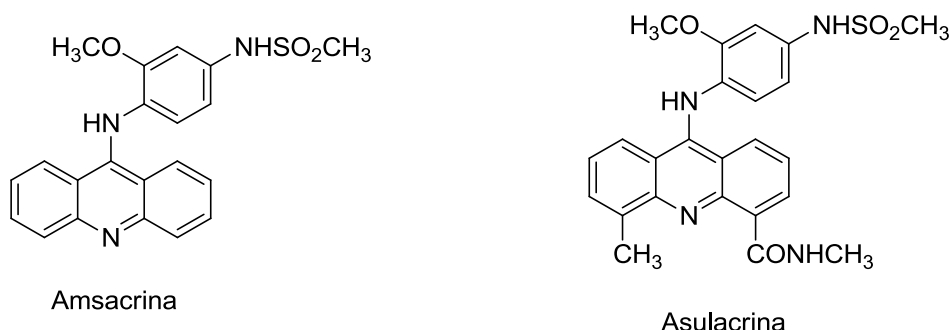


Figura 8 – Estrutura química da amsacrina e asulacrina.

A fusão do anel acridina com anéis heterocíclicos de cinco ou seis membros gera derivados policíclicos com um importante papel na classe de compostos antitumorais intercalantes do DNA (ANTONINI et al., 2003; MAGNANO et al. 2004). O poder intercalador dos derivados tiazacridinas e imidazacridinas foi confirmado pelo trabalho de Lafayette et al. (2013). Os autores avaliaram a capacidade de ligação ao ctDNA por meio de espectroscopia UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular (DC). Os compostos tiazacridínicos e imidazacridínicos (Figura 9) mostraram constantes de ligação na faixa entre 1.46×10^4 e $6.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Estudos de fluorescência confirmaram a interação por meio de supressão da

emissão do complexo ligante-DNA, enquanto o DC demonstrou perturbação na dupla hélice do DNA. Além disso, concentração de 100 μM inibiu a atividade topoisomerase I.

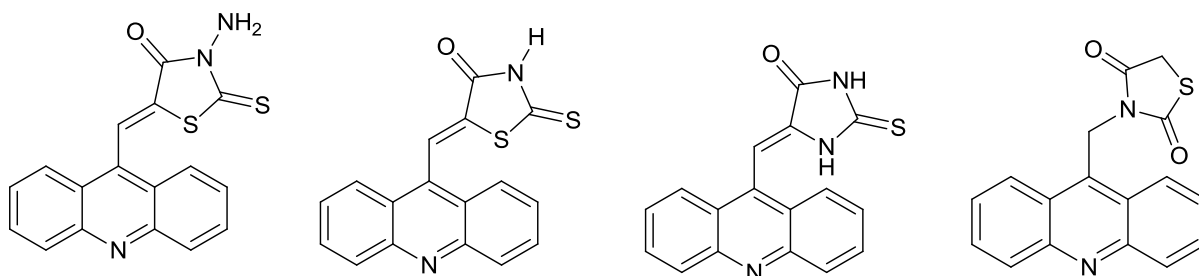


Figura 9. Derivados tiazacridinas e imidazacridinas que apresentam propriedades intercaladoras do DNA e inibidoras da enzima topo I. (Lafayette et al. 2013).

Novos derivados acridina-tiazolidina foram sintetizados por Barros et al. (2012) pelo acoplamento do anel acridina ao núcleo tiazolidina (Figura 10). A citotoxicidade dos derivados foi avaliada contra várias linhagens tumorais com *m*-AMSA como controle positivo. As tiazacridinas exibiram boa atividade contra células de carcinoma de cólon e glioblastoma, com menor atividade que o controle positivo *m*-AMSA (IC_{50} entre 0.08 e 3.3 μM). Os derivados tiazacridinas mostraram certa seletividade contra glioblastoma, mas não foram ativos contra leucemia, carcinoma mamário e células linfoblásticas normais. Apesar de serem menos ativas que a *m*-AMSA, a seletividade para células de tumores sólidos é interessante, visto que a *m*-AMSA não é eficaz no tratamento desses tipos de tumores.

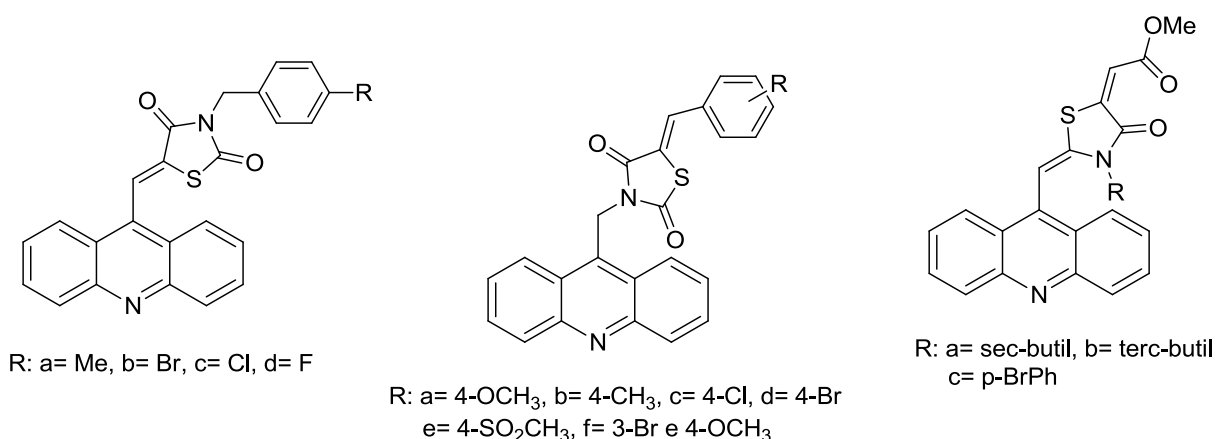


Figura 10. Estruturas químicas de novos derivados acridina-tiazolidinas com poder intercalador ao DNA e atividade antiproliferativa.

3.6 Estudo da interação com o DNA

O DNA é uma biomacromolécula importante, pois contém instruções genéticas para o desenvolvimento e funcionamento de organismos vivos. Sua estrutura dispõe de vários sítios de ligação para uma ampla variedade de compostos. Assim, moléculas orgânicas e inorgânicas podem interagir com os ácidos nucleicos através de diferentes modos de ligação.

A ligação de moléculas ao DNA pode conduzir a alterações nas propriedades estruturais, afetar a sua transcrição, replicação, expressão de informações genéticas nas células e, assim, influenciar a sua função fisiológica (ZHU et al., 2014; MA et al., 2011). Por conseguinte, essa perturbação na estrutura e função do DNA influencia o modo de crescimento anormal de células cancerosas, podendo causar morte destas células (JAIN e BHATTACHARYA, 2011). Desta forma, o estudo de agentes como potenciais ligantes ao DNA tem sido amplamente utilizado na concepção fármacos quimioterapêuticos, em especial, antitumorais, já que um grande número de moléculas atualmente utilizadas exerce seus efeitos antitumorais por atuação no DNA (HOSSAIN e KUMAR, 2009).

Segundo Zhang e Tang (2004), o grande destaque nessa área é a compreensão da interação das moléculas com o ácido nucleico. Estas moléculas atuam por meio de ligação ao DNA com especificidade e de forma não covalente, graças a presença de grupos funcionais que podem interagir através de forças eletrostáticas.

Geralmente, moléculas variadas podem interagir com o DNA através de três modos: por intercalação entre os pares de bases empilhadas; ligação no sulco principal e secundário do DNA e/ou por interações eletrostáticas (DUSKOVA et al., 2012; ZHANG et al., 2010). A figura 10 apresenta o modo de ligação por intercalação ou nos sulcos do DNA. Forças de natureza 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 fosfato do DNA carregado negativamente (KABIR, HOSSAIN e KUMAR, 2013), o que representa uma propriedade importante na interação de moléculas ao DNA. Dependendo das características estruturais do ligante, muitos podem apresentar mais de um modo de interação com o DNA (STREKOWSKI e WILSON, 2007).

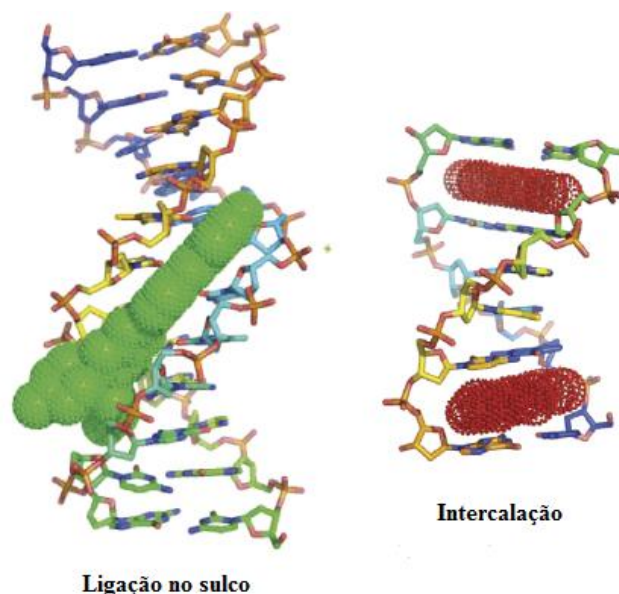


Figura 11. Modos de interação das moléculas com o DNA (PAULCHAUDHUR e HERGENROTHER, 2007).

Atualmente, muita importância tem sido dada a moléculas pequenas provenientes de produtos naturais como alcaloide, por possuírem potencial para formar complexos moleculares com o DNA, além de elevada abundância e toxicidade relativamente baixa (HOSSAIN e KUMAR, 2009). Compostos heterocíclicos são consideradas bons ligantes devido a presença de um ou mais átomo de nitrogênio, com a presença de um par de elétrons localizado (EBRAHIM, HABI, AL-ANSARI, 2013). Interações não covalentes com outras moléculas podem ocorrer através do grupo NH e do empilhamento π - π de elétrons, na porção do anel aromático do indol (SHIMASAKIA et al., 2009), características importantes relatadas para compostos ligantes ao DNA. Derivados benzo[c,d]indol-2-(1H)ona, sem cadeias laterais básicas, foram evidenciados como novos intercaladores de DNA e como agentes antitumorais eficazes (LI et al., 2010).

Uma forma estabelecida para averiguar a capacidade dos compostos químicos de se ligar ao DNA é através da constante de ligação (K_b), útil para comparação entre moléculas com diferenças estruturais. Tais constantes podem ser obtidas através de dados provenientes das análises de espectroscopia de absorção, fluorescência e outras, que são realizadas com os compostos na presença de DNA (JANOVEC et al., 2011; PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007).

Moléculas pequenas de derivados imidazolidínicos, 5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona (NBI); 5-(2-hidrozubenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (HBI); 5-(4-

metoxibenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (MBI) e 5-(3,4-dimetoxibenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (DBI), foram estudados quanto a sua habilidade de ligação ao DNA através da espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis) e os resultados das constantes de ligação (figura 12) revelaram altos valores, sugerindo serem moléculas potenciais como agentes antitumorais, através de ligações nos sulcos do DNA (SHAH et al., 2013).

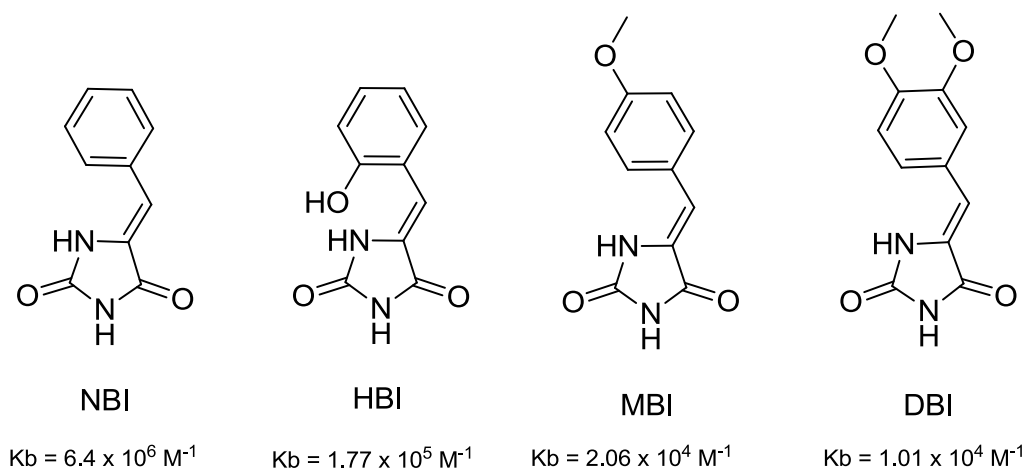


Figura 12. Derivados imidazolidínicos e valores da constante de ligação (Shah et al., 2013).

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 (MAHMOOD, PAUL E LADAME, 2010). Grupamentos metilênicos, em geral, prejudicam a rotação do ligante e diminuem a orientação da molécula no interior do sulco do DNA (PANDYA et al., 2010).

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 (DUSKOVA et al., 2012). Estas alterações, em geral, provocam modificações relevantes nas propriedades de absorção, fluorescência e na viscosidade do complexo ligante-DNA, em comparação com suas características quando livres em solução (GENG et al., 2013), o que torna o monitoramento através de técnicas espectroscópicas imprescindível na avaliação da ligação de moléculas com o DNA (PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007).

3.6.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

A espectroscopia de absorção é uma das técnicas mais úteis em estudos de ligação ao DNA (ANITHA et al., 2013). Alterações observadas no espectro dos compostos na presença de DNA são comparadas com espectro dos compostos livres em solução. Devido a ligação de moléculas ao DNA, o espectro de absorção mostra aumento e/ou diminuição da absorbância máxima, efeitos hipercrômico e hipocrômico, respectivamente (LI et al., 2012). Especificamente, o hiperchromismo origina-se a partir da ruptura da estrutura secundária de cadeia dupla do DNA; enquanto hipochromismo provém da estabilização da dupla hélice do DNA, quer por ligação nos sulcos, intercalação ou por efeito de ligação eletrostática (STREKOWSKI e WILSON, 2007). Espectros de absorção no UV-vis da molécula quando ligados ao DNA podem, ainda, sofrer alteração do comprimento de onda máximo por deslocamento para a região do vermelho ou para a região do azul (MA et al., 2011).

Frequentemente, extenso hipochromismo e forte desvio para o vermelho é considerado uma indicação concreta de intercalação de pequenas moléculas em DNA. A associação destes dois efeitos, em geral, é relacionada a ligação de compostos na hélice do DNA, que envolve uma interação forte de empilhamento entre o cromóforo aromático e os pares de bases de DNA (CHEN et al., 2011). A figura 13, mostra espectro de absorção de derivado 5-metil-5*H*-indol[3,2-*c*]-quinolina com mudanças perceptíveis no pico de absorção máximo com o aumento da concentração de DNA, desvio para o vermelho e efeito hipocrômico (GHOSH e PURKAYASTHA, 2014).

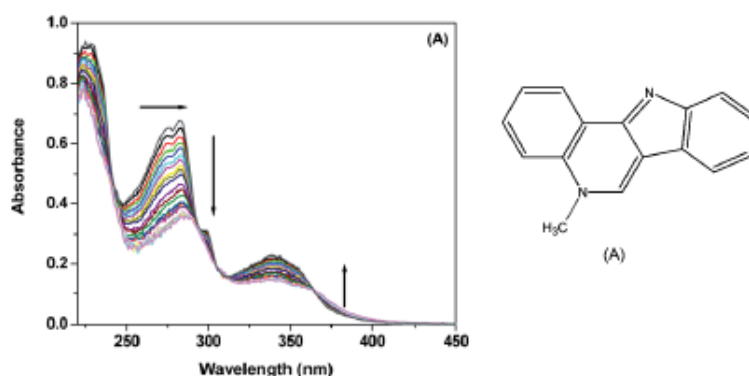


Figura 13. Espectro de absorção de 5-metil-5*H*-indol[3,2-*c*]-quinolina (Ghosh e Purkayastha, 2014).

3.6.2 Espectroscopia de Fluorescência

Interações moleculares variadas podem resultar em extinção 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 (ZHANG, HU E FU, 2012). A figura 14 mostra espectro de fluorescência do complexo DNA na presença de uma substância utilizada pelos chineses como bactericida e antitumoral, a 1,8-dihidroxi-antraquinona, evidenciando a diminuição da emissão fluorescente indicativo da interação com o DNA (QUIAO et al., 2008).

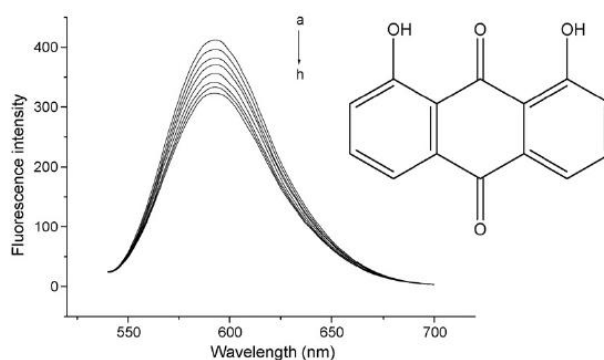


Figura 14. Espectro de fluorescência do complexo DNA na presença de quantidades crescentes (a-h) de 1,8-dihidroxi-antraquinona (Quiao et al., 2008).

3.6.3 Ligações nos Sulcos

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 15), que servem de sítios de ligação para outras moléculas (ALI e BHATTACHARYA, 2014). 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 (IHMEIS e OTTO, 2005), onde a interação com as bases do DNA em ambos os sulcos envolve, em geral, ligação de hidrogênio ou eletrostática (KHAN et al., 2012). Ao contrário de intercaladores, os ligantes nos sulcos não induzem a grandes mudanças de conformação do DNA, contudo, já provaram ser de utilidade na clínica como agentes anticancerígenos e também antibacteriano (PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007).

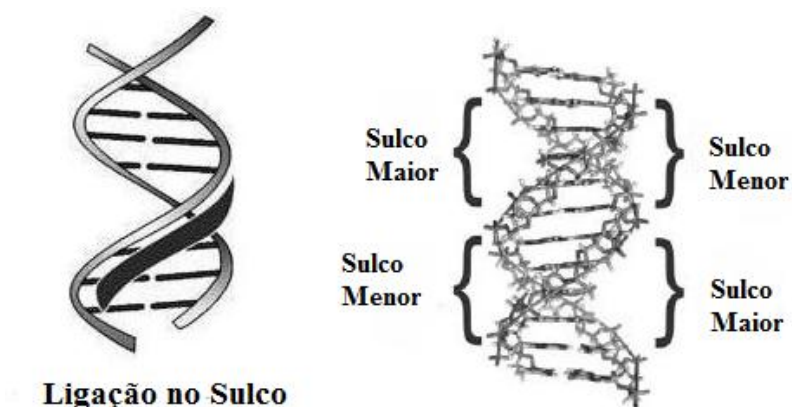


Figura 15. Estrutura do DNA com especificação dos sulcos maior e menor.

Moléculas, geralmente em forma de meia-lua, possuem estrutura apropriada de anéis aromáticos que permite a ligação de hidrogênio com os pares de bases, como observado na Distamicina A, Netropsin e Hoechst 33258. No entanto, derivados de pequenas moléculas, como a substância química Mitomicina e derivado 1-(2-(dimetilamino)etil)benzo[c,d]indol-2(1*H*)-ona (derivado indólico A - Figura 15) manifestam efetiva ligação nos sulcos do DNA associado a atividade antitumoral (YIN et al., 2007). Cadeias laterais com grupos aminas têm sido amplamente utilizadas como grupos essenciais em ligantes de DNA, além de grupos alquilas na tentativa de expandir as estruturas para ligação aos sulcos (LI et al., 2010). Na figura 16 pode ser visto a estrutura química de derivados ligantes nos sulcos.

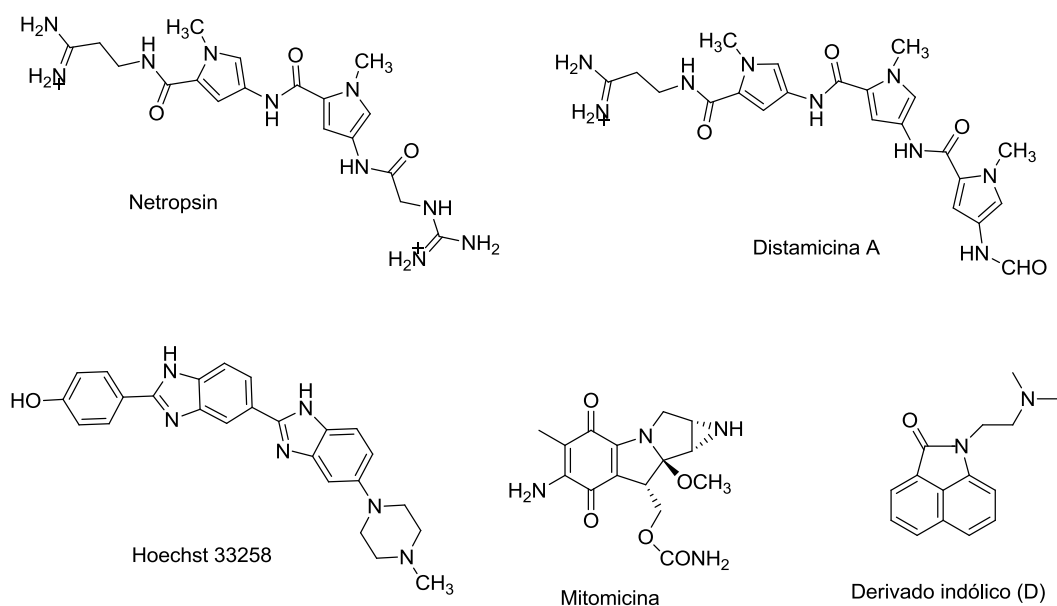


Figura 16. Estrutura química de moléculas ligantes no sulco do DNA.

Derivados químicos com cadeias laterais longas e núcleo indol são conhecidos por sua afinidade de ligação ao DNA, aliado a presença dos grupos NH que orientam ligações de hidrogênio com as bases nos sulcos menores do DNA resultando em valores de constante de ligação em torno de 10^4 - 10^5 , que é relevante ao pequeno tamanho das moléculas e a típica ligação nos sulcos (PANDYA et al., 2010).

3.6.4 Intercalação

Na estrutura do DNA, as bases nucleicas estão localizadas em um arranjo quase no mesmo plano, o que permite a inserção de uma molécula aromática entre os pares de bases, com capacidade de se ligar firmemente, porém de maneira reversível (IHMEIS e OTTO, 2005). A ligação por intercalação envolve a inserção de uma molécula planar entre os pares de bases, o que resulta em uma diminuição da torção helicoidal, desenrolamento e o alongamento da macromolécula, diferentemente da ligação no sulco (STREKOWSKI e WILSON, 2007). Este modo de interação é diretamente afetado pela substituição da ligação de hidrogênio entre os pares de bases por novas ligações formadas entre o ligante e as bases (GHOSH et al., 2014), conduzindo a uma forma de ligação mais eficaz e eficiente.

Apesar da intercalação ser, tradicionalmente, associada a moléculas com estruturas de anéis fundidos, intercaladores atípicos com sistemas de anéis não fundidos são também reconhecidos como capazes de interagir por meio de intercalação (SNYDER, 2007). Compostos intercaladores clássicos com estrutura aromática fundida e intercaladores atípicos são mostrados na figura 16. Compostos análogos da acridina, como amsacrina, são uma classe de compostos quimioterapêuticos amplamente estudados com atividade antitumoral, antimalária, antituberculostático, antibacteriano e antiviral, que possuem um farmacóforo planar aromático potencialmente intercalante entre os pares de bases (KUMAR, KAUR, KUMARI, 2012). Derivados 5-acridin-9-ilmetilideno-3-amino-2-tioxi-tiazolidina-4-ona (LPSF/AC-127) e 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxi-tiazolidina-4-ona (LPSF/AC-157), por exemplo, foram sintetizados e avaliados quanto a capacidade de interação com o DNA, demonstrando que enquanto o grupo planar da acridina se intercala entre as bases, os grupamentos laterais da tiazolidina e imidazolidina estariam formando ligações de hidrogênio nos sulcos do DNA (LAFAYETTE et al., 2013).

Prodigiosin (Figura 17) é um pigmento natural produzido por *Streptomyces*, que apesar da estrutura não planar de anéis fundidos, demonstrou propriedades imunossupressora e antitumoral potente (PEREZ-TOMAS et al., 2003), por causa da intercalação ao DNA, sendo

investigado também como inibidor de topoisomerases. Derivados benzo[*c,d*]indol-2(1*H*)-ona foram sintetizados e analisados com diferentes substituintes, evidenciando maior participação do grupo diciano (derivado indólico B), o qual reduziu a densidade eletrônica e contribuiu para a intercalação do derivado ao DNA, com constante de ligação de $1,65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (RESCEFINA et al., 2014). Outros compostos contendo o núcleo indol, como condensados a quinolina, também evidenciaram serem bons ligantes ao DNA, se intercalando mais eficientemente quando na presença de átomos de cloro no anel indólico (derivado indólico C) (GHOSH e PURKAYASTHA, 2014).

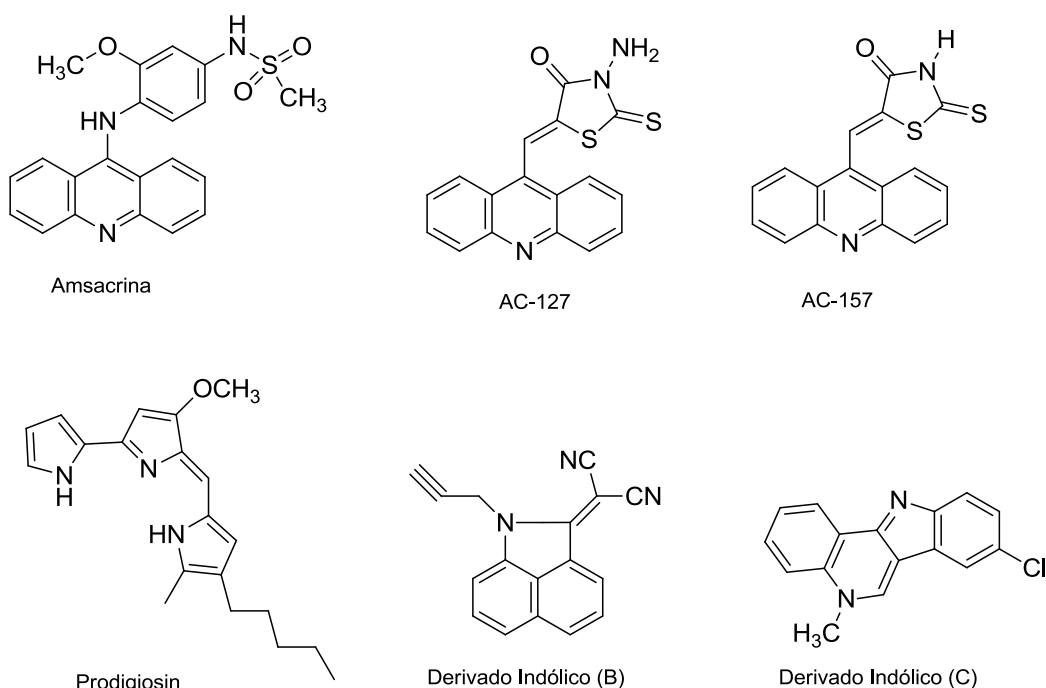


Figura 17. Estrutura química de compostos intercaladores ao DNA.

3.7 Atividade Anti-topoisomerase

As topoisomerases 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; GENTRY et al., 2011). As topoisomerasas são, assim, enzimas essenciais que medeiam alterações na topologia da dupla hélice do DNA (MARTÍNEZ e CHACÓN-GARCÍA, 2005), responsáveis pela regulação do DNA superenrolado.

As duas grandes classes de topoisomerase, tipo I (topo I) e tipo II (topo II), apresentam o mesmo mecanismo catalítico, através do ataque nucleofílico por um resíduo tirosil à ligação fosfodiéster do DNA (POMMIER, 2009); porém, são classificadas principalmente pela clivagem das cadeias simples ou da dupla cadeia do DNA (SHERER e SNAPE, 2015): topo I atua por quebra de uma única fita, enquanto que a topo II quebra as duas fitas. 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 que 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; DRWAL et al., 2011).

Antitumorais podem atuar diretamente no DNA das células, ou indiretamente por inibição de funções metabólicas do DNA, tal como: sobre a enzima topoisomerase I. A topo I rompe uma cadeia única de DNA através do ataque nucleofílico do grupo hidroxil do sítio ativo da tirosina com o grupo fosfato da coluna fosfodiéster do DNA (POMMIER et al., 2009). Nesta fase, a enzima é particularmente vulnerável a um grupo de agentes antitumorais que reversivelmente prende o complexo por um intercalado entre as pares de bases do DNA no local da clivagem (venenos), desse modo inibindo a religação (DRWAL et al., 2011). Geralmente, em várias células tumorais, a topoisomerase I é muito mais expressa do que em células normais, por isso, a modulação do níveis de topo I poderia ser um tratamento terapêutico essencial para o câncer (REINHOLD et al., 2010).

Os compostos que inibem a topoisomerase I podem ser divididos em duas categorias: (a) supressores da topoisomerase I, que são os compostos que inibem a enzima, mas não estabilizam o complexo covalente DNA-topoisomerase I; e (b) venenos topoisomerasas, que atuam posteriormente a clivagem do DNA através da inibição da re-ligação. A camptotecina, um alcaloide extraído e isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata*, deu origem aos conhecidos Irinotecan e Topotecan, que atuam como inibidores da topoisomerase I (BRANDÃO et al., 2010). Tais compostos, 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). Um modelo do complexo ternário correspondente ao topotecano-DNA-topoisomerase é mostrado na figura 18.

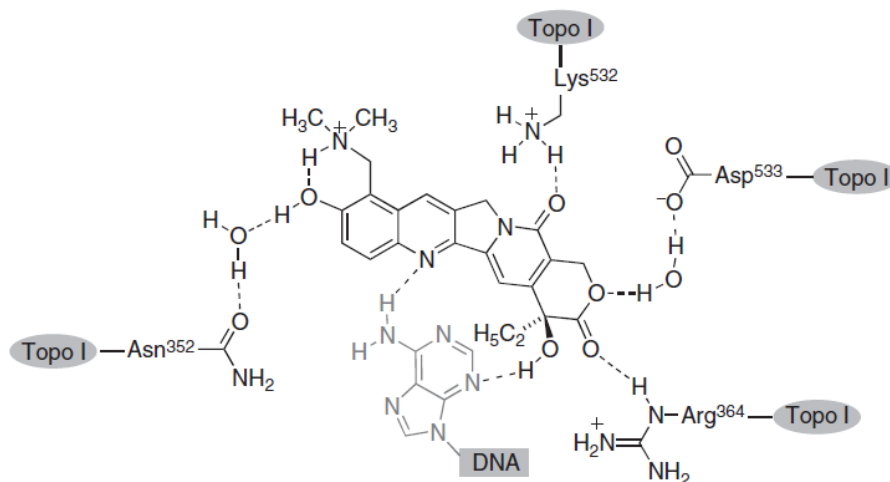


Figura 18. Complexo ternário correspondente ao topotecano-DNA-topoisomerase (AVENDAÑO e MENENDEZ, 2008).

Compostos pirazois indolicos receberam considerável atenção devida as suas propriedades anti-cancerígenas significativa, com forte inibição da atividade da enzima topoisomerase I e II (JI et al., 2013). A rebecamicina e derivados análogos são compostos indolocarbazois, que incluem moléculas intercalantes de DNA e inibidores da topoisomerase I (SANCHEZ et al., 2006; PRUDHOMME, 2000), além de apresentarem atividade inibitória sobre proteína-quinases, como a proteína quinase C (PCK) (WOO et al., 2002).

Uma série de derivados 3,5-disubstituído hidantoina (1,3-imidazolidinodiona) têm recebido atenção na descoberta de novos fármacos, devido ao efeito inibidor seletivo contra linhagens de células de câncer de colo do útero, de mama, pancreático, de pulmão e carcinoma de cólon (AZIZMOHAMMADI et al., 2013): além de, atividade inibitória moderada da topoisomerase I (MAJUMDAR et al., 2015).

*AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM O DNA DE NOVOS
DERIVADOS INDÓLICOS, ANÁLISE DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL IN VITRO E ANTITOPISOMERASE*

4. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM O DNA DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS, ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E ANTITOPISOMERASE

Moléculas derivadas de heterocíclicos se destacam entre o grande arsenal de compostos protótipos para obtenção de novos fármacos. Neste contexto, o sistema heterocíclico aromático do indol é altamente reativo e apresenta uma diversidade de atividades biológicas atribuído ao núcleo indol. Compostos derivados de tiazolidina e imidazolidina representam, também, uma classe de compostos de grande interesse científico, devido a suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades biológicas. O planejamento estrutural na síntese dos novos derivados indólicos foi idealizada com porções distintas do núcleo indol, tiazolidina e imidazolidina em duas posições de ligação diferentes. Os derivados indólicos tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas convencionais, além de técnicas bidimensionais, que auxiliam numa melhor qualidade de informações para caracterização estrutural. Inicialmente, os derivados foram analisados quanto a sua capacidade de interagir com a molécula do DNA, através de técnicas de espectroscopia de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência, que permitiu determinar a constante de ligação dos derivados indólicos com o DNA. A avaliação antitumoral *in vitro* foi realizada por meio do ensaio antiproliferativo, com algumas linhagens de células cancerígenas. Ao final, os dois compostos que se destacaram dentre as análises realizadas, foram submetidos a avaliação da inibição da enzima topoisomerase I, a fim de aumentar o conhecimento sobre o possível mecanismo de ação dos derivados indólicos. Os resultados deste estudo, confirmam que o núcleo indol é uma classe de compostos com potencial capacidade de interação com o DNA e atividade antitumoral. Aliado a presença de heterocíclicos como a tiazolidina, são compostos importantes no desenvolvimento de moléculas candidatas a novos fármacos.

4.1 METODOLOGIA - QUÍMICA

4.1.1 Materiais e Equipamentos

Os reagentes comuns utilizados para a síntese e análise dos derivados indólicos foram 1*H*-indol-3-carbaldeído e 5-Bromo-1*H*-indol-3-carbaldeído, 3-Amino-2-tioxo-tiazolidina-4-ona, 2-tioxo-tiazolidina-4-ona, 2-tioxo-imidazolidina-4-ona. Como solventes: tioureia, etanol,

metanol, dimetilsulfoxido (DMSO), ácido acético, acetato de etila, n-hexano e morfolina. Todos, reagentes e solventes, fornecidos pela Sigma, Aldrich, Fluka e Merck..

Na cromatografia de camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel F254 da Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Na determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho em tubo capilar Modelo Quimis 340.27 (Quimis, Brasil). Para caracterização estrutural dos compostos químicos foi utilizado: Espectroscopia de Infra-Vermelho (IR), registrados num espectrometro Bruker IFS66 (Bruker, Alemanha), pastilha de KBr; Espectrometria de Massas realizado num espectrometro de massa de ionização por dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (MALDI-TOF-EM), no modelo Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA); Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C) realizados em Modelo Varian Plus Spectrofotometro (Varian, EUA) a 300 MHz e 400 MHz, em solvente DMSO-d6.

4.1.2 Procedimentos experimentais

4.1.2.1 Síntese da Tiazolidina-2,4-diona

Em um balão de fundo redondo adicionou-se tioureia (5g - 0.0658 mols) e ácido monocloroacético (6.35g - 0.00673 mols) previamente dissolvidos em água. Aqueceu-se a mistura a uma temperatura de 96 °C por 18 horas. Em seguida, deixou-se o produto obtido em repouso por 24 horas na geladeira. Formaram-se cristais brancos correspondentes a tiazolidina-2,4-diona, cuja purificação foi realizada através de cristalizações sucessivas em água destilada.

4.1.2.2 Metodologia de obtenção dos derivados indólicos Lqit/SEs

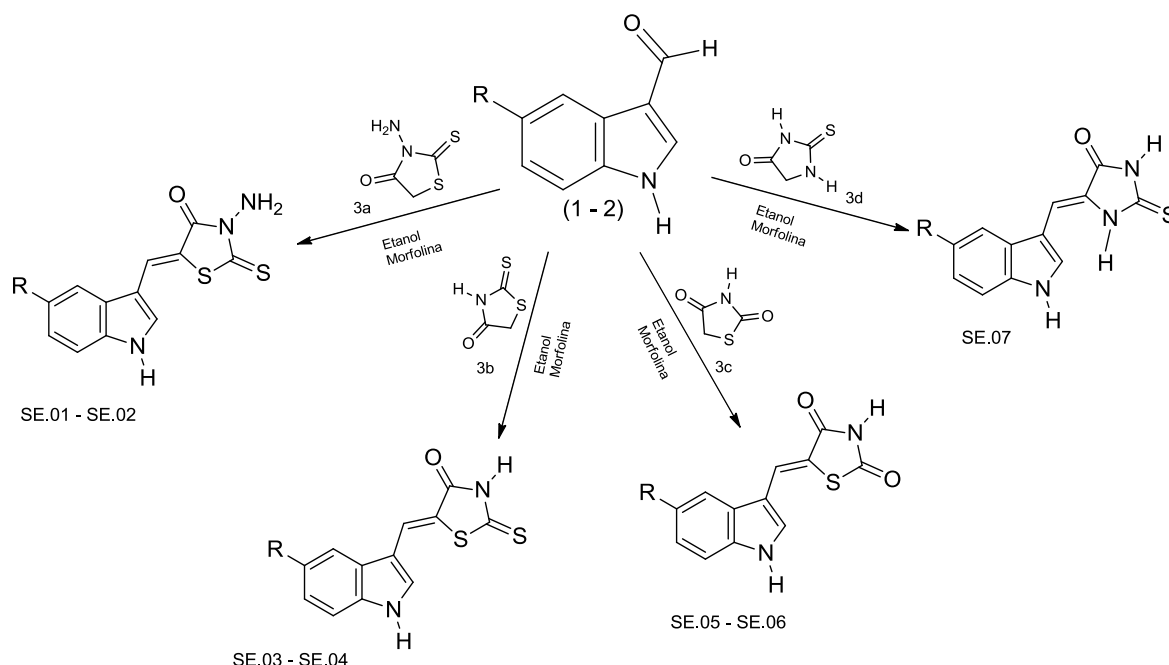
Por estratégia de hibridação molecular, objetivamos a união de núcleos moleculares já estudados em atividades biológicas diversas, para obtenção de novos derivados orgânicos com anel indol e substituintes divergentes, com o propósito de investigar a capacidade destes novos derivados de interagir com o DNA.

A síntese dos derivados foi realizada de acordo com o esquema 8. Dois grupos indólicos, 1*H*-indol-3-carbaldeído (1) e 5-Bromo-1*H*-indol-3-carbaldeído (2) (*Sigma-Aldrich*) foram utilizados como núcleo principal para inserção dos substituintes 3-Amino-2-tioxo-

tiazolidin-4-ona (3a), 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (3b), Tiazolidina-2,4-diona (3c) e 2-tioxo-imidazolidin-4-ona (3d). Com exceção da tiazolidina-2,4-diona, que foi sintetizado em nosso laboratório, os demais substituintes foram obtidos comercialmente (*Sigma-Aldrich*).

Os núcleos indólicos (1 e 2) foram tratados com cada grupo de substituinte (3a, 3b, 3c e 3d) em proporções equimolares. Antecedente a este processo reacional, os grupos 3a, 3b, 3c e 3d foram solubilizados em etanol, na presença da morfolina e deixados sob temperatura de 70 °C e agitação durante 10 minutos. Após isto, os indóis foram adicionados ao sistema reacional para completa obtenção dos novos derivados. Em todas as reações, observou-se mudança de coloração logo após adição dos indóis e, após cerca de 20 minutos, iniciou-se a formação de precipitado.

A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) para verificar a formação do produto e finalização da reação. Em geral, a reação procedeu por cerca de 1 hora. Finalizada a reação, os produtos foram filtrados e submetidos a purificação através de lavagens sucessivas com etanol. A caracterização dos derivados sintetizados foi verificada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas.



Esquema 8. Síntese dos derivados indólicos Lqit/SEs

Reagentes e condições: 1H-indol-3-carbaldeído (1); 5-Bromo-1H-indol-3-carbaldeído (2); 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (3a); 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (3b); tiazolidina-2,4-diona (3c) e 2-tioxo-imidazolidin-4-ona (3d); refluxo, 70° C.

Síntese do 3-Amino-5-(1H-indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (Lqit/SE.01): A mistura de 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.2 g, 1.349 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.1958g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foram mantidos sob agitação por 60 minutos a uma temperatura de 70 °C.

Síntese do 3-Amino-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (Lqit/SE.02): 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.2 g, 1.349 mmol), 5-Bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.302g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foram utilizados para a obtenção do derivado, a mistura reacional foi mantida a temperatura de 70 °C durante 60 minutos, com agitação.

Síntese do 5-(1H-indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (Lqit/SE.03): 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.2 g, 1.501 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.217g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foram mantidos a temperatura de 70 °C sob agitação durante 60 minutos.

Síntese do 5-(5-Bromo-1H-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (Lqit/SE.04): A mistura de 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.2 g, 1.501 mmol), 5-Bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.3362g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foi mantida por 60 minutos sob agitação e temperatura de 70 °C.

Síntese do 5-(1H-Indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (Lqit/SE.05): A mistura de tiazolidina-2,4-diona (0.2 g, 1.709 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.2478g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foi mantida sob agitação, temperatura de 70° C durante 60 minutos.

Síntese do 5-(5-Bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (Lqit/SE.06): Tiazolidina-2,4-diona (0.2 g, 1.709 mmol), 5-Bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.3826g), etanol (20 mL) e morfolina (15 gotas) foram utilizados para a síntese de obtenção do derivado, a mistura reacional foi mantida a temperatura de 70 °C, sob agitação durante 60 minutos.

Síntese do 5-(1H-Indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (Lqit/SE.07): 2-tioxo-imidazolidin-4-ona (0.2 g, 1.722 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.2499g), etanol (20 mL)

e morfolina (15 gotas) foram utilizados na síntese, sob agitação e temperatura de 70 °C por 60 minutos.

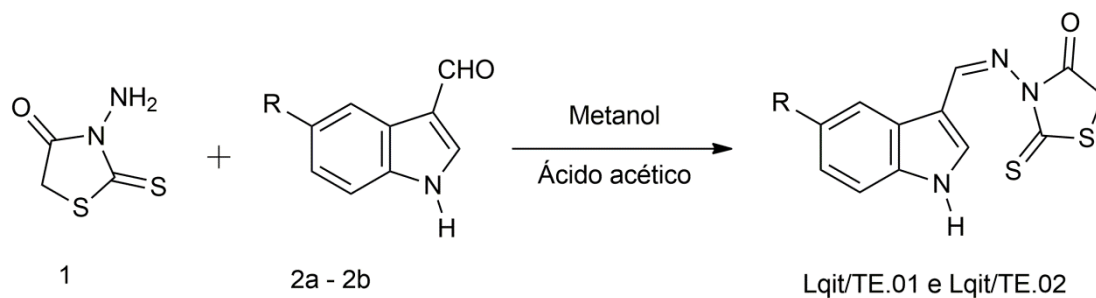
4.1.2.3 Metodologia de obtenção dos derivados indólicos Lqit/TEs

Série 3-((1H-indol-3-il-metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02)

Inicialmente, dois derivados da série 3-((1H-indol-3-il-metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona foram sintetizados, a partir da reação do 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (1) com o 1H-indol-3-carbaldeído (2a) e o 5-Bromo-1H-indol-3-carbaldeído (2b) (esquema 9). Na proporção molar de 1:1, os dois reagentes foram solubilizados em metanol, submetidos a agitação. Após total solubilização, foi acrescentado catalisador ácido acético, mantendo a agitação e em temperatura ambiente. Após 10 minutos de reação observou-se a formação de precipitados nas reações.

A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) para verificar a formação do produto e finalização da reação. Em geral, a reação procedeu por cerca de 4 hora. Finalizada a reação, os produtos foram filtrados e submetidos a purificação através de lavagens sucessivas com metanol.

A pureza dos derivados sintetizados foi verificada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , espectroscopia de massa e infravermelho.



Esquema 9. Síntese dos derivados da série 3-((1H-indol-3-il-metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.01 - Lqit/TE.02)

Reagentes e condições: 3-amino-2-tioxo-tiazolidina-4-ona (1); 1H-indol-3-carbaldeído (2a); 5-Bromo-1H-indol-3-carbaldeído (2b); temperatura ambiente.

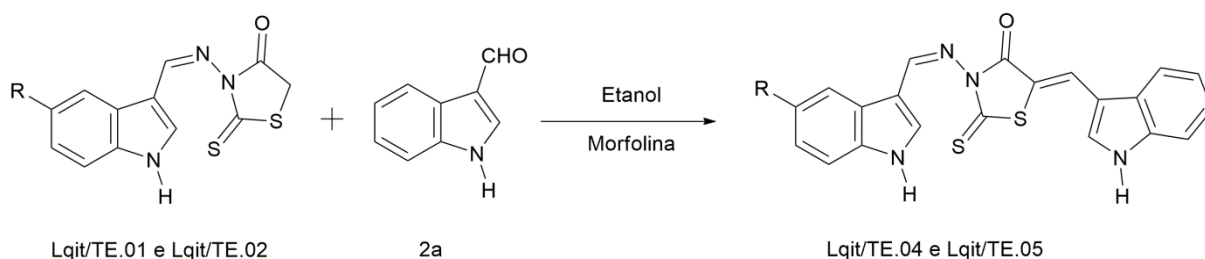
3-(((1H-indol-3-il)metileno)amino)2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.01): A mistura de 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.3 g, 2.0244 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.2938g), metanol (20 mL) e ácido acético (20 gotas) foram mantidos sob agitação por 60 minutos a temperatura ambiente.

3-(((5-Bromo-1H-indol-3-il)metileno)amino)2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.02): 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (0.3 g, 2.0244 mmol), 5-Bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.4535g), metanol (20 mL) e ácido acético (20 gotas) foram utilizados para a obtenção do derivado, em que a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por 60 minutos.

Série 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-((1H-indol-3-il-metileno)-amino)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05)

Após síntese e caracterização dos derivados Lqit/TE.01 (3a) e Lqit/TE.02 (3b), ambos foram utilizados como intermediários para a obtenção de dois novos compostos da série 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-((1H-indol-3-il-metileno)-amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05). Os intermediários Lqit/TE.01 (3a) e Lqit/TE.02 (3b) foram submetidos a reação com 1H-indol-3-carbaldeído, na proporção molar de 1:1 (esquema 10). Inicialmente, os reagentes foram solubilizados em etanol sob agitação e temperatura de 70° C e mantidos por 15 minutos. Decorrido este tempo, foi acrescentado a morfolina como catalisador da reação. Aproximadamente, após cerca de 40 minutos observou-se formação de precipitação na reação.

A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) para verificar a formação do produto e finalização da reação. Em geral, a reação procedeu por cerca de 24 horas. Finalizada a reação, os produtos foram filtrados e submetidos a purificação através de lavagens sucessivas com etanol. A pureza dos derivados sintetizados foi verificada por RMN de ¹H, RMN de ¹³C, espectroscopia de massa e infravermelho.



Esquema 10. Síntese dos derivados da série 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-((1H-indol-3-il-metileno)-amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05)

Reagentes e condições: Lqit/TE.01 (3a) e Lqit/TE.02 (3b); 1H-indol-3-carbaldeído (2a); refluxo; temperatura 70° C.

5-((1H-indol-3-il)metileno)-3-((1H-indol-3-il)metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona

(*Lqit/TE.04*): A mistura do intermediário *Lqit/TE.01* (0.3 g, 1.1 mmol), 1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.1595g), etanol (20 mL) e morfolina (20 gotas) foram mantidos sob agitação por 24 horas a temperatura de 70° C.

5-((1H-indol-3-il)metileno)-3-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)amino)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona

(*Lqit/TE.05*): O intermediário *Lqit/TE.02* (0.3 g, 0.849 mmol), 1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.124g), etanol (20 mL) e morfolina (20 gotas) foram utilizados para a obtenção do derivado, em que a mistura reacional foi mantida a temperatura de 70° C e sob agitação por 24 horas.

4.2 METODOLOGIA - ANTI-PROLIFERATIVO

4.2.1 Antiproliferativo por Ensaio de MTT dos derivados *Lqit/SEs*

As citotoxicidades dos compostos foram testados contra quatro linhagens de células tumorais humanas: T47D e MCF7 (ambos são de câncer de mama humano), HL60 / MX1 (leucemia promielocítica aguda) e K562 (leucemia mieloide crônica). Todas as linhagens de células foram obtidas a partir do banco de tecido celular do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 - Instituto Memorial Parque Roswell 1640, Invitrogen Biosciences), suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal, Invitrogen Biosciences), glutamina 2 mM, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina a 37° C com 5% de CO₂.

Para o ensaio citotóxico, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP), na concentração de 1×10^4 / poço e 24 horas depois os compostos foram analisados em três concentrações diferentes: 1, 10 e 50 µM, diluídos em 0,1% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma). Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com as mesmas condições dos grupos experimentais.

O crescimento de células tumorais foi quantificada através da capacidade de células vivas em reduzir o corante amarelo brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) a um produto de formazan azul, enquanto segue. No final de 72 horas de incubação com os compostos, o MTT é adicionado em cada poço a uma concentração de 0,5 mg/mL, seguido pela adição de 20% de SDS (dodecilsulfato de sódio) durante a dissolução do precipitado, 3 horas mais tarde. A sobrevivência celular foi identificada após 24 horas por quantificar a intensidade de cor por medição da absorbância no

comprimento de onda de 570 nm, num espectrofotômetro de microplacas (EL808, Bio-Tek, USA).

4.2.2 Antiproliferativo por Ensaio de Sulforrodamina B dos derivados Lqit/TEs

Nove linhagens de células de câncer humano: U251 (glioma, SNC), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência à múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), HT-29 (adenocarcinoma do cólon) e K-562 (leucemia mieloide crônica), e uma linhagem de célula normal HaCat (queratinócitos humanos) foram gentilmente cedidas pelo Centro de Desenvolvimento e Pesquisa de câncer Frederick, Instituto Nacional de Câncer, Frederick, MA, EUA. As culturas de reserva foram cultivadas em 5 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com soro de bovino fetal a 5% (FBS, Gibco BRL). penicilina: mistura de estreptomicina 1000 U/mL: 1000 µg/mL (1mL/L de meio RPMI-1640) foi adicionado a culturas experimentais. As células em placas de 96 poços foram expostas a diferentes concentrações de amostras (0.25, 2.5, 25 e 250 µg/mL em DMSO/meio RPMI/FBS a 5% em 37° C, 5% de CO₂, durante 48h. As células foram então fixadas com solução de ácido tricloroacético (50%, v/v) e a proliferação de células foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular utilizando o ensaio de sulforrodamina B (MONKS et al., 1991). A doxorubicina (DOX; 0.025-25 µg/mL) foi utilizadas como um controle positivo. Obtiveram três medições: no início da incubação (T₀) e 48h pós-incubação durante livre de compostos (C) e as células testadas (T).

A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação:

$$\text{Proliferação celular} = 100 \times [(T - T_0) / C - T_0] \quad (1)$$

O efeito citostático foi observada quando $T_0 \leq T < C$, enquanto que o efeito citocida ocorreu quanto $T < T_0$. A partir da curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, os valores de GI₅₀, TGI e LC₅₀ foram determinados através de análise de regressão não-linear utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3. METODOLOGIA - ENSAIO COM O DNA

4.3.1 Materiais e Equipamentos

Foi utilizado solvente DMSO na preparação das soluções mãe e tampão Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6) na análise das interações com DNA. DNA de timo de bovino (ctDNA) e brometo de etídio (BE) foram obtidos da Sigma Aldrich. Os aparelhos empregados na análise de obtenção dos espectros de Ultravioleta-visível (UV-vis) e de emissão de fluorescência foram o Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO e o Espectrofluorímetro de JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão), respectivamente.

4.3.2 Experimentos de ligação com o DNA

4.3.2.1 Preparação de ct-DNA

Titulações de espectros UV-Vis foram desenvolvidas utilizando tampão Tris 0,01 M, pH 7,6. DNA de timo de bovino (ctDNA) foi comprado na Sigma e utilizado sem purificação adicional. A solução de ctDNA em tampão Tris foi sonicada durante 5 min e a concentração foi determinada utilizando os coeficientes de extinção molares $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (WOLF et al., 1987). A pureza do DNA foi determinada através da monitorização do valor da relação de A_{260} / A_{280} .

4.3.2.2. Espectroscopia de absorção eletrônica

Todos os derivados indólicos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução-mãe) a partir do qual as soluções de trabalho foram preparadas por diluição utilizando tampão Tris-HCl, com concentrações entre 10 e 80 μM .

Sob concentração otimizada, os compostos foram expostos a concentrações crescentes do ctDNA. Antes das medições, o sistema foi agitado e incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. As medições foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento do percurso de 1cm.

A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida por ajuste dos dados à equação 1 (MCGEE AND VON HIPPEL, 1974):

$$[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (2)$$

onde, E_a , E_b e E_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. O gráfico da $[\text{DNA}]/(E_a - E_f)$ versus $[\text{DNA}]$ foi utilizado para obtenção do K_b a partir da razão entre a inclinação e o intercepto. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

4.3.2.3 Estudo de deslocamento do Brometo de Etídio com os derivados Lqit/SEs

Ligação do brometo de etídio com ctDNA

Os espectros de fluorescência do BE foram medidos na ausência e na presença de ctDNA, na concentração de 10 μM de BE e 100 μM de ctDNA, em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6.

Todas as medições foram realizadas a 24 °C em uma cubeta de quartzo retangular com caminho óptico de 1 cm. Os espectros de fluorescência foram obtidos por excitação em 526 nm e varredura da emissão de 550 a 700 nm. A largura das fendas de excitação e de emissão foram 2,5 e 5, respectivamente, com velocidade de 100nm/min.

Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software de SigmaPot 10.0.

Ligação dos derivados indólicos com complexo BE-ctDNA

Soluções contendo EB (10 μM) e ctDNA (100 μM) foram preparadas na presença dos derivados indólicos nas concentrações de 20 a 200 μM , em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6. As soluções foram deixadas de repouso por 10 minutos para atingir o equilíbrio, e posteriormente submetidas a análise da fluorescência. Todas as medições foram realizadas a 24 °C em uma cubeta de quartzo retangular com caminho óptico de 1 cm.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um comprimento de onda de excitação em 526 nm e varredura de emissão de 550 a 700 nm. Os mesmos parâmetros foram utilizados descritos previamente foram utilizados neste ensaio.

O comportamento de supressão de emissão foi analisado através da equação 2 de Stern-Volmer (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006):

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença dos derivados indóis. K_{sv} é a constante de supressão linear. $[Q]$ representa a concentração do composto. O gráfico da intensidade emissão relativa (F_0/F) versus $[Q]$ foi utilizado para obtenção da constante a partir da regressão linear do gráfico.

Os dados de ligação foram obtidos a partir do software de SigmaPlot 10.0.

4.3.2.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência dos derivados Lqit/TEs

As medições de fluorescência dos derivados indólicos Lqit/TEs foram realizadas em solução de concentrações 15 μM em tampão Tris 0,01M, pH 7,6. Espectros de emissão foram registrados na região de 310-700 nm usando um comprimento de onda de excitação de 220nm-320nm, com bandas de excitação e de emissão de 5nm e 5nm, e sensibilidade alta. Todas as medições foram realizadas a 25° C em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de caminho de 1 cm. As intensidades de fluorescência foram expressos em unidades arbitrárias. As titulações de fluorescência foram realizadas por adição de quantidades crescentes de ctDNA (0-100 μM) diretamente dentro da solução contendo os derivados. Intensidades de fluorescência dos compostos exposto a diferentes concentrações de ctDNA foram usadas para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), pela seguinte equação (LAKOWICZ, 2006):

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário de compostos na ausência e na presença de inibidor (ctDNA), K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração de inibidor.

4.4 METODOLOGIA - ANTITOPISOMERASE

Para avaliar se os compostos indólicos Lqit/SE.01 e Lqit/TE.04 produzidos inibem a atividade da topoisomerase, uma mistura de 100 ng de DNA de plasmídeo PUC19 (*Sigma*) e 1 unidade da topoisomerase I humana recombinante (TOP1 7150 - *Sigma*) foram incubados na presença ou ausência dos composto químicos. A mistura foi incubada a 37° C por 45 minutos em tampão B (0,01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0,05 M KCl, 5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de Na₂EDTA, 0,01% de albumina bovina). As concentrações dos derivados indólicos testadas foram de 10 e 50 µM. As amostras de DNA foram, então, submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% a 7V/cm por 2 horas com um tampão de corrida SB (NaOH e ácido bórico). Após este período, as bandas foram coradas com brometo de etídio (1mg / mL) e fotografado sob luz UV. A análise quantitativa das bandas de gel (DNA relaxado e super-enrolado) da análise de inibição da topoisomerase I foi realizado utilizando o software de processamento de imagem (Adobe Photoshop CS4 11.0x2007, San José, CA, EUA).

4.5 METODOLOGIA - Determinação do valor de log P

Os valores de log P dos derivados foram obtidos usando o programa ChemSketch 12.0 Desenvolvimento Químico Avançado.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO - QUÍMICA

A rota de síntese dos compostos indólicos Lqit/SEs e Lqit/TEs mostrou-se eficaz, pois os derivados foram obtidos com êxito e sem a necessidade de purificação por cromatografia em coluna, sendo necessário apenas etapas de lavagens e recristalização.

4.6.1 Mecanismo Reacional da Síntese dos Derivados indólicos Lqit/SEs

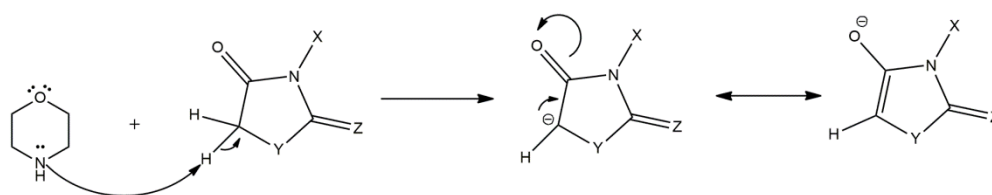
As etapas da reação de obtenção dos derivados indólicos é mostrada no esquema 11. Na 1ª etapa, ocorre a retirada do hidrogênio metilênico dos compostos 3-Amino-2-tioxi-tiazolidin-4-ona (3a); 2-tioxi-tiazolidin-4-ona (3b); Tiazolidina-2,4-diona (3c); e 2-tioxi-imidazolidin-4-ona (3d), através da morfolina que atua como base, levando a formação do carbânion.

O carbânion metilênico comporta-se como um nucleófilo e as reações se processam normalmente em presença de uma base, onde os anéis 3a, 3b, 3c e 3d reagem como um ânion. A seguir, o carbânion é estabilizado através do equilíbrio (efeito de ressonância), formando dupla ligação entre os carbonos do anel e carga negativa no oxigênio.

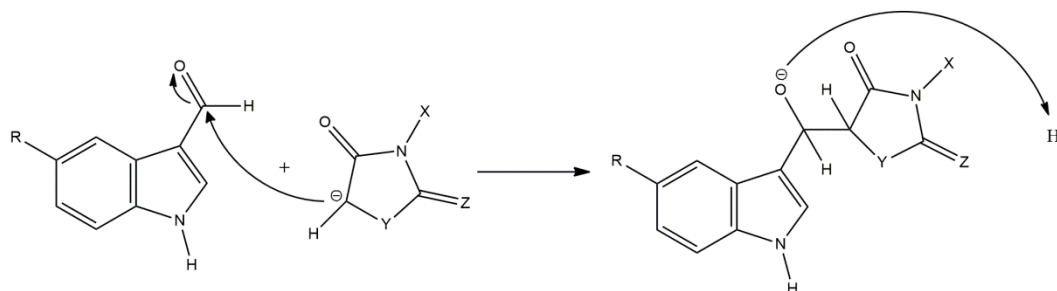
Na etapa posterior, 2ª etapa, ocorre o processo de condensação (condensação de Knoevenagel) através do ataque do carbânion ao carbono alfa da carbonila do aldeído, que tem sobre si uma carga parcial positiva, resultante do efeito indutivo provocado pelo átomo de oxigênio. No ataque ao carbono da carbonila, os elétrons π da dupla ligação são transferidos para o oxigênio eletronegativo, o mesmo capta um próton e conduz a formação de um intermediário.

Na 3ª etapa, ocorre uma reação intramolecular, com desprotonação pela ação da hidroxila da molécula, conduzindo a formação do carbânion na posição 5 do anel. Com o processo de desidratação (eliminação de água), procede-se, concomitantemente, a formação da dupla exocíclica, finalizando a obtenção dos novos derivados indólicos.

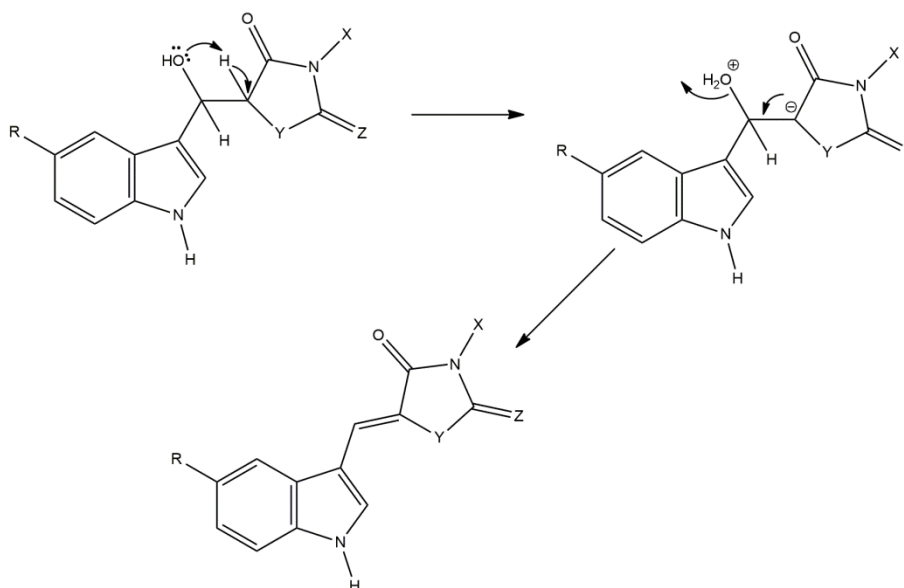
1ª Etapa: Formação do carbânion por ação da morfolina



2ª Etapa: Condensação através do ataque do carbânion ao carbono alfa da carbonila



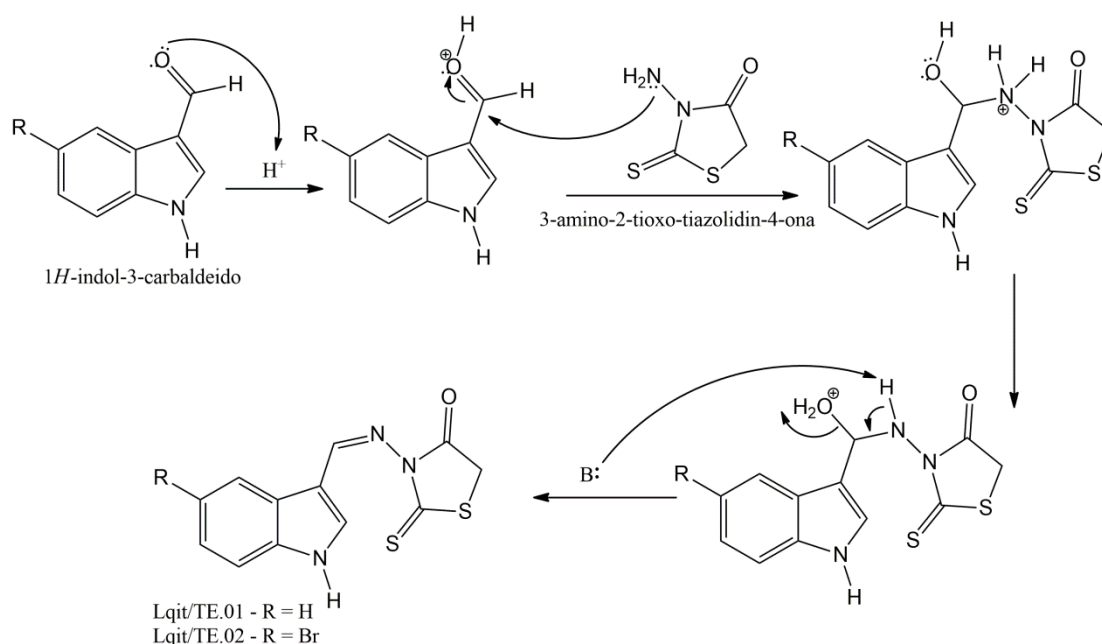
3ª Etapa: Reação intramolecular com eliminação de água e formação da dupla exocíclica



Esquema 11. Etapas do mecanismo reacional de obtenção dos derivados Lqit/SEs

4.6.2 Mecanismo Reacional da Síntese dos Derivados Lqit/TEs

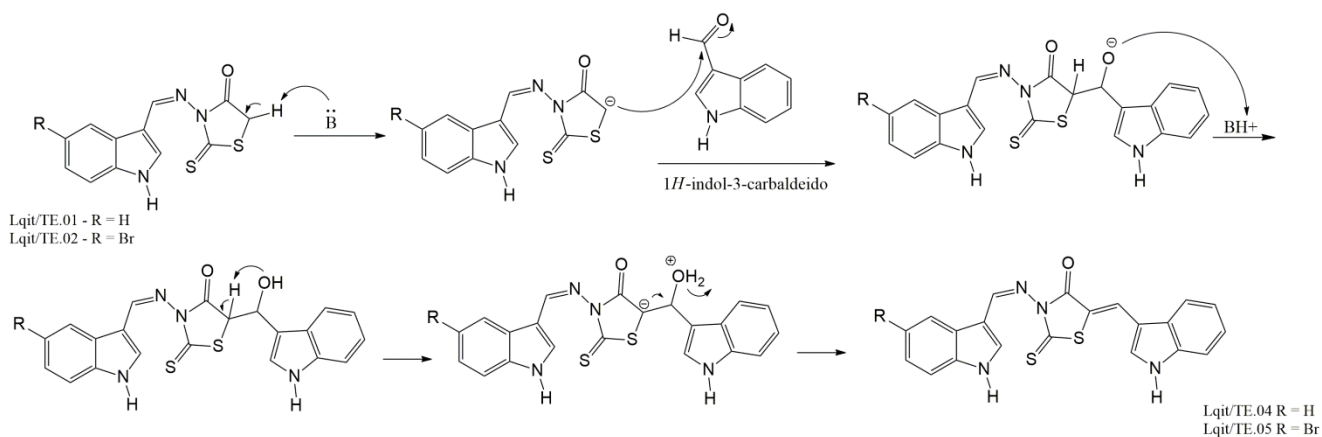
A reação inicial de obtenção dos derivados Lqit/TE.01 e TE.02 apresenta o mecanismo reacional demonstrado no esquema 12. O meio ácido da reação, devido a presença do ácido acético, conduz a protonação da carbonila do grupo aldeído no núcleo indol, o que proporciona um maior caráter parcial positivo ao carbono da carbonila. Posteriormente, o nitrogênio do grupo amino livre da 3-amino-2-tioxo-tiazolidin-4-ona atua como um nucleófilo e ataca o carbono da carbonila, deslocando o par de elétrons da ligação π para o átomo de oxigênio protonado. O átomo de oxigênio desprotona o nitrogênio, o que favorece a formação de um bom grupo de saída, a molécula de água. A saída da água ocorre, simultaneamente, com a desprotonação do nitrogênio e, formação da ligação π carbono-nitrogênio, finalizando na formação dos derivados Lqit/TE.01 e TE.02.



Esquema 12. Mecanismo reacional da formação dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02

Os derivados Lqit/TE.01 e TE.02 sintetizados inicialmente, foram submetidos a reação com 1H-indol-3-carbaldeído em meio básico, para obtenção dos derivados Lqit/TE.04 e TE.05. A morfolina atua como uma base e captura um dos prótons do grupamento metilênico (CH_2) do anel da tiazolidin-4-ona. O carbânion formado, atua como nucleófilo e ataca o carbono da carbonila do grupo aldeído do núcleo indol, deslocando o par de elétrons da ligação π para o átomo de oxigênio eletronegativo. O mecanismo segue com a protonação do

oxigênio e, posterior captura do hidrogênio alfa. A reação é finalizada com a saída de uma molécula de água e formação da ligação π carbono-carbono, produzindo os derivados com dois núcleos indólicos (esquema 13).



Esquema 13. Mecanismo reacional da obtenção dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05.

4.6.3 Análise Espectroscópica dos Derivados Indólicos

Para confirmação dos derivados indólicos sintetizados foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (^1H) e de Carbono (^{13}C), e de infravermelho (IV). Para melhor caracterização estrutural foi ainda analisado os espectros de DEPT, COSY ^1H - ^1H e HSQC ^1H - ^{13}C , dos derivados Lqit/SEs. Nos espectros de ressonância magnética nuclear, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hertz (Hz).

Através da análise de RMN ^1H , simpleto característico do próton (NH) presente no anel indol apresentou um deslocamento químico com variação entre 12.064 e 12.426 ppm. Ainda referente ao núcleo indol, observou-se em todos os espectros sinais característicos dos grupamentos aromáticos, com deslocamento em torno de 7.985 e 7.160 ppm. O grupamento amino presente nos derivados SE.01/4a e SE.02/5a foi comprovado pela presença do simpleto de intensidade relativa para dois hidrogênios cada, com deslocamento em 5.956 e 5.940 ppm, respectivamente. Aos demais derivados, foram verificados sinais de simpleto entre 13.564 e 12.147 ppm, referentes ao grupamento NH dos anéis da tiazolidina-2,4-diona, 2-tioxtiazolidin-4-ona e 2-tioxoimidazolidin-4-ona.

A diferenciação dos simpletos neste deslocamento químico como pertencente ou não ao NH do anel indólico foi confirmado, em alguns derivados, através da análise do espectro de COSY ^1H - ^1H . Neste, observou-se a correlação do hidrogênio NH do indol, com o hidrogênio do grupo $-\text{CH}=\text{}$, na posição 2 do anel indólico, como pode ser visto no espectro COSY ^1H - ^1H dos derivados SE.03/4b, SE.04/5b, SE.05/4c, SE.06/5c e SE.07/4d.

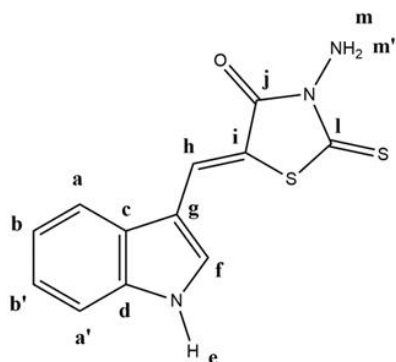
Nos espectros de RMN ^1H dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02, a integração do sinal em torno de 4.338 e 4.330 ppm, refere-se ao grupamento CH_2 presente. Confirmando a reação do grupo aldeído do núcleo indol com o grupamento amino da 2-tioxo-tiazolidin-4-ona. Neste contexto, nos espectros de RMN ^1H dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05, a ausência do sinal referente ao grupamento CH_2 juntamente com a presença de mais um sinal referente ao novo grupo CH, confirma a reação de condensação dos intermediários com o núcleo indol. Essa característica pode ser conferida, também, através dos espectros de RMN ^{13}C . Por meio da presença do pico característico do carbono em CH_2 dos intermediários Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 em torno de 34.218 ppm e da ausência desse pico nos espectros de RMN ^{13}C dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05.

Assim como nos derivados Lqit/TEs, nos espectros de ressonância magnética nuclear dos derivados Lqit/SEs, a ausência de grupos CH_2 , evidencia a condensação na posição 5 dos anéis inseridos ao núcleo indol. A ligação dupla exocíclica presente na posição 5 dos anéis da tiazolidina-2,4-diona, 2-tioxo-tiazolidin-4-ona e 2-tioxo-imidazolidin-4-ona foi confirmada também através dos sinais no espectro de RMN ^1H .

Nos espectros de RMN ^{13}C verificou-se sinais entre 163 e 170 ppm característicos do carbono nos grupamentos $\text{C}=\text{O}$, e sinais entre 176 e 197 ppm referentes a carbonos dos grupamentos $\text{C}=\text{S}$. Os sinais com deslocamento variando entre 110 e 136 ppm, foram atribuídas as absorções dos átomos de carbono do anel aromático.

A fim de evidenciar os grupos funcionais presentes nos compostos obtidos empregou-se a espectroscopia de absorção na região de infravermelho. Foram observadas bandas nos estiramentos entre: 3227.0 e 3260.1 cm^{-1} , referentes aos grupos funcionais NH; 1680.3 e 1723.4 cm^{-1} , relacionados ao grupo $\text{C}=\text{O}$; 1567.1 e 1591.7 , do grupamento $\text{C}=\text{S}$ e 1155.3 e 1581.8 cm^{-1} característico da aromaticidade $\text{C}=\text{C}$.

3-Amino-5-(1H-indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona (SE.01/4a)



RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.382 (s, 1H, NH - hidrogênio e), 8.230 (s, 1H, CH - hidrogênio h), 7.985 – 7.920 (m, 2H, hidrogênios a-a'), 7.508 (s, 1H, CH - hidrogênio f), 7.293 – 7.210 (m, 2H, hidrogênios b-b'), 5.956 (s, 2H, NH_2 - hidrogênio m-m').

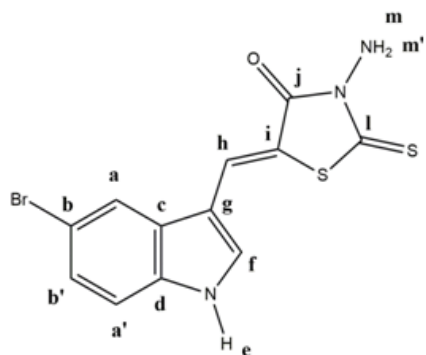
RMN ^{13}C e DEPT: δ 185.784 (C=S), 163.400 (C=O), 136.361 (carbono 4°), 130.754 (carbono a'), 126.726 (carbono h), 126.695 (carbono 4°), 123.388 (carbono b'), 121.560 (carbono b), 118.563 (carbono a), 112.560 (carbono f), 112.282 (carbono 4°), 111.042 (carbono 4°).

HSQC ^{13}C - ^1H : 8.230 (hidrogênio h) - 126.726 (carbono h), 7.508 (hidrogênio f) - 112.560 (carbono f).

IV (cm^{-1}): 3260.1 (NH_2), 1688.63 (C=O), 1578.23 (C=S), 1415.4 – 1327.07 (aromáticos), 1230.85 (C-N), 939.95 (C-S).

MS [M+1]: calculado = 275.014; encontrado = 276.032.

3-Amino-5-(5-bromo-1H-indol-3-ylmetileno)-2-tioxo-thiazolidin-4-ona (SE.02/5a)



SE.02/5a

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.426 (s, 1H, NH - hidrogênio e), 8.269 (s, 1H, CH - hidrogênio f), 8.162 (s, 1H, CH - hidrogênio h), 7.931 (s, 1H, CH - hidrogênio a), 7.487 – 7.465 (d, 1H, CH, $J = 8,8$ Hz - hidrogênio b'), 7.397 - 7.375 (d, 1H, CH, $J = 8,8$ Hz - hidrogênio a'), 5.940 (s, 2H, NH_2 - hidrogênios m-m').

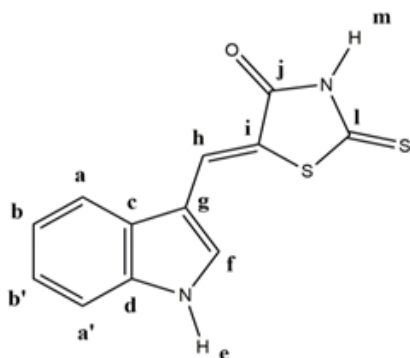
RMN ^{13}C e DEPT: δ 185.768 (C=S), 163.206 (C=O), 135.022 (carbono 4°), 131.389 (carbono a), 128.562 (carbono 4°), 126.277 (carbono h), 125.882 (carbono a'), 121.313 (carbono f), 114.179 (carbono b'), 114.404 (carbono 4°), 113.196 (carbono 4°), 110.632 (carbono 4°).

HSQC ^{13}C - ^1H : 8.269 (hidrogênio f) - 121.313 (carbono f), 8.162 (hidrogênio h) - 126.277 (carbono h), 7.931 (hidrogênio a) - 131.389 (carbono a), 7.487-7.465 (hidrogênio b') - 114.179 (carbono b'), 7.397-7.375 (hidrogênio a') - 125.882 (carbono a').

IV (cm^{-1}): 3260.1 (NH_2), 1697.35 (C=O), 1591.7 (C=S), 1416.1 - 1242.2 (aromáticos), 1226.61 (C-N), 927.48 (C-S)

MS ($[\text{M}+1]$): calculado = 352.937; encontrado = 353.927

5-(1H-indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-tiazolidian-4-ona (SE.03/4b)



SE.03/4b

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 13.527 (s, 1H, NH - hidrogênio m), 12.281 (s, 1H, NH -hidrogênio e), 7.920 – 7.889 (t, 2H, CH, $J = 7,6$ Hz - hidrogênios a - a'), 7.796 (s, 1H, CH, - hidrogênio f), 7.513 (s, 1H, CH, - hidrogênio h), 7.270-7.234 (t, 1H, CH, $J = 7,6$ Hz, - hidrogênio b'), 7.216 - 7.180 (t, 1H, CH, $J = 7,6$ Hz, - hidrogênios b).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 194.590 (carbono l), 169.100 (carbono j), 136.377 (carbono 4°), 129.972 (carbono f), 126.757 (carbono 4°), 124.736 (carbono a'-a), 123.249 (carbono b'-b), 121.359 (carbono b-b'), 118.424 (carbono a-a'), 117.889 (carbono 4°), 112.506 (carbono h), 110.911 (carbono 4°).

COSY ^1H - ^1H : 12.281 (hidrogênio e) – 7.796 (hidrogênio f).

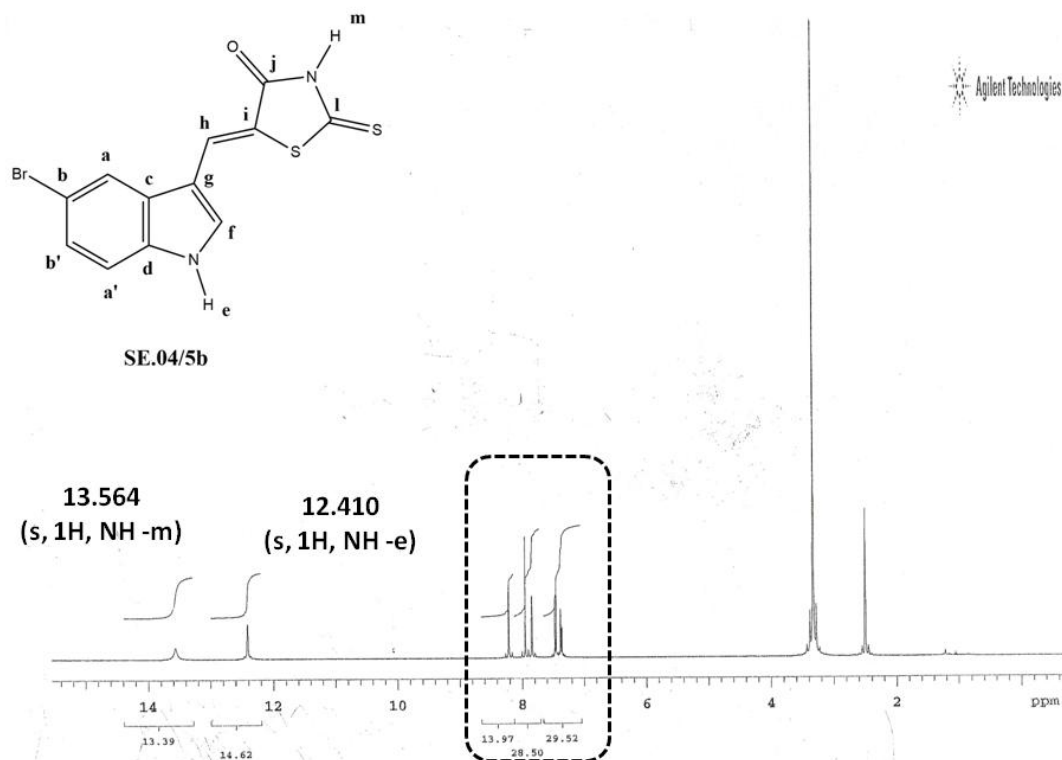
HSQC ^{13}C - ^1H : 7.796 (hidrogênio f) - 129.972 (carbono f); 7.270-7.234 (hidrogênio b') - 123.249 (carbono b'); 7.216-7.180 (hidrogênio b) - 121.359 (carbono b); 7.513 (hidrogênio h) – 112.506 (carbono h).

IV (cm^{-1}): 3258.7 (NH), 1680.3 (C=O), 1567.13 (C=S), 1581.8 – 1460.8 (aromático), 1147.4 (C-N), 688.63 (C-S).

MS[M+1]: calculado = 260.018; encontrado = 261.010.

5-(5-Bromo-1H-3-ilmetileno)-2-tioxa-tiazolidin-4-ona (SE.04/5b)

RMN 1H



8.213 (s, 1H, CH, hidrogênio a)

7.950 (s, 1H, CH, hidrogênio h)

7.846 (s, 1H, CH, hidrogênio f)

7.473 – 7.451 (d, 1H, CH, J = 8,8 Hz - hidrogênio b')

7.382 – 7.360 (d, 1H, CH, J = 8,8Hz - hidrogênio a')

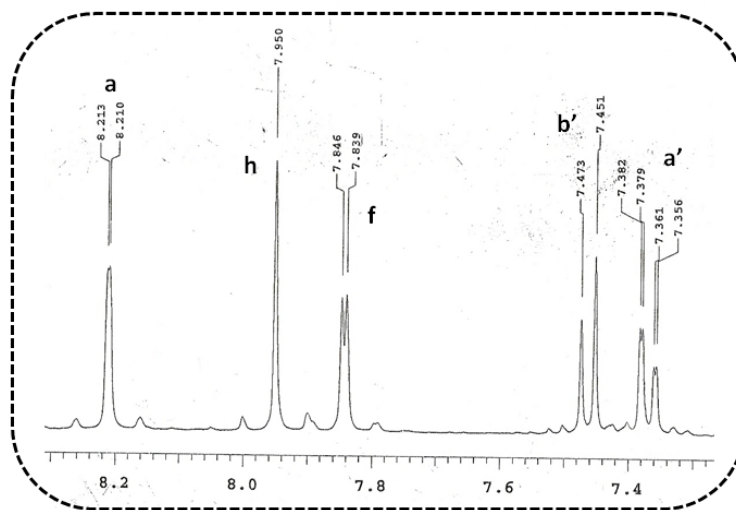
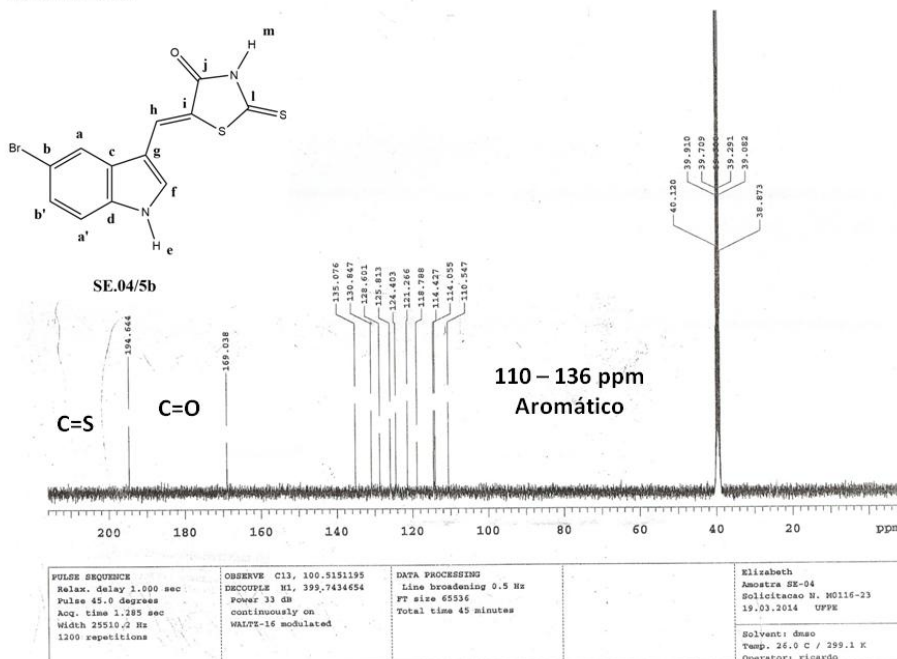


Figura 19. Espectro de RMN ^1H do derivado SE.04/5b

RMN 13C

Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do derivado SE.04/5b

DEPT

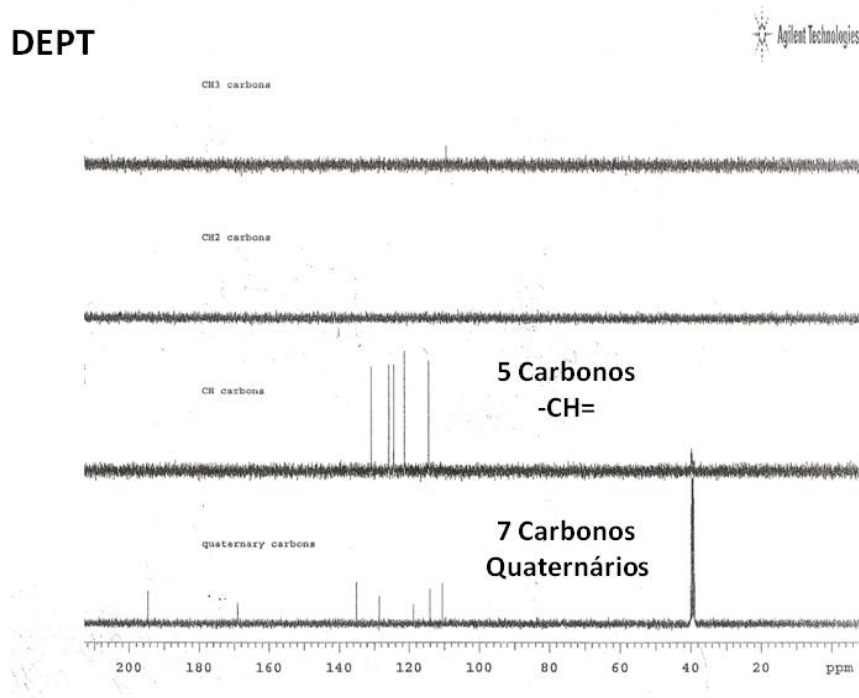
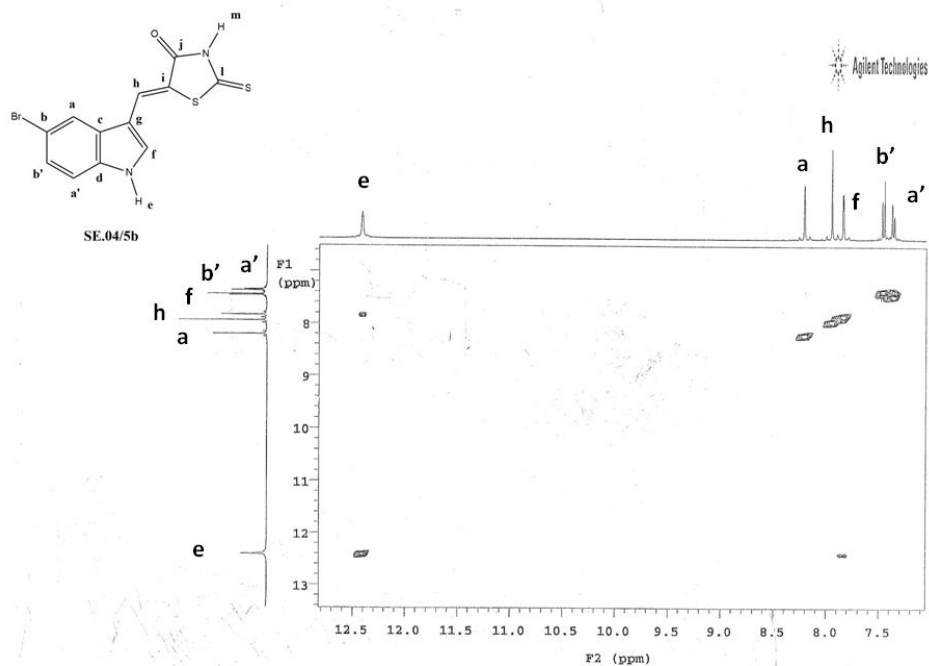
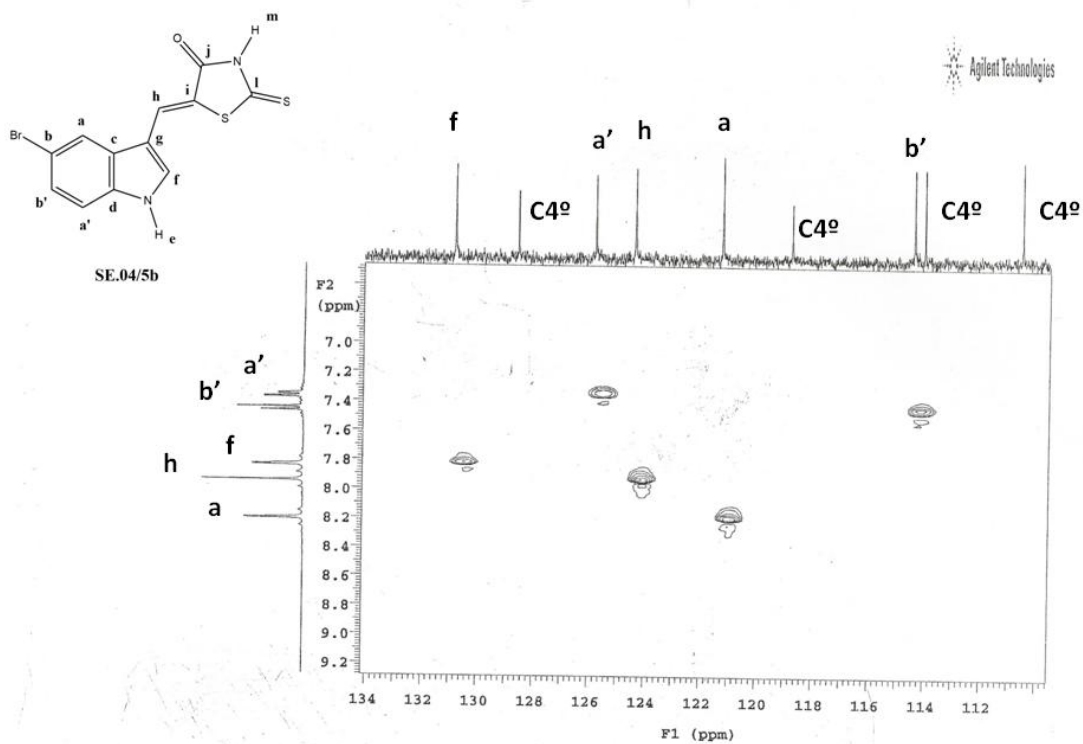


Figura 21. Espectro de DEPT do derivado SE.04/5b

COSY 1H-1H

Figura 22. Espectro de COSY ^1H - ^1H do derivado SE.04/5b

HSQC 1H-13C

Figura 23. Espectro de HSQC ^{13}C - ^1H do derivado SE.04/5b

Infravermelho (IV)

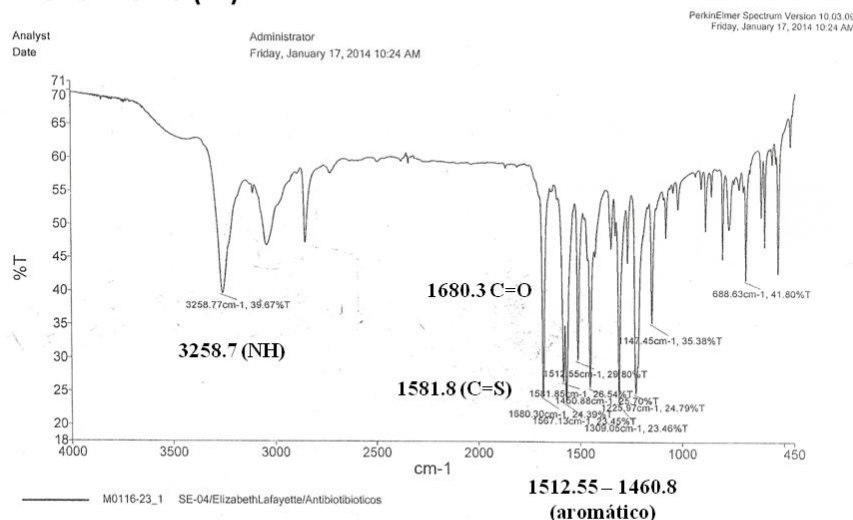


Figura 24. Espectro de infravermelho do derivado SE.04/5b

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 13.564 (s, 1H, NH - hidrogênio m); 12.410 (s, 1H, NH -hidrogênio e); 8.213 (s, 1H, CH - hidrogênio a); 7.950 (s, 1H, CH - hidrogênio h); 7.846 (s, 1H, CH, - hidrogênio f); 7.473 – 7.451 (d, 1H, CH, $J = 8.8\text{Hz}$ - hidrogênio b'); 7.382 – 7.360 (d, 1H, CH, $J = 8.8\text{Hz}$ - hidrogênio a').

RMN ^{13}C e DEPT: δ 194.644 (carbono l), 169.038 (carbono j), 135.076 (carbono 4°), 130.847 (carbono f), 128.601 (carbono 4°), 125.813 (carbono a'), 124.403 (carbono h), 121.266 (carbono a), 118.788 (carbono 4°), 114.427 (carbono b'), 114.055 (carbono 4°), 110.547 (carbono 4°).

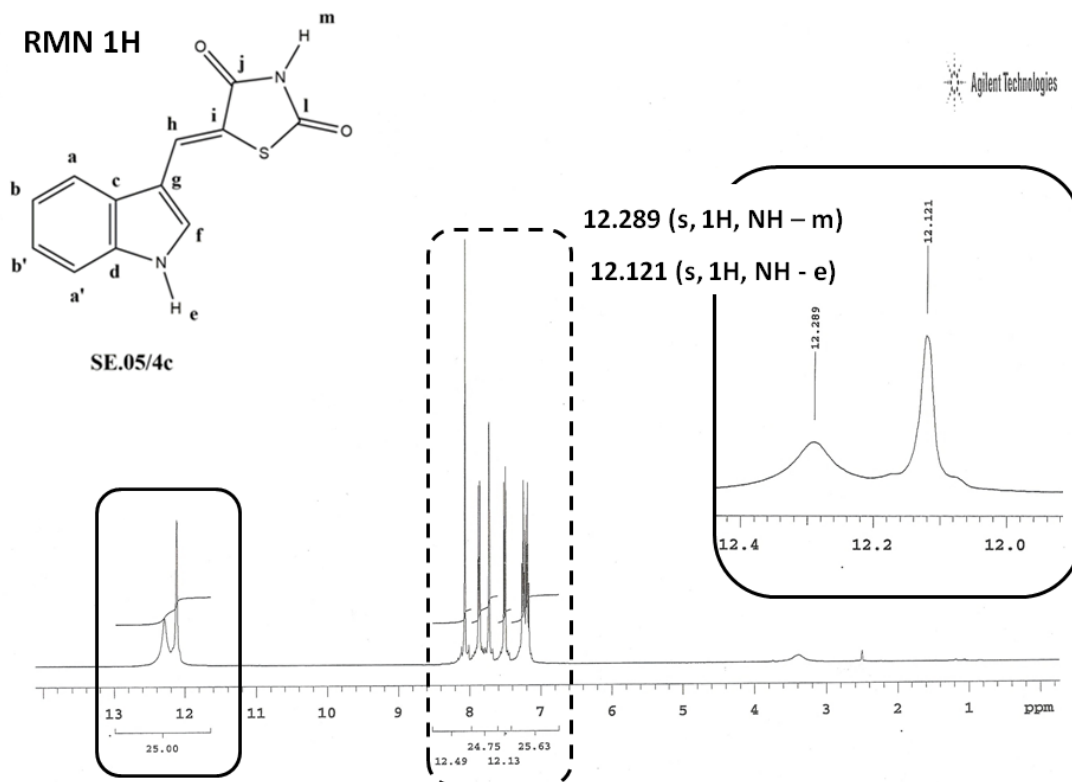
COSY ^1H - ^1H : 12.410 (hidrogênio e) – 7.846-7.839 (hidrogênio f); 7.473-7.451 (hidrogênio b') – 7.382-7.360 (hidrogênio a').

HSQC ^{13}C - ^1H : 8.213 (hidrogênio a) - 121.266 (carbono a); 7.950 (hidrogênio h) - 124.403 (carbono h); 7.846 (hidrogênio f) - 130.847 (carbono f); 7.473-7.451 (hidrogênio b') - 114.427 (carbono b'); 7.382-7.360 (hidrogênio a') - 125.813 (carbono a').

IV (cm^{-1}): 3258.7 (NH), 1680.3 (C=O), 1581.8 (C=S), 1512.55 – 1460.8 (aromático), 1147.4 (C-N), 688.63 (C-S).

MS $[\text{M}+1]$: calculado = 337.92; encontrado = 338.913

5-(1H-Indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (SE.05/4c)



8.061 (s, 1H, CH, hidrogênio h)

7.878 – 7.858 (d, 1H, CH, J = 8 Hz, hidrogênio a')

7.729 (s, 1H, CH, hidrogênio f)

7.516 – 7.497 (d, 1H, CH, J = 7,6 Hz – hidrogênio a)

7.265 – 7.227 (t, 1H, CH, J = 8Hz – hidrogênio b')

7.203 – 7.166 (t, 1H, CH, J = 7,6 Hz, -hidrogênio b)

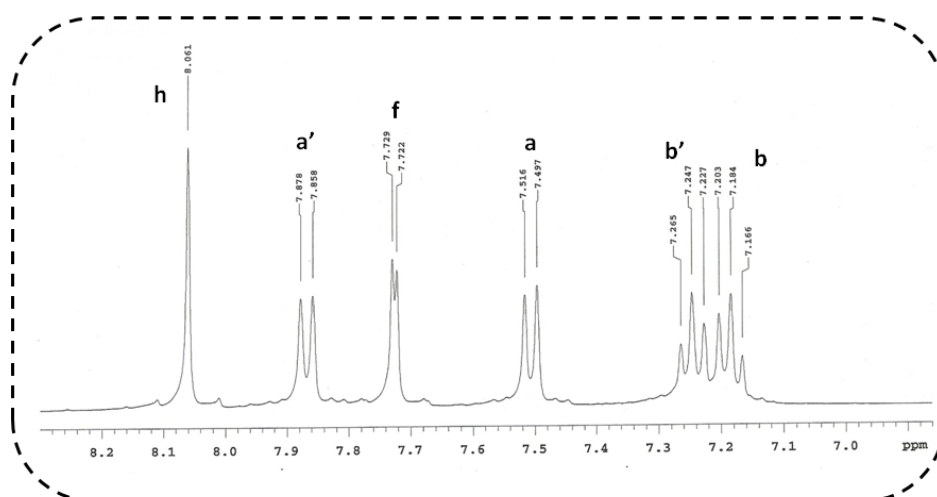
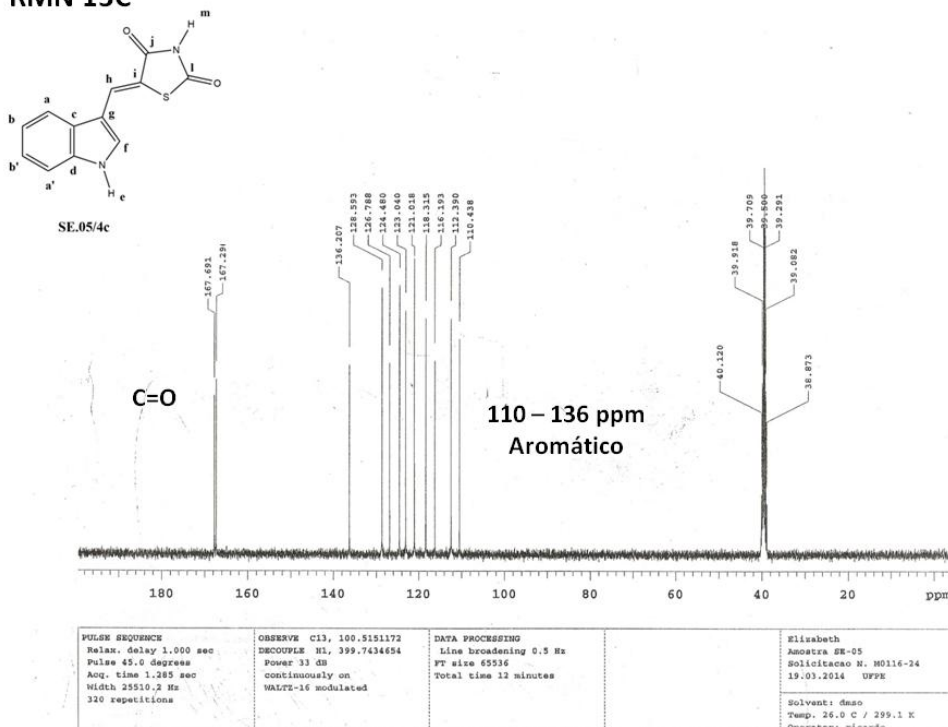


Figura 25. Espectro de RMN ^1H do derivado SE.05/4c

RMN 13C

Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C do derivado SE.05/4c

DEPT

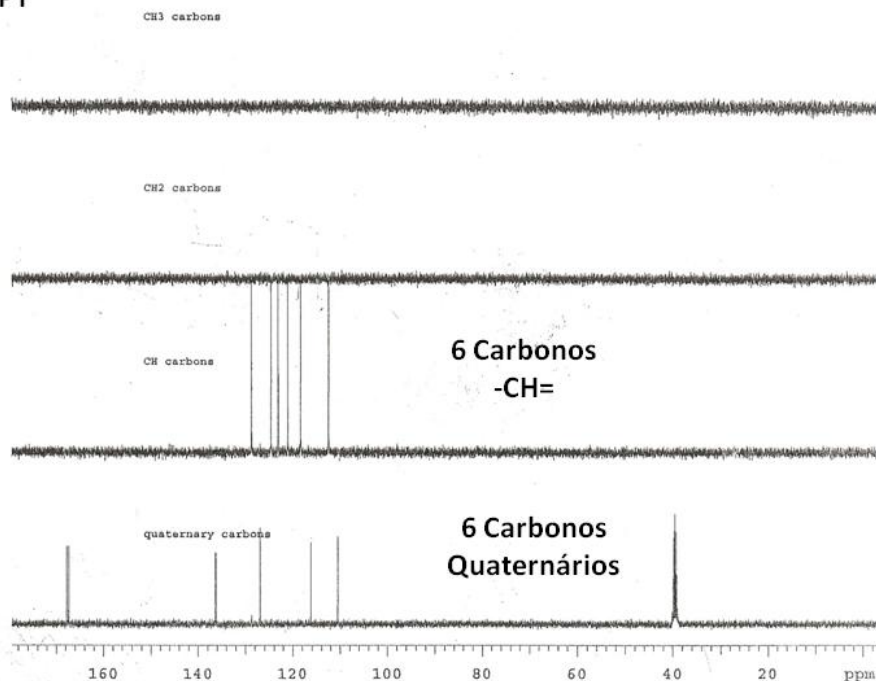
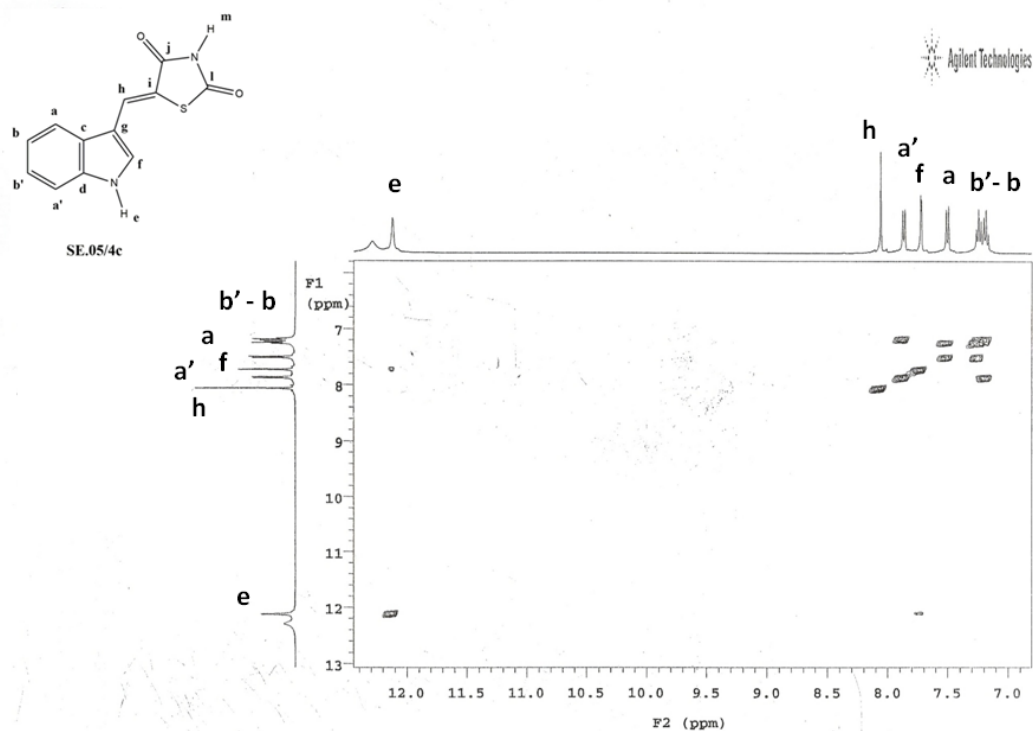
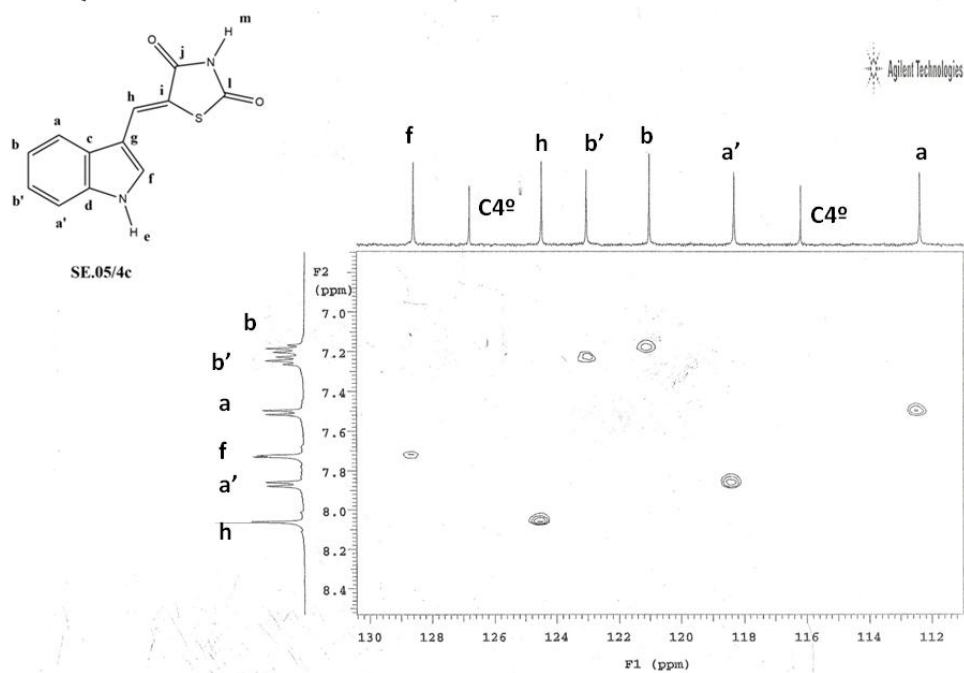


Figura 27. Espectro de DEPT do derivado SE.05/4c

COSY 1H-1H

Figura 28. Espectro de COSY ^1H - ^1H do derivado SE.05/4c

HSQC 1H-13C

Figura 29. Espectro de HSQC ^1H - ^{13}C do derivado SE.05/4c

Infravermelho (IV)

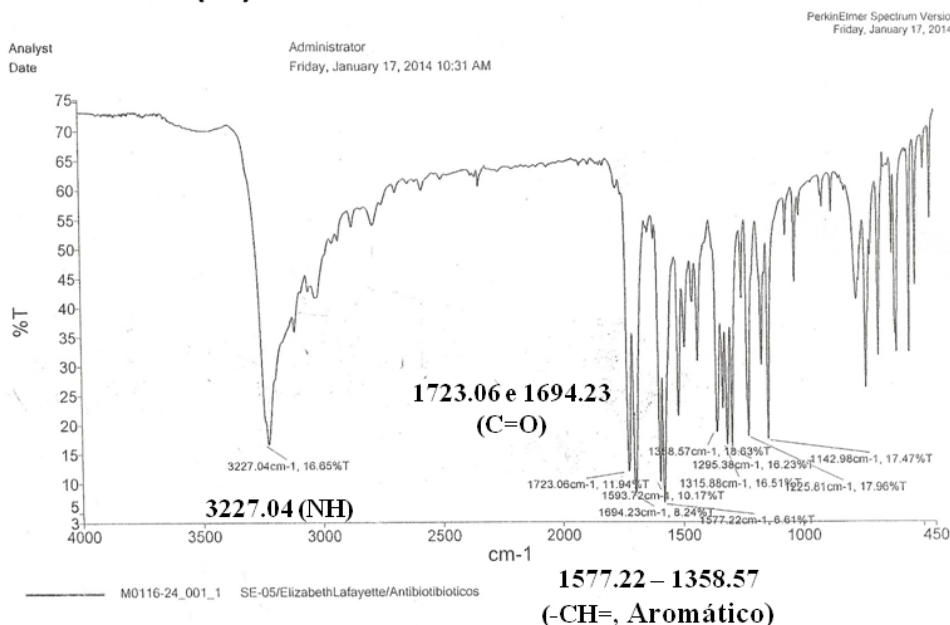


Figura 30. Espectro de infravermelho do derivado SE.05/4c

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 12.289 (s, 1H, NH - hidrogênio m); 12.121 (s, 1H, NH - hidrogênio e) 8.061 (s, 1H, CH - hidrogênio h); 7.878 – 7.858 (d, 1H, CH, J = 8 Hz - hidrogênio a'); 7.729 (s, 1H, CH - hidrogênio f); 7.516 – 7.497 (d, 1H, CH, J = 7.6 Hz - hidrogênio a); 7.265 - 7.227 (t, 1H, CH, J = 8 Hz - hidrogênio b'); 7.203 – 7.166 (t, 1H, CH, J = 7.6 Hz - hidrogênios b).

RMN ¹³C: δ 167.691 e 167.296 (C=O), 136.207 (carbono 4°), 128.593 (carbono f), 126.788 (carbono 4°), 124.480 (carbono h), 123.040 (carbono b'), 121.018 (carbono b), 118.315 (carbono a'), 116.193 (carbono 4°), 112.390 (carbono a), 110.438 (carbono 4°).

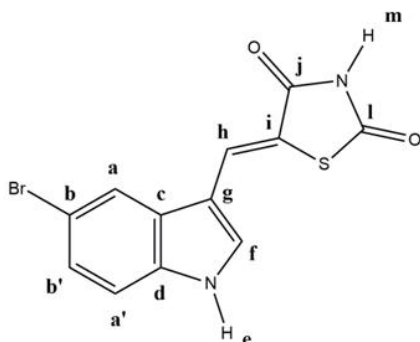
COSY ¹H-¹H: 12.121 (hidrogênio e) – 7.729 (hidrogênio f).

HSQC ¹³C-¹H: 8.061 (hidrogênio h) - 124.489 (carbono h); 7.878-7.858 (hidrogênio a') - 118.315 (carbono a'); 7.729 (hidrogênio f) - 128.593 (carbono f); 7.516-7.497 (hidrogênio a) - 112.390 (carbono a); 7.265-7.227 (hidrogênio b') - 123.040 (carbono b'); 7.203-7.166 (hidrogênio b) - 121.018 (carbonos b).

IV (cm⁻¹): 3227.04 (NH), 1723.06 (C=O), 1694.23 (C=O), 1577.22 – 1358.57 (aromáticos), 1142.98 (C-N).

MS [M+1]: calculado = 244.08; encontrado = 245.050

5-(5-Bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (SE.06/5c).



SE.06/5c

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.308 (s, 1H, NH - hidrogênio m); 12.244 (s, 1H, NH - hidrogênio e); 8.135 (s, 1H, CH - hidrogênio a); 8.049 (s, 1H, CH - hidrogênio h); 7.755 (s, 1H, CH - hidrogênio f); 7.465 – 7.443 (d, 1H, CH, $J = 8.8$ Hz - hidrogênio a'); 7.359 – 7.337 (d, 1H, CH, $J = 8.8$ Hz - hidrogênio b').

RMN ^{13}C e DEPT: δ 167.559 e 167.149 (C=O), 134.898 (C4°), 129.600 (carbono f), 128.593 (C4°), 125.596 (carbono b'), 124.147 (carbono h), 121.080 (carbono a), 117.037 (C4°), 114.311 (carbono a'), 113.707 e 110.128 (C4°).

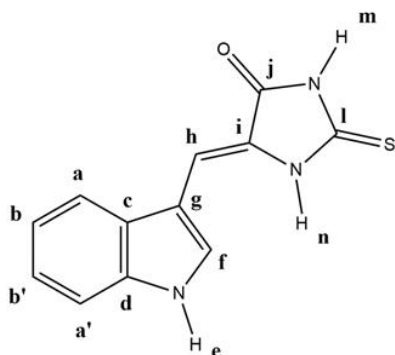
COSY ^1H - ^1H : 12.244 (hidrogênio e) - 7.755 (hidrogênio f).

HSQC ^{13}C - ^1H : 7.755 (hidrogênio f) - 129.600 (carbono f); 7.359 (hidrogênio b') - 125.596 (carbono b'); 8.049 (hidrogênio h) - 124.147 (carbono h); 9.135 (hidrogênio a) - 121.080 (carbono a); 7.465 (hidrogênio a') - 114.311 (carbono a').

IV (cm^{-1}): 3227.04 (NH), 1721.83 (C=O), 1689.91 (C=O), 1572.38 – 1456.11 (aromáticos), 1145.94 (C-N), 611.23 (C-S).

MS $[M+1]$: calculado = 321.94; encontrado = 322.980

5-(1H-Indol-3-ilmetileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (SE.07/4d)



SE.07/4d

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.147 (s, 1H, NH - hidrogênio m); 12.017 (s, 1H, NH -hidrogênio e); 11.803 (s, 1H, NH - hidrogênio n); 8.473 (s, 1H, CH - hidrogênio f); 7.812-7.793 (d, 1H, CH, $J = 7.6$ Hz - hidrogênio a'); 7.468 - 7.449 (d, 1H, CH, $J = 7.6$ Hz, - hidrogênio a); 7.210 – 7.155 (m, 2H, CH - hidrogênios b-b'); 6.846 (s, 1H, CH- hidrogênio h).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 176.753 (C=S), 165.445 (C=O), 135.904 (C4 $^\circ$), 128.872 (carbono f), 127.114 (C4 $^\circ$), 123.257 (C4 $^\circ$), 122.606 (carbono b'), 120.662 (carbono b), 118.029 (carbono a'), 112.080 (carbono a), 108.277 (C4 $^\circ$), 105.450 (carbono h).

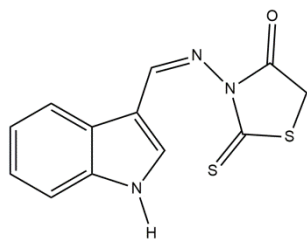
COSY ^1H - ^1H : 12.017 (hidrogênio e) - 8.473 (hidrogênio f).

HSQC ^{13}C - ^1H : 128.872 (carbono f) - 8.473 (hidrogênio f); 122.606-120.662 (carbono b'-b) - 7.210-7.155 (hidrogênios b'-b); 118.029 (carbono a') - 7.812 (hidrogênio a'); 112.080 (carbono a) - 7.468 (hidrogênio a); 105.450 (carbono h) - 6.846 (hidrogênio h).

IV (cm^{-1}): 3248.45 (NH), 1722.54 (C=O), 1525.89 (C=S), 1394.87 - 1239.66 (aromáticos), 1145.37 (C-N).

MS [M+1]: calculado = 243.05; encontrado = 244.049

3-(((1H-indol-3-il)metileno)amino)2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.01)



TE.01

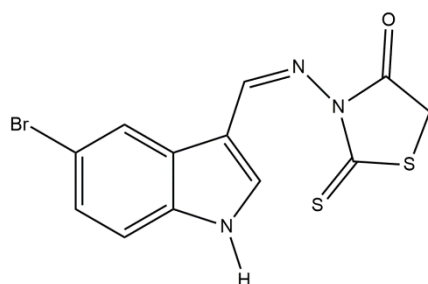
RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.055 (s, 1H, NH), 8.655 (s, 1H, CH), 8.182 - 8.119 (m, 2H, CH - aromático), 7.519 (s, 1H, CH), 7.275 - 7.201 (m, 2H, CH - aromático), 4.338 (s, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 196.723 (carbono C=S), 170.018 (carbono C=O), 165.698 (carbono CH), 137.035 (carbono 4°), 135.494 (carbono CH), 123.969 (carbono 4°), 122.064 / 121.318 / 121.318 (carbono CH), 112.070 (carbono CH), 109.971 (carbono 4°), 34.218 (carbono CH_2).

IR (cm $^{-1}$): 3387.20 (NH), 1743.30 (C=O), 1574.23 (C=S), 1317.59 – 1235.60 (aromáticos), 1212.32, 747.53.

MS [M+1]: calculado = 275.349; encontrado = 276.016

3-(((5-Bromo-1H-indol-3-il)metileno)amino)2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.02)



TE.02

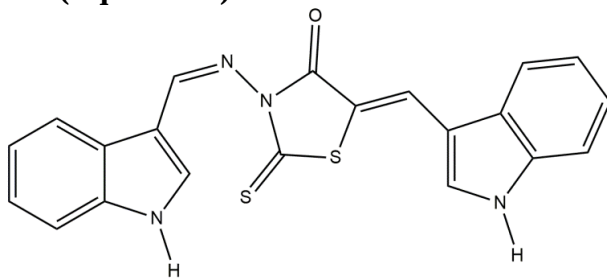
RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.221 (s, 1H, NH), 8.687 (s, 1H, CH), 8.336 (s, 1H, CH - aromático), 8.185 (s, 1H, CH), 7.517 - 7.496 (d, 1H, CH, J = 8,4 Hz) 7.416 - 7.395 (d, 1H, CH, J = 8,4 Hz), 4.330 (s, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 197.006 (C=S), 170.153 (C=O), 165.460 (carbono CH), 136.624 (carbono 4°), 135.974 (carbono CH), 125.897 (carbono 4°), 125.828 / 124.333 / 114.404 (carbono CH), 114.163 (carbono CH), 109.664 (carbono 4°), 34.458 (carbono CH_2).

IR (cm $^{-1}$): 3360.1 (NH), 1721.58 (C=O), 1590.61 (C=S), 1430.8 – 1281.52 (aromáticos), 1232.16, 897.54.

MS [M+1]: calculado = 354.245; encontrado = 353.913

5-((1*H*-indol-3-il)metileno)-3-((1*H*-indol-3-il)metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.04)



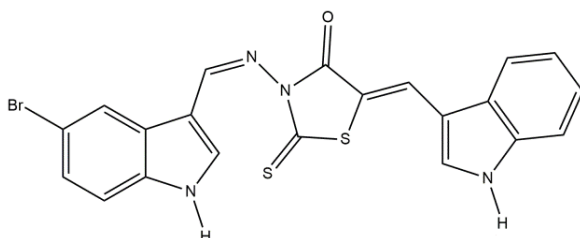
TE.04

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.385 (s, 1H, NH), 12.082 (s, 1H, NH), 8.829 (s, 1H, CH), 8.231 (s, 1H, CH), 8.140 (s, 1H, CH), 7.990 - 7.982 (d, 2H, CH, $J = 3.2$ Hz), 7.970 - 7.962 (d, 2H, CH, $J = 3.2$ Hz), 7.916 (s, 1H, CH), 7.553 - 7.509 (m, 2H, CH), 7.306 - 7.209 (m, 2H, CH).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 185.765 (carbono C=S), 165.992 (carbono C=O), 163.389, 137.278, 136.375, 135.639, 130.743, 126.743, 124.246, 123.380, 122.250, 121.544, 118.553, 113.293, 112.557, 111.168, 110.272 (carbono 4°), 135.494 (carbono CH), 123.969 (carbono 4°), 122.064 / 121.318 / 121.318 (carbono CH), 112.070 (carbono CH), 109.971 (carbono 4°).

MS [M+1]: calculado = 402.492; encontrado = 403.018

5-((1*H*-indol-3-il)metileno)-3-((5-bromo-1*H*-indol-3-il)metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona (Lqit/TE.05)



TE.05

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 12.391 (s, 2H, NH), 8.273 (s, 1H, CH), 8.164 (s, 1H, CH), 8.131 (s, 1H, CH), 7.991 - 7.972 (d, 1H, CH, $J = 7.6$ Hz), 7.944 - 7.925 (d, 1H, CH, $J = 7.6$ Hz), 7.528 - 7.508 (d, 1H, CH, $J = 8$ Hz), 7.481 - 7.461 (d, 1H, CH, $J = 8$ Hz), 7.388 (s, 1H, CH), 7.293 - 7.256 (m, 2H, CH), 7.247 - 7.211 (m, 2H, CH), 5.959 (s, 1H, CH).

RMN ^{13}C e DEPT: δ 185.780 (carbono C=S), 163.397 (carbono C=O), 136.398, 135.252, 131.722, 130.804, 126.705, 126.401, 125.908, 123.396, 121.566, 118.568, 114.561, 114.242, 112.587, 112.238, 111.046.

4.6.4 Características Físico-Químicas dos derivados Indólicos

Características físico-químicas de cada derivado indol são apresentadas na Tabela 1. Os compostos demonstraram ponto de fusão na faixa de pureza e rendimentos variáveis entre 48 a 63%.

Tabela 1. Características físico-químicas dos derivados indólicos.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Aspecto	Rdt (%)	Ponto de Fusão (° C)	Rf (n-hexano/EtOAc 1:1)
SE.01	C ₁₂ H ₉ N ₃ OS ₂	275.01	Sólido laranja	63	262-264	0.65
SE.02	C ₁₂ H ₈ BrN ₃ OS ₂	352.93	Sólido laranja	48	235-236	0.45
SE.03	C ₁₂ H ₈ N ₂ OS ₂	260.01	Sólido laranja	61.4	264-266	0.70
SE.04	C ₁₂ H ₇ BrN ₂ OS ₂	337.92	Sólido laranja	63.4	260-262	0.59
SE.05	C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂ S	244.03	Sólido amarelo	53.6	280-282	0.66
SE.06	C ₁₂ H ₇ BrN ₂ O ₂ S	321.94	Sólido amarelo	62	234-236	0.54
SE.07	C ₁₂ H ₉ N ₃ OS	243.05	Sólido amarelo	54.8	256-258	0.48
TE.01	C ₁₂ H ₉ N ₃ OS ₂	275.01	Sólido amarelo	88.9	264-265	0.54
TE.02	C ₁₂ H ₈ BrN ₃ OS ₂	352.93	Sólido amarelo	64.4	243-245	0.47
TE.04	C ₂₁ H ₁₄ N ₄ OS ₂	402.06	Sólido laranja	63	285-287	0.66
TE.05	C ₂₁ H ₁₃ BrN ₄ OS ₂	479.97	Sólido laranja	46	262-264	0.53

4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANTIPROLIFERATIVO

4.7.1 Antiproliferativo dos Derivados Lqit/SEs

A exposição às células neoplásicas permite realizar uma triagem dos compostos que possam ter ação farmacológica antiproliferativa nas linhagens testadas, possibilitando a pesquisa de novas alternativas de fármacos eficazes para o tratamento de neoplasias malignas. De modo a analisar as propriedades antitumorais dos novos derivados indólicos sintetizados, foi realizada um ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método de MTT, frente às células de câncer de mama (T47D e MCF7), leucemia promielocítica aguda (HL60) e leucemia mieloide crônica (K562).

Os resultados da atividade antiproliferativa dos derivados indólicos está representada na tabela 2, através dos valores de concentração necessários para inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50}) nas linhagens testadas.

Tabela 2. Atividade antiproliferativa *in vitro* em IC_{50} (μ M) dos derivados indólicos Lqit/SEs.

Compostos	Linhagens de Células			
	HL60	K562	T47D	MCF7
SE.01	3.61	22.47	> 50	>50
SE.02	6.74	> 50	> 50	> 50
SE.03	> 50	> 50	> 50	> 50
SE.04	> 50	> 50	11.72	3.65
SE.05	12.78	> 50	1.93	> 50
SE.06	> 50	> 50	> 50	> 50
SE.07	> 50	> 50	> 50	12.43
DOX ^a	0.01	6.25	4.61	2.71

a: Doxorubicina utilizada como controle positivo.

Os derivados Lqit/SE's mostraram divergentes comportamento nas linhagens testadas. O derivado Lqit/SE.01 apresentou atividade frente às células de leucemia, HL60 e K562; enquanto o derivado Lqit/SE.04 apresentou apenas atividade contra as células de câncer de mama, T47D e MCF7. Ambos derivados apresentaram um IC_{50} inferior a 4 μ M: 3,61 μ M na linhagem de HL60 para o composto Lqit/SE.01 e 3,65 μ M na linhagem de MCF7 para o composto Lqit/SE.04. De modo similar, o derivado Lqit/SE.05 apresentou, frente a linhagem

de T47D, um valor de IC_{50} baixo, 1.93 μM . O Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera potente atividade antineoplásica valores IC_{50} menor ou igual a 4,0 μM (INCA, 2015). O que estabelece, deste modo, que os derivados indólicos Lqit/SE.01, SE.04 e SE.05 são compostos ativos nas linhagens testadas.

Os derivados Lqit/SE.02 e SE.07 apresentaram atividade citotóxica seletiva em apenas uma das linhagens testadas, HL60 e MCF7, respectivamente. Entretanto, outros derivados indólicos da série Lqit/SEs analisados não mostraram potência antiproliferativa nas linhagens testadas. Os compostos Lqit/SE.03 e o SE.06 não foram capazes de inibir a proliferação celular em nenhuma das linhagens de leucemia e de mama testadas, mostrando-se inativos frente á essas linhagens.

Uma análise da estrutura química dos derivados Lqit/SEs com os resultados antiproliferativos, permite-nos induzir a influência do grupamento amino na atividade citotóxica em linhagens de leucemia. Visto que, dentre os compostos indólicos analisados, o Lqit/SE.01 e SE.02 (derivados 3-amino-2-tioxo-thiazolidin-4-ona) foram os únicos que apresentaram eficácia nas linhagens de HL60 e K562.

Ji e colaboradores (2014) sintetizaram e testaram uma nova classe de derivados indol-2-carboxilato quanto a atividade antiproliferativa em células de câncer *in vitro* e os resultados indicaram que o grupo amino na posição 6 do anel indol é indispensável para as atividades antiproliferativas. Estudos realizados com derivados da série 5-((1-benzyl-1H-indol-3-yl)methylene)-1,3-dimethyl-pyrimidine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione frente a linhagens celulares diversas constataram que, na presença do grupo metoxi, os valores de IC_{50} nas linhagens de mama (MCF7) e leucemia (K562) reduziram quando comparados aos valores de IC_{50} dos derivados contendo o grupo metil (MADADI et al., 2014). Tais resultados, aliados ao estudo do grupamento amino, permite indicar a importância de grupos aceptores e/ou doadores de ligações de hidrogênio, para compostos promissores com atividade antitumoral, em especial nas linhagens de leucemia e mama.

A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, é uma potente droga antitumoral, utilizada no tratamento de câncer de mama, linfoma e leucemias. Valores de IC_{50} da doxorrubicina frente as linhagens testadas são mostrados na tabela 2. Uma comparação do controle positivo com os derivados indólicos permite evidenciar, na linhagem T47D, a atividade do composto Lqit/SE.05, o qual apresentou um IC_{50} de 1.93 μM , cerca de 30 vezes menor do que o valor expresso pela doxorrubicina. Esse resultado preliminar indica que o

composto Lqit/SE.05 pode vir a ser um bom candidato a agente antiproliferativo na linhagem de mama testada.

Derivados indólicos tem sido analisado, frequentemente, e seus efeitos contra o câncer de mama evidenciados (NGUYEN et al., 2010; ABREU et al., 2012; KAMATH et al., 2015). Gurkan-Alp e colaboradores (2012) realizaram um estudo da atividade anticâncer de novos derivados indólicos retinoides e evidenciaram o efeito anti-proliferativo do 3-(1*H*-Indo-3-il)-1-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)prop-2-en-1-ona, que inibiu o crescimento das células nas linhagens T47D e MCF7 a concentrações muito baixas, 1.16 e 1.71 μ M, respectivamente.

4.7.2 Antiproliferativo dos Derivados Lqit/TEs

A análise da atividade antiproliferativa dos derivados indólicos Lqit/TEs foi realizada utilizando o ensaio de Sulforrodamina B (SRB), a partir da avaliação com oito linhagens de células tumorais diferentes: glioma (U251), da mama (MCF7), ovário resistente (NCI-ADR), rim (786-0), do pulmão (NCI-460), do cólon (HT-29), de leucemia (K-562) e uma linha celular de queratinócitos humanos normais (HaCat). Os compostos foram usados em concentrações compreendidas entre 0,25 e 250 μ g/mL e a doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A tabela 3 informa os valores de GI_{50} em μ M (concentração molar do compostos que inibe 50% do crescimento celular) frente as linhagens tumorais e a uma linhagem não tumoral. O derivado Lqit/TE.04 destaca-se dentre os compostos indólicos analisados, com as menores concentrações que inibe o crescimento celular em 50%, demonstrando valores GI_{50} entre 4.53 - 6.18, dentre todas as linhagens testadas. A maior potência foi nas linhagens de mama (MCF-7) e de leucemia (K-562), com valor de GI_{50} de 4.53 e 5.26, respectivamente.

Tabela 3. Atividade antiproliferativa in vitro em GI₅₀ (μM) dos derivados indólicos Lqit/TEs.

Compostos	Linhagens de Células							
	U251	MCF7	NCI/ADR-RES	786-0	H460	HT-29	K-562	HaCaT
TE.01	94.37	95.12	96.01	>100	>100	>100	>100	>100
TE.02	29.63	18.82	55.90	63.56	73.20	69.56	38.86	33.33
TE.04	5.53	4.53	6.18	5.90	5.43	5.75	5.26	5.32
TE.05	51.82	31.30	>100	49.54	91.74	61.30	52.14	54.76
DOX^a	0.04	0.03	1.00	0.04	0.05	0.33	0.22	0.06
TGI^b TE.04	10.83	39.73	30.31	12.62	44.15	42.69	53.26	14.71

a: DOX - Doxorubicina utilizada como controle positivo.

b: TGI - Valor de concentração que inibe totalmente o crescimento celular.

Uma análise estrutural nos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 possibilita verificar que: a substituição na posição 5 do anel indol por um átomo de bromo promove maior efetividade do derivado contra as células tumorais. Na relação entre os derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05, o átomo de bromo ligado ao anel indol causa desativação do anel aromático e, consequentemente, maior deslocalização do par de elétrons do nitrogênio por ressonância. Assim, a disponibilidade do par de elétron do nitrogênio do anel indol pode exercer função essencial na atividade antitumoral. Tal interpretação é evidenciada a partir dos altos valores de GI₅₀ do derivado Lqit/TE.05, quando comparados aos valores do Lqit/TE.04 (tabela 3), demonstrando a não atividade do composto Lqit/TE.05 sobre as linhagens tumorais.

Estudos de SAR (relação estrutura atividade) é imprescindível para a confirmação da relação do átomo de bromo na atividade antitumoral. Ma e colaboradores (2015) realizaram estudos com N-benzil-indol submetidos ao ensaio de SAR e verificaram que a presença de substituintes desativadores do anel, os quais reduzem a densidade eletrônica, foi desfavorável para a atividade antitumoral.

A relevância do derivado Lqit/TE.04 nos resultados da atividade antiproliferativa, conduziu ao cálculo da concentração molar do composto que conduz a uma inibição total do crescimento celular (TGI). Tais valores são essenciais em estudos de morte celular, posteriores.

Os resultados do estudo antiproliferativo na linhagem celular de queratinócitos humanos normais (HaCaT) mostram que, apesar do derivado Lqit/TE.04 apresentar eficácia nas linhagens tumorais testadas, o mesmo é tóxico para a célula normal. Já que, o valor de

GI₅₀ para as células HaCaT também é um valor baixo. Esta linhagem HaCat foi inserida no painel com o objetivo de simular células normais humanas que têm um perfil de mitose acelerado característico das células tumorais.

O resultado, entretanto, não é indicativo de que o derivado Lqit/TE.04 é tóxico em animais. Oliveira e colaboradores (2015) demonstraram em seus estudos com derivados tiofênicos que o composto mais eficaz na atividade antitumoral, apresentou também citotoxicidade em células normais, porém mostrou-se atóxico em animais. Assim, estudo *in vivo* torna-se necessário para melhor avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade do derivado Lqit/TE.04.

4.8 RESULTADO E DISCUSSÃO - ESTUDO DA LIGAÇÃO COM O DNA

4.8.1 Espectroscopia de absorção eletrônica

Espectroscopia de absorção eletrônica tem sido amplamente utilizada em estudos de ligação com o DNA, uma vez que alterações no espectro de compostos na presença de quantidades crescentes de DNA pode fornecer informações relativas à intensidade de ligação e ao modo de interação de pequenas moléculas na cadeia dupla do DNA (WANG et al., 2011 e NAFISI et al., 2007).

Na análise, os derivados indólicos Lqit/SEs mostraram absorções intensas na região em torno de 360 a 520 nm. Enquanto que, os derivados Lqit/TEs apresentaram absorções intensas em regiões mais baixas, em torno de 220 a 500 nm. Os comprimentos de onda de absorção máxima dos derivados livres e ligados ao DNA e demais dados espectroscópicos podem ser vistos na Tabela 4.

A ligação de moléculas pequenas ao DNA, envolve o empilhamento entre os pares de bases do DNA e um cromóforo aromático, o que resulta em efeito hipocrômico ou hiperocrômico e mudanças da banda de absorção para a região do vermelho ou do azul (LI et al., 2012). Os derivados testados exibiram mudanças em suas propriedades espectroscópicas após a interação com ctDNA, com efeitos hipocrômico ou hiperocrômico, além de alterações na forma com desvio para a região do vermelho ou do azul, denominadas respectivamente de efeito bathocrômico e hipsocrômico.

Tabela 4. Dados da espectroscopia de absorção UV-vis e de emissão de fluorescência dos derivados indólicos na ausência e na presença de ctDNA.

Compostos	λ_{max} livre (nm)	λ_{max} ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Coefficiente de Extinção Molar (ϵ , M^{-1})	Hipocr. (%) ^a	Hipercr. (%) ^b	K_b M^{-1}	Log P	K_{sv}^a M^{-1c}
SE.01	500	507	7	8.450	-	6%	5.69×10^4	2.11+- 0.79	1.81×10^4
SE.02	414	411	3	7.538	-	23%	1.84×10^4	2.97 +- 0.84	2.96×10^3
SE.03	436	440	4	4.000	-	75%	4.51×10^4	1.67 +- 0.75	1.78×10^3
SE.04	466	462	4	10.412	-	8%	1.56×10^4	2.53 +- 0.75	6.31×10^3
SE.05	378	378	0	14.775	24%	-	7.26×10^4	1.36 +- 0.75	1.59×10^3
SE.06	457	457	0	22.200	6%	-	5.24×10^4	2.22 +- 0.75	3.86×10^3
SE.07	425	423	2	18.860	11%	-	6.27×10^4	2.19 +- 0.75	1.36×10^3
TE.01	300	300	0	54.900	18,61%	-	14.6×10^3	1.84 +- 1.08	1.89×10^4
TE.02	300	300	0	30.000	20,91%	-	4.43×10^3	2.70 +- 1.11	2.36×10^3
TE.04	456	458	2	15.333	-	11,3%	3.06×10^3	4.64 +- 1.08	1.47×10^3
TE.05	328	328	0	14.366	55%	-	7.94×10^3	5.50 +- 1.12	1.54×10^3

^a. Hipocromismo resultante da formação de complexo entre os derivados indólicos e 80 μM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

^b. Hipercromismo resultante da formação de complexo entre os derivados indólicos e 80 μM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

^c. Constante de supressão de Stern–Volmer, KSV, obtida a partir dos dados de fluorescência com ctDNA.

Derivados Lqit/SE01, SE.02, SE.03 e SE.04 (Figura 31) apresentaram efeito hipercrômico com desvio para o vermelho e o azul, onde a maior alteração na intensidade de absorção foi oriunda do derivado SE.03 que apresentou um hipercromismo de 75%. Ambos efeitos, hipercrômico e hipocrômico são característicos das alterações na conformação da estrutura da dupla hélice do DNA após ligação dos compostos (LAFAYETTE et al., 2013). Especificamente, o hipercromismo origina-se a partir da quebra na estrutura secundária do DNA com contração no eixo da hélice; enquanto o hipocromismo resulta da estabilização da cadeia dupla do DNA quer por intercalação, efeito eletrostático ou por ligação nos sulcos (STREKOWSKI E WILSON, 2007).

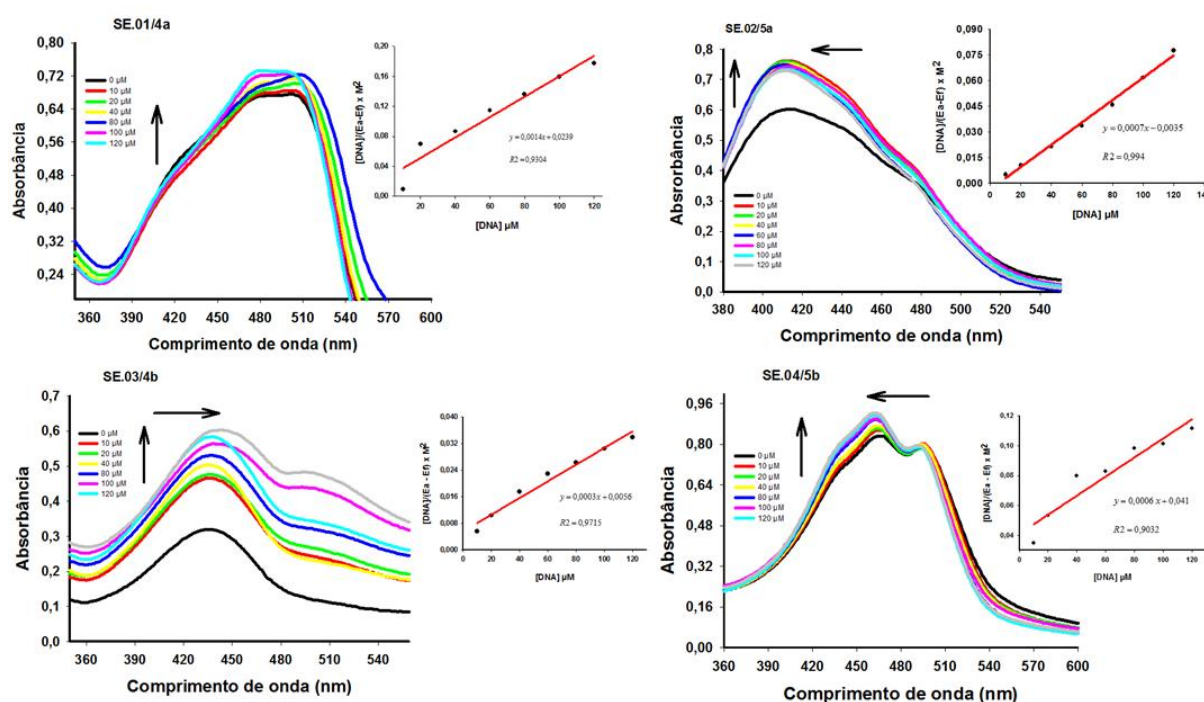


Figura 31. Espectro de absorção do derivado SE.01, SE.02, SE.03 e SE.04 (80 µM) em quantidades crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µM. A seta ($\uparrow$), ($\rightarrow$) e ($\leftarrow$) referem-se ao efeito hipercrômico, bathocrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[DNA]/(E_a - E_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

Espectros de absorção dos derivados Lqit/SE.05, SE.06 e SE.07 mostraram que a medida que a concentração de ctDNA aumenta, ocorre efeito hipocrômico. No entanto, Lqit/SE.05 e SE.06 (Figura 32) não demonstraram quaisquer alterações nas regiões de absorção, permanecendo os picos máximos de absorção em 378 e 457 nm,

respectivamente. O efeito hipocrômico observado para o derivado Lqit/SE.07 (Figura 32) foi concomitante com uma pequena mudança para a região do azul (2 nm). Estudos anteriores de interação ao DNA com derivados de acridina apresentado anel tiazolidina-2,4-diona como cadeia lateral mostrou efeito hipocrômico semelhante aos compostos Lqit/SE.05 e SE.06 (LAFAYETTE et al., 2013). De um modo geral, extenso hipocromismo acoplado a um desvio forte para a região do vermelho são considerados como uma indicação da intercalação de pequenas moléculas ao DNA devido ao forte empilhamento dos pares de cromóforos (CHEN et al., 2011). Assim, pode-se sugerir que o modo de ligação mais provável entre os derivados Lqit/SE.05, SE.06 e SE.07 e o ctDNA é a ligação nos sulcos (ZHANG, HU e FU, 2012).

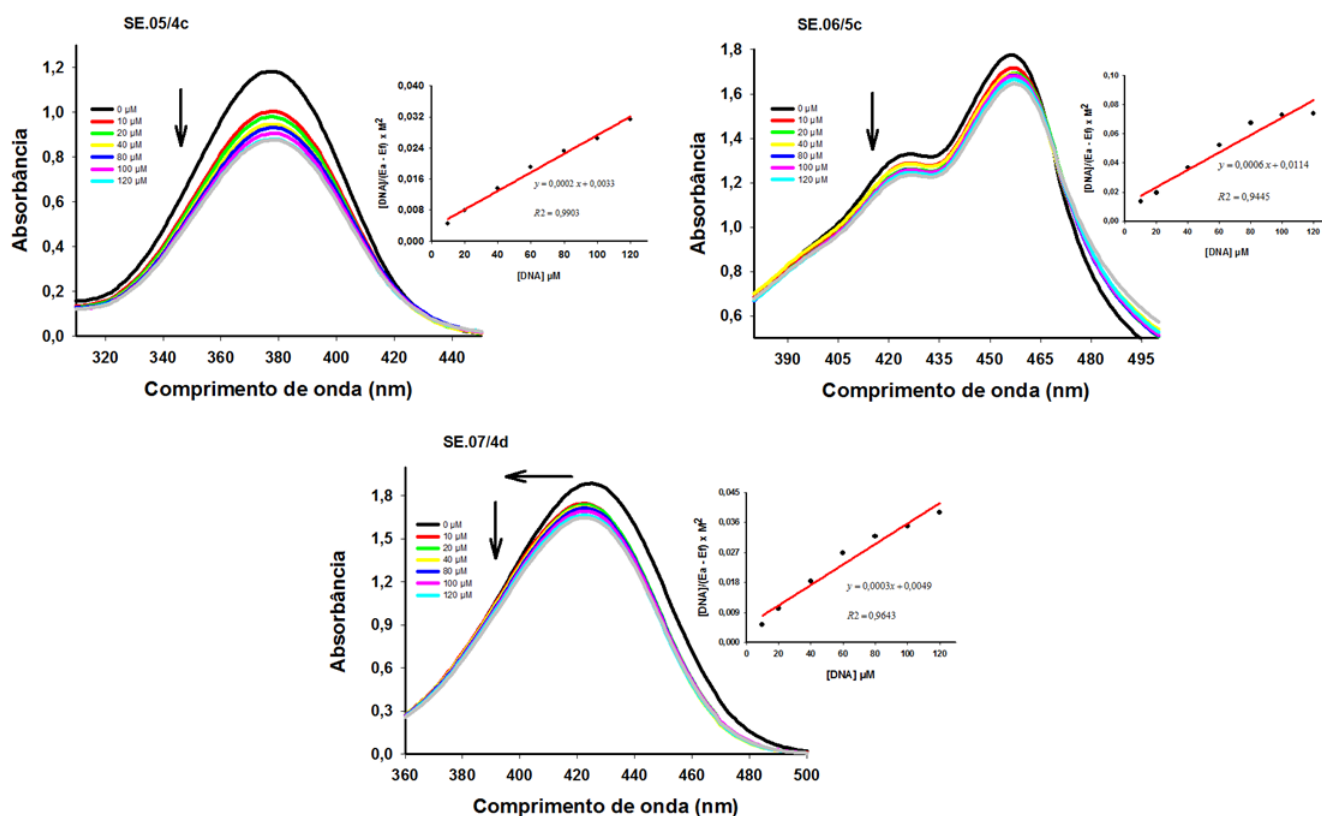


Figura 32. Espectro de absorção do derivado SE.05/4c, SE.06/5c e SE.07/4d (80 μM) em quantidades crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM. A seta (↓) e (←) referem-se ao efeito hipocrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[DNA]/(E_a - E_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

A força de ligação dos derivados com o ctDNA foi ainda estudado através da constante de ligação intrínseca (K_b), obtida através das alterações nas absorbâncias com o aumento das concentrações de ctDNA (MCGHEE e VON HIPEEL, 1974). O gráfico da $[DNA]/(E_a - E_f)$ versus $[DNA]$ (na inserção das figuras) foi utilizado para obtenção do K_b a partir da razão entre a inclinação e o intercepto.

Os valores das constantes de ligação (K_b) dos derivados indólicos foram da ordem de 10^4 mols, indicando afinidade de ligação em sulcos, o que é relevante para o pequeno tamanho das moléculas de indol (YIN et al., 2007). O valor da constante destes derivados pode ser explicada pela presença da dupla exocíclica, entre o núcleo indólico e as cadeias laterais dos anéis, o que interfere na flexibilidade fornecida pelo ligante, prejudicando a orientação da molécula no interior do sulco menor do DNA (PANDYA et al., 2010).

Os derivados Lqit/TE.01, TE.02 e TE.05 mostram em seus espectros de absorção o efeito hipocrômico, a medida que a concentração de ctDNA. Enquanto que, o derivados Lqit/TE.04 evidencia efeito hiperocrômico, ou seja, aumento da absorbância com o aumento crescente da concentração de ctDNA. De modo semelhantes ao evidenciado com os espectros de absorção dos derivados Lqit/SE.05, SE.06, SE.07, o efeito hipocrômico para os derivados Lqit/TE.01, TE.02 e TE.05, manifesta, também, a ligação nos sulcos como a mais provável das interações com o ctDNA. Os espectros de absorção eletrônica dos derivados Lqit/TEs são mostrados na Figura 33 e Figura 34.

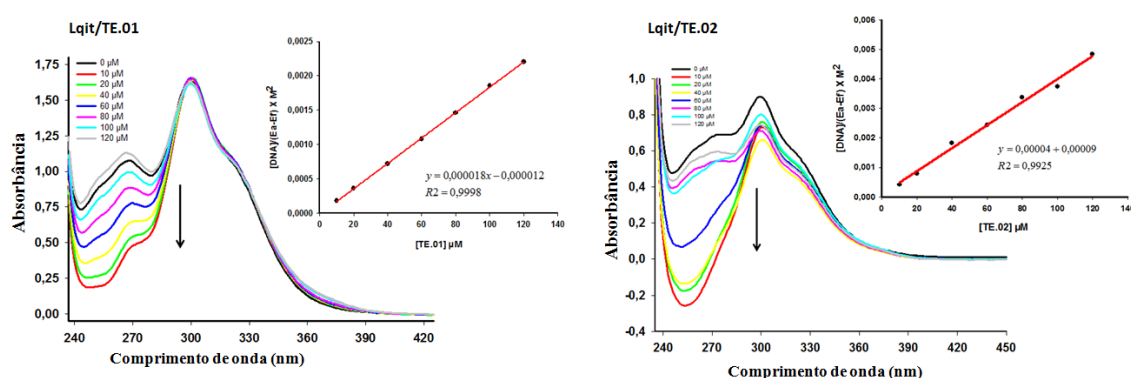


Figura 33. Espectro de absorção dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 (50 μ M) em quantidades crescentes de ctDNA. $[DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100$ e 120μ M. A seta ($\downarrow$) refere-se ao efeito hipocrômico.

Inserção: correspondente ao gráfico de $[DNA]/(E_a - E_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

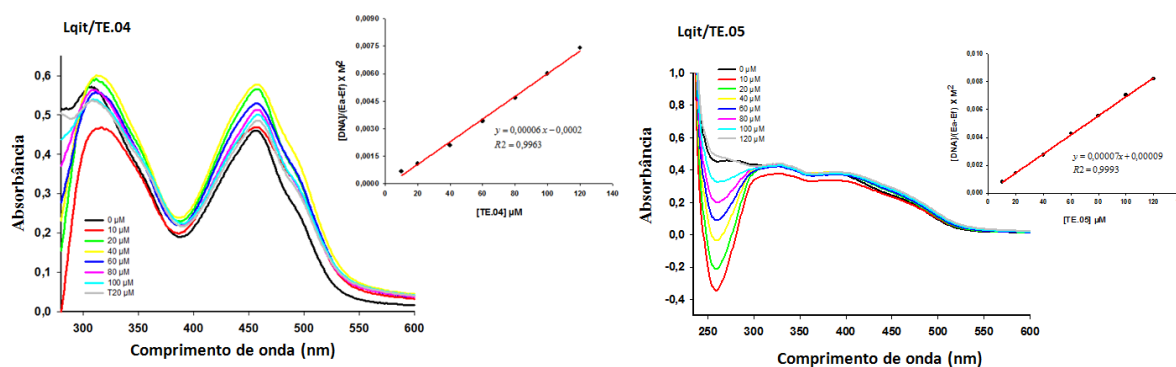


Figura 34. Espectro de absorção dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05 (50 μM) em quantidades crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM . Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{DNA}]/(\text{Ea} - \text{Ef})$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

Kashanian e Dolatabadi (2009) verificaram em suas análises que derivados exibindo uma dupla ligação como espaçador pode resultar, pelo menos em parte, em uma restrição da liberdade conformacional. Compostos ligantes no sulco geralmente contêm um sistema de anéis não fundidos com liberdade rotacional, que permite que as moléculas possam adotar a conformação mais adequada para se adaptar à curvatura do sulco helicoidal, sem perturbação significativa do DNA (MAHMOOD, PAUL E LADAME, 2010).

Em geral, os produtos aromáticos planares se ligam ao DNA por intercalação, essencialmente, entre os pares de bases, enquanto a porção dos substituintes se ligam no sulco menor, através de ligações de hidrogênios com as bases do DNA (HOSSAIN E KUMAR, 2009). Segundo Li e colaboradores (2010) a maioria dos átomos de carbono e hidrogênio de cromóforos possuem densidades eletrônica relativamente alta e exibem interações π -empilhamento energeticamente favoráveis para inserção entre os pares de bases nucleotídicas. O que torna perceptível a participação da estrutura aromática do núcleo indol nas interações com a molécula do DNA (SHIMASAKIA et al., 2009).

Os novos derivados indólicos analisados apresentam cadeias laterais básicas amplamente estudadas com atividade antitumoral, antimalária e antiinflamatório (ASATI et al., 2014; NEVES et al., 2011). Além de, estudos recentes, indicarem estes grupos como atraentes para aumentar a afinidade de ligação ao DNA (SHAH, 2013, LAFAYETTE et al., 2013), o que pode ser útil para expandir a diversidade de estruturas e grupos substituintes.

Pandya e colaboradores (2010) estudaram o núcleo indol na sua afinidade de ligação nos sulcos de DNA com diferentes grupos inseridos: cadeias laterais contendo forte grupo aceptor de ligação de hidrogênio ($>C=O$) e doadores de ligações de hidrogênio ($-NH_2$). Tais grupos não apenas facilitam o estabelecimento dos contatos intermoleculares entre moléculas pequenas e o DNA, mas também podem determinar a especificidade de sequência de DNA.

A influência da forma e tamanho de substituintes na ligação ao DNA também foi avaliado por Benner e colaboradores (2014) através da introdução de substituintes doadores de hidrogênio, o grupamento amino. Os autores evidenciaram o aumento da afinidade do ligante pelo DNA pela presença de grupos com caráter doador de elétrons, por meio de forte desvio para o vermelho. Ao mesmo tempo, notaram que o resultado foi muito diferente daquele observado com os substituintes cloro e metil, que também afetam a propensão da ligação, podendo todos estes substituintes serem empregados de forma complementar para aumentar a afinidade de ligação de um ligante ao DNA (BENNER et al., 2014).

Derivados de indol com cadeia lateral amina foram sintetizados e manifestaram boa ligação ao DNA e atividade antitumoral, por ligações de hidrogênio com esqueleto fosfato dos ácidos nucleicos (YIN et al., 2007). Desta forma, a presença do grupamento amino livre nos derivados indólicos pode contribuir para maior disponibilidade nas ligações de hidrogênio com os grupos fosfato do DNA. O que é assegurado pelo valor da constante de ligação para o composto SE.01 (5.69×10^4), demonstrando o efeito do grupo amino e da não substituição do hidrogênio por bromo na posição 5 de anel indol. A presença de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio na molécula auxilia na maior ligação com o ctDNA, devido as interações entre os pares de bases (LAFAYETTE et al., 2013).

Derivados contendo duas porções capazes de intercalação separadas por um grupo espaçador adequado podem produzir a chamada bis-intercalação (KURUVILLA et al., 2005), evidenciando uma maior capacidade de ligação ao DNA. Os compostos Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05 apresentam em sua estrutura dois núcleos indol interligados por o anel da 2-tioxi-tiazolidin-4-ona. Entretanto, o resultado observado para estes derivados bis-indólicos, mostra que ambos apresentam uma menor afinidade com o DNA, quando comparados aos derivados que possuem um núcleo indol, como por exemplo os derivados Lqit/SEs. As análises realizadas evidenciam, desse modo, que a

presença de apenas um núcleo indol com grupamentos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio torna a estrutura mais privilegiada na ligação ao DNA.

Em uma análise comparativa dos valores de K_b entre os derivados estudados, verificou-se, ainda, que a presença do átomo de bromo no indol pode estar contribuindo para a diminuição do valor dessa constante (tabela 4). É visto que, compostos halogenados apresentam ligações de halogênio que, em geral, ocorrem com bases de Lewis constituídas por oxigênio em carbonila, hidroxila ou grupos fosfatos (FOURMIGUE, 2009), estabilizando a estrutura do ligante alvo e aumentando a afinidade ao mesmo (AUFFINGER et al., 2004). Notavelmente, as considerações provenientes de nossos resultados são divergentes destes comportamentos estudados. É sugerido que, o maior volume representado pelo átomo de bromo pode causar impedimento das ligações com grupamentos fosfatos do DNA, o que conduziu a menores valores de constante de ligação para estes derivados.

Ainda para explorar a influência do átomo de bromo nos derivados, foi analisando o valor de $\log P$ (tabela 4) dos mesmos. Certificando-se com o que relata a literatura (KORTAGERE et al., 2008), que a presença de grupos halogenados são úteis no aumento da lipofilia dos compostos, porém, muitas vezes, pode levar a efeitos indesejáveis, incluindo a toxicidade e, no caso, a uma menor constante de ligação ao DNA.

Compostos halogenados são considerados importantes inibidores de proteínas envolvidas na carcinogênese e, muitas vezes, a estabilidade conferida pela molécula halogenada conduz a um aumento da afinidade de ligação ao receptor, transportador ou a outra proteína alvo do câncer (SCHOLFIELD et al., 2013). A presença de átomos de halogênios pode também promover perturbações conformacionais significativas em biomoléculas (FOURMIGUÉ, 2009), como por exemplo na estrutura do ácido nucleico.

4.8.2 Espectroscopia de Fluorescência

Para um análise mais aprofundado do modo de ligação, parâmetros de ligação correspondentes foram avaliados por meio da espectroscopia de fluorescência. Estudos realizados com a espectroscopia de emissão de luz já foi elaborado por nosso grupo de pesquisa com derivados de acridinas (LAFAYETTE et al. 2013), mostrando ser uma técnica eficiente na investigação da capacidade de derivados químicos em interagir com o DNA, observando a supressão da emissão de fluorescência. Devido a isto, resolvemos

utilizar uma outra abordagem da espectroscopia de fluorescência para elucidar a ligação ao DNA.

4.8.2.1 Propriedade de ligação dos derivados Lqit/SEs no complexo BE-DNA

Soluções com BE-ctDNA (10 μM e 100 μM , respectivamente) e quantidades crescentes de derivados indólicos (20-200 μM) foram preparadas para análise da afinidade e modo de interação ao DNA.

Quando os derivados são adicionados à solução de complexo BE-ctDNA, a intensidade de emissão do complexo diminui com o aumento da concentração dos derivados. Tal efeito, indica que o deslocamento do BE pelos derivados indólicos por causa da exclusão do BE intercalado ao DNA, de modo que a concentração de BE ligado ao DNA diminui (LI et al., 2010). O que resulta na supressão da intensidade de fluorescência a medida que ocorre o aumento da concentração dos indóis na solução.

Espectros de emissão do sistema BE-ctDNA na presença de quantidades crescentes dos derivados indólicos são mostrados nas figuras 35 e 36, abaixo.

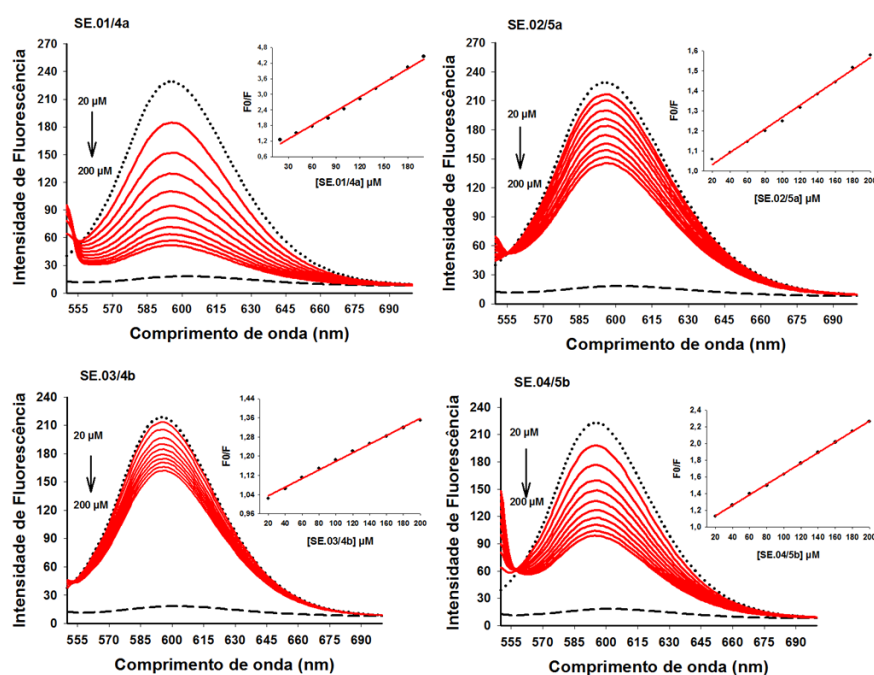


Figura 35. Espectros de emissão do BE (10 μM) ligado ao ctDNA (100 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados Lqit/SE.01, SE.02, SE.03 e SE.04 (—). A linha tracejada (---) é o espectro de emissão do BE livre. A seta ($\downarrow$) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (20 a 200 μM) à temperatura ambiente. Inserção: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) versus concentração do derivado (Q).

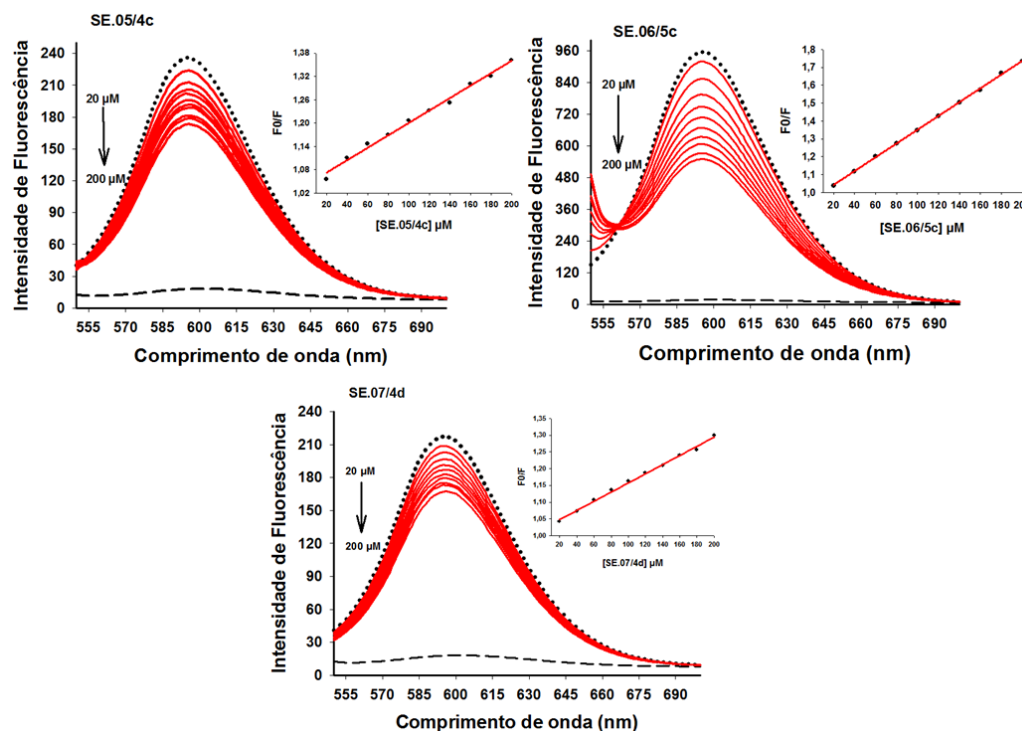


Figura 36. Espectros de emissão do BE (10 μM) ligado ao ctDNA (100 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados Lqit/SE.05, SE.06 e SE.07 (—). A linha tracejada (---) é o espectro de emissão do BE livre. A seta ($\downarrow$) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (20 a 200 μM) à temperatura ambiente. Inserção: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) versus concentração do derivado (Q).

Na análise dos espectros, é claramente visto a diminuição da emissão de fluorescência a medida que ocorre aumento da concentração dos derivados indólicos no sistema de BE-ctDNA. Esta diminuição da fluorescência indica a competição com BE no modo de ligação ao DNA (ANITHA, 2013).

Segundo Bi e colaboradores (2008) há três razões possíveis que conduzem ao comportamento da diminuição da fluorescência para o sistema BE-DNA após a adição dos derivados. Em primeiro lugar, pode ocorrer uma ligação entre o BE e os compostos indólicos, conduzindo à diminuição da intensidade do complexo BE-DNA. Em segundo lugar, os derivados indólicos competem com o BE para ligação ao DNA e exclui o BE intercalado na dupla hélice do DNA, de modo que a concentração de BE ligado ao DNA diminui. Esta ligação ocorre geralmente por competição na intercalação entre os dois ligantes. Em terceiro lugar, a adição dos derivados conduz a formação de um novo

complexo BE-ctDNA-Indol não-fluorescente, o que conduz a supressão da fluorescência.

Neste experimento, foi verificado a não alteração do espectro de fluorescência do BE quando na presença de indóis, o que descarta a possibilidade da primeira hipótese. A segunda hipótese seria a mais provável, onde os derivados indólicos competem com o BE para ligar-se ao DNA, o que causa a diminuição da fluorescência. Porém, sabe-se que a constante de ligação do BE com o DNA é de $5,16 \times 10^5$ (GENG et al., 2013), e nenhum dos derivados indólicos apresentaram valor da constante superior a este valor (Tabela 2), o que torna improvável a substituição do BE no complexo por algum derivado indol.

Assim, a terceira razão seria a mais provável, de maneira que os derivados interagem com BE-ctDNA formando um novo complexo BE-ctDNA-Indol não-fluorescente, onde a ligação dos indóis ocorre através de interações nos sulcos (QIAO et al., 2008). Um efeito semelhante de extinção da fluorescência do BE ligado ao DNA tem sido observado para a adição de vários compostos de ligações nos sulcos tais como Netropsin e Distamicina A (ALI e BHATTACHARYA, 2014). A ligação de complexos nos sulcos do DNA, em determinadas circunstâncias, pode conduzir à extinção da emissão de BE (PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007), o que concretiza que os derivados analisados estão ligados ao DNA pelo modo de ligação nos sulcos.

A fim de compreender quantitativamente o comportamento da extinção, a magnitude da supressão de fluorescência do complexo BE-ctDNA foi analisada pela equação de Stern-Volmer, através da constante de supressão de fluorescência (K_{sv}), a qual é determinada por regressão linear do gráfico da intensidade de emissão relativa (F_0/F) versus a concentração dos derivados (Q) (LAKOWICZ, 2006) (Figura 37). Na tabela 2, os valores da constante K_{sv} dos compostos são mostrados.

Os derivados conduziram a diminuição da emissão de fluorescência do sistema BE-ctDNA, e conforme os valores de K_{sv} , a supressão mais pronunciada foi demonstrada para o derivado SE.01 (1.81×10^4). Fenômenos que conduzem a supressão da emissão refletem a interação dos compostos ao DNA, condizente com os resultados mostrados pela análise da espectroscopia de absorção (PALCHAUDHURI e HERFENROTHER, 2007).

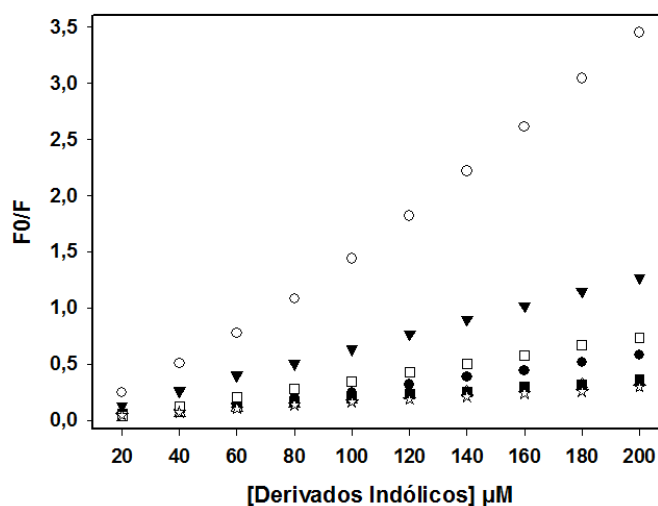


Figura 37. Intensidade de fluorescência relativa de derivados indólicos: SE.01 ($\circ$), SE.02 ($\bullet$), SE.03 (Δ), SE.04 ($\blacktriangledown$), SE.05 ($\blacksquare$), SE.06 ($\square$) e SE.07 ($\star$), no complexo ctDNA-BE em tampão Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6).

Assim como na análise espectroscópica de absorção, o SE.01 apresentou o maior valor para a supressão de emissão, assegurando a participação do grupamento amino na interação com os pares de bases de DNA, pela formação de ligações de hidrogênio. Estudos com sequências específicas de DNA podem melhor elucidar a afinidade das moléculas derivadas de indóis, por meio da verificação do sítio mais provável de ligação das moléculas com as bases de DNA (BENNER e IHMELS, 2014). Além disso, constatou-se a participação do átomo de bromo na extinção da fluorescência, provavelmente pelo volume representado por este átomo no complexo BE-ctDNA (FAULHABER et al., 2011), perceptível através da Ksv com valores elevados de 6.31×10^3 , 3.86×10^3 e 2.96×10^3 para os derivados Lqit/SE.04, SE.06 e SE.02, respectivamente.

4.8.2.2 Propriedade de ligação dos derivados Lqit/TEs ao DNA

Estudos de fluorescência dos derivados indólicos Lqit/TEs foram, também, realizados para analisar as propriedades de ligação com ctDNA. A Tabela 1 resume a emissão de fluorescência a partir dos derivados sob investigação. Compostos Lqit/TEs exibiram uma banda de emissão na gama de 310-700 nm, comprimentos de onda de excitação de 220-320 nm, e os espectros foram monitorizadas a uma concentração fixa de 15 μM de cada derivado e diferentes concentrações ctDNA.

Derivados Lqit/TE.01, Lqit/TE.02 e Lqit/TE.05 evidenciaram redução na emissão de fluorescência com o aumento crescente da concentração de ctDNA. Enquanto que, o derivado Lqit/TE.04 mostrou aumento da emissão de fluorescência na presença crescente de ctDNA (Figura 39). Em geral, o aumento da intensidade de fluorescência pode ser explicada por uma supressão significativa da flexibilidade conformacional do ligando no complexo DNA-ligante (FAULHABER et al., 2011).

O comportamento da extinção de fluorescência, analisada pela constante de Stern-Volmer (K_{sv}), determina a sequência de ordem: Lqit/TE.01 > Lqit/TE.02 > Lqit/TE.05 > Lqit/TE.04. A supressão mais pronunciada do derivado Lqit/TE.01 demonstra um valor de $1,89 \times 10^4$, demais valores das constantes de Stern-Volmer são mostrado na tabela 3. Fenômenos que conduzem a supressão da emissão refletem a interação dos compostos ao DNA, condizente com os resultados mostrados pela análise da espectroscopia de absorção (PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007).

Assim como, na extinção da fluorescência dos derivados indólicos Lqit/SEs, foi possível verificar a participação do átomo de bromo na extinção da fluorescência dos derivados Lqit/TE.02 e Lqit/TE.04, provavelmente pelo volume representado por este átomo na ligação com o ctDNA (FAULHABER et al., 2011).

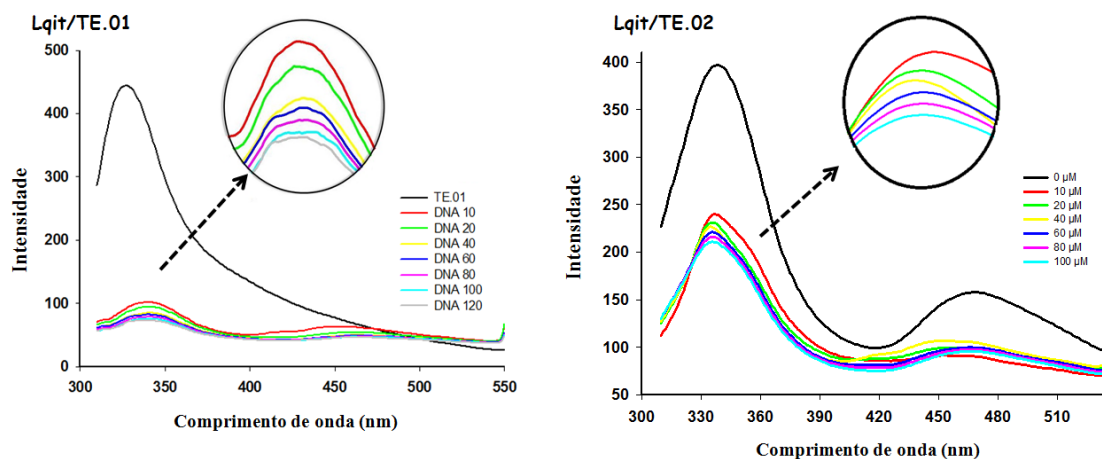


Figura 38. Espectro de emissão de fluorescência dos derivados Lqit/TE.01 e Lqit/TE.02 (15 µM) em quantidades crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM.

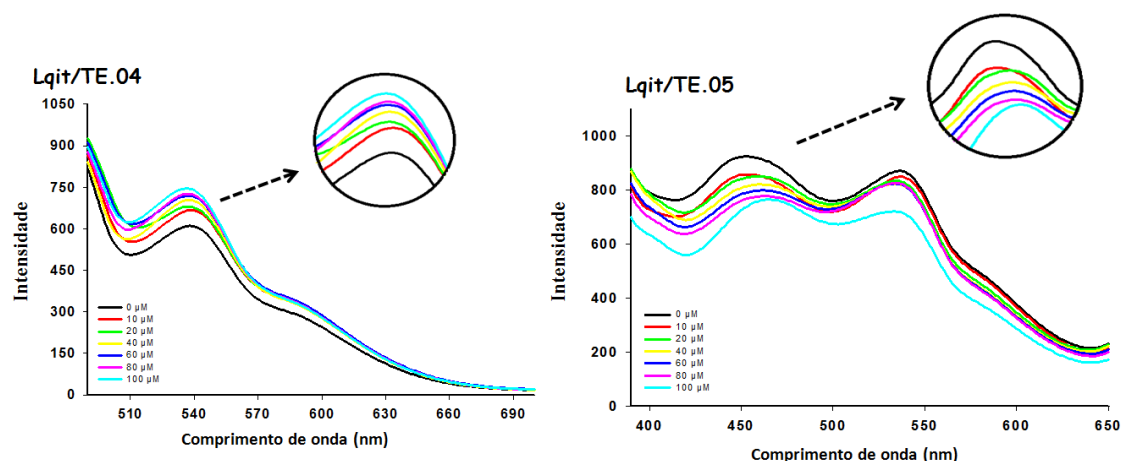


Figura 39. Espectro de emissão de fluorescência dos derivados Lqit/TE.04 e Lqit/TE.05 (15 μ M) em quantidades crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ M.

4.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO - ANTITOPISOMERASE

Estruturas heterocíclicas tem sido um foco estrutural principal no desenvolvimento de agentes quimioterápicos, em especial antitumoral. O anel da tiazolidina e rodanina tem sido utilizado como andaime para desenvolver novos agentes com um largo espectro de citotoxicidade contra células cancerosas humana (BAN et al., 2010; AZIZMOHAMMADI et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa já constatou que o acoplamento do anel acridínico com núcleos da tiazolidina e imidazolidina, conduziu a compostos promissores no desenvolvimento de inibidores da topoisomerase I (LAFAYETTE et al., 2013; BARROS et al., 2013).

Diante disto, foi realizado o estudo da capacidade dos novos derivados indólicos sintetizados em inibir a enzima topoisomerase I humana. A fim de, aumentar o conhecimento sobre a possível relação estrutural entre derivados e a capacidade de inibir a enzima topoisomerase do tipo I.

A evidência da participação do grupamento amino, presente na estrutura dos derivados Lqit/SEs, nos resultados da interação com o DNA e na da atividade antiproliferativa em ambas linhagens de leucemia testadas, nos induziu a selecionar o derivado indólico Lqit/SE.01 para realizar o estudo da capacidade de inibir a enzima topoisomerase I humana, a fim de averiguar um possível mecanismo de ação para esse derivado. Assim como, o destaque na atividade antiproliferativa frente as linhagens de leucemia testadas do composto Lqit/TE.04 dentre os derivados Lqit/TEs, conduziu na escolha deste derivado para análise da inibição da enzima topoisomerase I.

O derivado Lqit/SE.01 e Lqit/TE.04 analisados não mostraram atividade inibitória da topoisomerase I nas concentrações de 10 e 50 μ M testados. Na figura 40, é visto que a fração do DNA superhelicoidal foi completamente relaxado pela enzima topoisomerase I. O resultado evidencia que, ambos os derivados indólicos analisados não tem seu mecanismo de ação antitumoral baseado na atividade da enzima topo I.

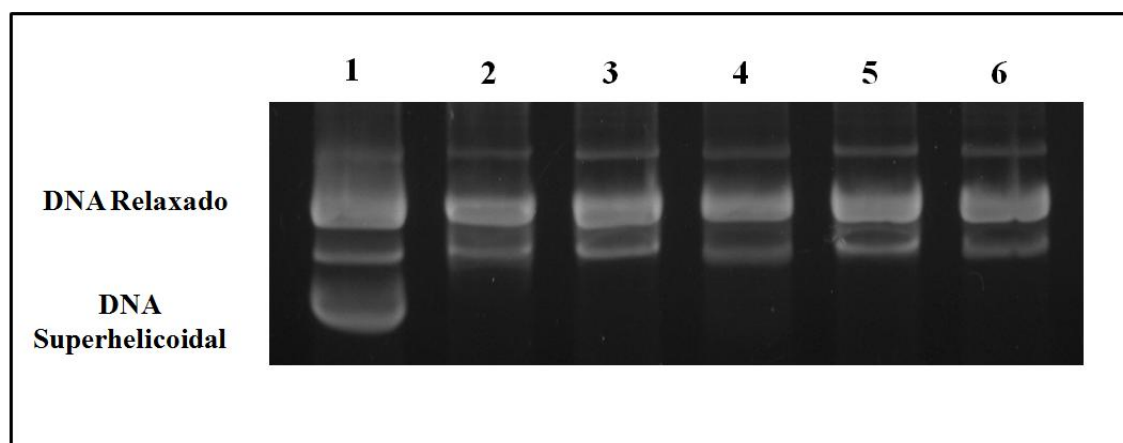


Figura 40. Ensaio da Inibição da Topoisomerase I dos derivados indólicos Lqit/SE.01 e Lqit/TE.04

Linha 1. DNA pUC19; Linha 2. DNA pUC19 + Topoisomerase I; Linha 3. DNA pUC19 + Topoisomerase I + derivado SE.01 (10 μ M); Linha 4. DNA pUC19 + Topoisomerase I + derivado SE.01 (50 μ M); Linha 5. DNA pUC19 + Topoisomerase I + derivado TE.04 (10 μ M); Linha 6. DNA pUC19 + Topoisomerase I + derivado TE.04 (50 μ M).

Sherer and Snaper (2015) mostraram, em um estudo de revisão, que os indóis apresentam uma vasta gama de alvos biológicos: previne a progressão do ciclo celular normal por inibição da enzima topoisomerase, evita a sinalização celular (inibidores de PKC e inibidores de transdução de sinal), induz o estresse oxidativo á célula (geradores de espécies de oxigênio), previne a vascularização de tumores (inibidores da angiogênese) e induz a morte celular conhecida como methuosis. Além de, representarem compostos com estrutura privilegiada com possível atividade antiviral (ZHANG, CHEN AND YANG, 2015) e anti-inflamatória (RAPOLU et al., 2013).

*SÍNTESE, LIGAÇÃO COM O DNA E ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS DE
ACRIDINA*

5. SÍNTESE, LIGAÇÃO COM O DNA E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS DE ACRIDINA

O núcleo da acridina é amplamente utilizado como porção principal para modificações estruturais, a partir da inserção de diferentes ligantes substituídos. Intermediários tiossemicarbazidas foram, inicialmente, obtidos por reação entre hidrazina e diferentes isotiocianatos; e, posteriormente, submetidos a reação com a 9-acrinaldeído. Novos derivados da série 2-(acridin-9-il-metileno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida foram obtidos por rota de síntese eficaz e caracterizados estruturalmente através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas convencionais. A atividade antiproliferativa foi realizada por método de sulforrodamina B, frente a linhagens de células de câncer. Técnicas de espectroscopia de absorção de UV-Vis e emissão de fluorescência foram utilizadas na avaliação das propriedades de ligação com o DNA. Efeitos hipocrômicos e hiper-crômicos, assim como, desvio para a região do vermelho e do azul foram demonstrados por adição de DNA aos derivados acridínicos. Valores da constante de ligação com o DNA foram calculados e evidenciaram uma alta afinidade aos pares de bases do DNA. O derivado acridínico que apresentou maior capacidade de interação com o DNA tem como substituinte o grupo 4-clorofenil. Enquanto que, o composto mais ativo no ensaio antiproliferativo possui o grupamento fenil. Correlação entre a atividade anti-proliferativa e a ligação com o DNA não foram constatados. Entretanto, os resultados são sugestivos de que o mecanismo reacional envolvido na atividade biológica ocorre por interação com a molécula de DNA.

5.1 METODOLOGIA - QUÍMICA

5.1.1 Materiais e Equipamentos

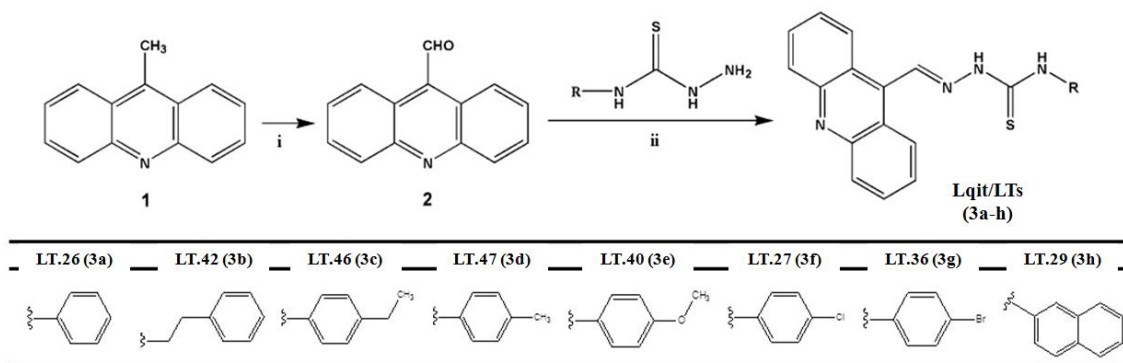
Os reagentes comuns utilizados para a síntese e análise dos derivados acridínicos foram: hidrato de hidrazina, fenil-, 4-tolil-, 4-clorofenil-, 1-naftil-, 4-bromofenil-, 4-metoxifenil-, 4-etilfenil- e 2-feniletil-isotiocianato. Como solventes: ácido monocloroacético, etanol, metanol, dimetilsulfoxido (DMSO), ácido acético, acetato de etila, n-hexano e morfolina. Todos, reagentes e solventes, fornecidos pela Sigma, Aldrich, Fluka e Merck..

Na cromatografia de camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel F254 da Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Na determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho em tubo capilar Modelo Quimis 340.27 (Quimis, Brasil). Para caracterização estrutural dos compostos químicos foi utilizado: Espectroscopia de Infravermelho (IV), registrados num espectrometro Bruker IFS66 (Bruker, Alemanha), pastilha de KBr; Espectrometria de Massas realizado num espectrometro de massa de ionização por dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (MALDI-TOF-EM), no modelo Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA); Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C) realizados em Modelo Varian Plus Spectrofotometro (Varian, EUA) a 300 MHz e 400 MHz, em solvente DMSO- d_6 .

5.1.2 Procedimento experimental de obtenção dos derivados de Acridina (Lqit/LTs)

A reação utilizada para a síntese de novos compostos acridina-tiosemicarbazona é mostrado no Esquema 14. O composto 9-metilacridina foi preparado a partir de difenilamina com dicloreto de zinco em ácido acético de acordo com Tsuge et al (1963). Subsequentemente, a oxidação de um clorocromato de piridínio (PCC) foi conseguida de acordo com Mosher e Natale (1995), originando 9-acridinaldeído. Posteriormente, a 9-acridinaldeído foi utilizado como reagente de partida na síntese de diferentes tipos de derivados de acridina-tiosemicarbazona.

Os derivados tiosemicarbazidas: N-fenilhidrazinacarbotioamida; N-(4-clorofenil)hidrazinacarbotioamida; N-(naftilane-1-il)hidrazinacarbotioamida; N-(4-bromofenil)hidrazinacarbotioamida; N-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida; N-(p-tolil)hidrazinacarbotiamida; N-(4-etilfenil)hidrazinacarbotioamida, foram preparados de acordo com o procedimento publicado (GURSOY et al., 1997; LIENSE et al., 2010). Tiosemicarbazidas foram sintetizados com bom rendimento (>90%), por adição de hidrato de hidrazina a diferentes isotiocianatos (GURSOY et al., 1997).



Esquema 14. Síntese de derivados acridínicos-tiosemicarbazone. Reagentes e condições: (i) clorocromato de piridínio (PCC); (ii) Etanol, Ácido acético, refluxo, 70° C.

O composto 9-acridinaldeído (1.0 equivalente) e o derivado tiosemicarbazida (1.0 equivalente) específico, foram submetidos ao refluxo em etanol na presença de ácido acético e aquecimento a 70° C, durante 24h. Após este período, a mistura foi filtrada e lavada com água e etanol. Assim, a condensação de diferentes derivados de tiosemicarbazida com 9-acridinaldeído proporcionou os correspondentes derivados acridina-tiosemicarbozona.

5.2 METODOLOGIA: ANTI-PROLIFERATIVO

5.2.1 Antiproliferativo por Ensaio de Sulforrodamina B

Nove linhagens de células de câncer humano: U251 (glioma, SNC), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência à múltiplas drogas), 786-O (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (adenocarcinoma do cólon) e K-562 (leucemia mieloide crônica), e uma linhagem de célula normal HaCat (queratinócitos humanos) foram gentilmente cedidas pelo Centro de Desenvolvimento e Pesquisa de câncer Frederick, Instituto Nacional de Câncer, Frederick, MA, EUA. As culturas de reserva foram cultivadas em 5 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com soro de bovino fetal a 5% (FBS, Gibco BRL). penicilina: mistura de estreptomicina 1000 U/mL: 1000 µg/mL (1mL/L de meio RPMI-1640) foi adicionado a culturas experimentais. As células em placas de 96 poços foram expostas a diferentes concentrações de amostras (0.25, 2.5, 25 e 250 µg/mL em DMSO/meio RPMI/FBS a 5% em 37° C, 5% de CO₂, durante 48h. As células foram então fixadas com solução de ácido tricloroacético (50%, v/v) e a

proliferação de células foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular utilizando o ensaio de sulforrodamina B (MONKS et al., 1991). A doxorubicina (DOX; 0.025-25 µg/mL) e m-AMSA na mesma concentração foram utilizadas como um controle positivo. Obtiveram três medições: no início da incubação (T0) e 48h pós-incubação durante livre de compostos (C) e as células testadas (T).

A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação:

$$\text{Proliferação celular} = 100 \times [(T - T_0) / C - T_0] \quad (3)$$

O efeito citostático foi observada quando $T_0 \leq T < C$, enquanto que o efeito citocida ocorreu quando $T < T_0$. A partir da curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, os valores de GI50, TGI e LC50 foram determinados através de análise de regressão não-linear utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.3 METODOLOGIA - ENSAIO COM O DNA

5.3.1 Materiais e Equipamentos

Foi utilizado solvente DMSO na preparação das soluções mãe e tampão Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6) na análise das interações com DNA. DNA de timo de bovino (ctDNA) obtido da Sigma Aldrich. Os aparelhos empregados na análise de obtenção dos espectros de Ultravioleta-visível (UV-vis) e de emissão de fluorescência foram o Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO e o Espectrofluorímetro de JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão), respectivamente.

5.3.2 Experimentos de ligação com o DNA

5.3.2.1 Preparação de ct-DNA

Titulações de espectros UV-Vis foram desenvolvidas utilizando tampão Tris 0,01 M, pH 7,6. DNA de timo de bovino (ctDNA) foi comprado na Sigma e utilizado sem purificação adicional. A solução de ctDNA em tampão Tris foi sonicada durante 5

min e a concentração foi determinada utilizando os coeficientes de extinção molares $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (WOLF et al., 1987). A pureza do DNA foi determinada através da monitorização do valor da relação de A_{260} / A_{280} .

5.3.2.2. Espectroscopia de absorção eletrônica

Todos os derivados acrdínicos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução-mãe) a partir do qual as soluções de trabalho foram preparadas por diluição utilizando tampão Tris-HCl, com concentrações entre 10 e 80 μM .

Sob concentração otimizada, os compostos foram expostos a concentrações crescentes do ctDNA. Antes das medições, o sistema foi agitado e incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. As medições foram realizadas numa cubeta de quartzo retangular com um comprimento do percurso de 1cm.

A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida por ajuste dos dados à equação 1 (MCGEE AND VON HIPPEL, 1974):

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

onde, E_a , E_b e E_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. O gráfico da $[\text{DNA}]/(E_a - E_f)$ versus $[\text{DNA}]$ foi utilizado para obtenção do K_b a partir da razão entre a inclinação e o intercepto. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

5.3.2.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência

As medições de fluorescência dos derivados acridina-tiosemicarbazona foram realizadas em solução de concentrações 15 μM em tampão Tris 0,01M, pH 7,6. Espectros de emissão foram registrados na região de 380-600 nm usando um comprimento de onda de excitação de 356nm-364nm. Todas as medições foram realizadas a 25° C numa cubeta de quartzo retangular com um comprimento de caminho de 1 cm. As intensidades de fluorescência foram expressos em unidades arbitrárias. As titulações de fluorescência foram realizadas por adição de quantidades crescentes de ctDNA (0-120 μM) diretamente dentro da solução contendo os derivados. Intensidades de fluorescência dos compostos exposto a diferentes concentrações de ctDNA foram

usadas para calcular a constante de Stern-Volmer, K_{sv} , pela seguinte equação (LAKOWICZ, 2006):

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário de compostos na ausência e na presença de inibidor (ctDNA), K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração de inibidor.

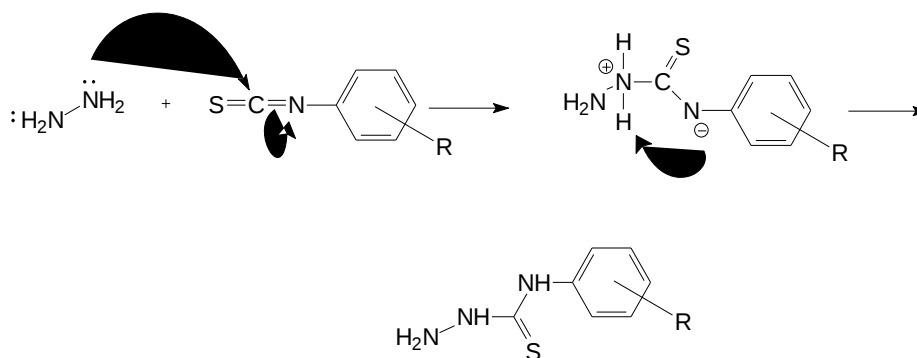
5.4 METODOLOGIA - Determinação do valor de log P

Os valores de log P dos derivados foram obtidos usando o programa ChemSketch 12.0 Desenvolvimento Químico Avançado.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO - QUÍMICA

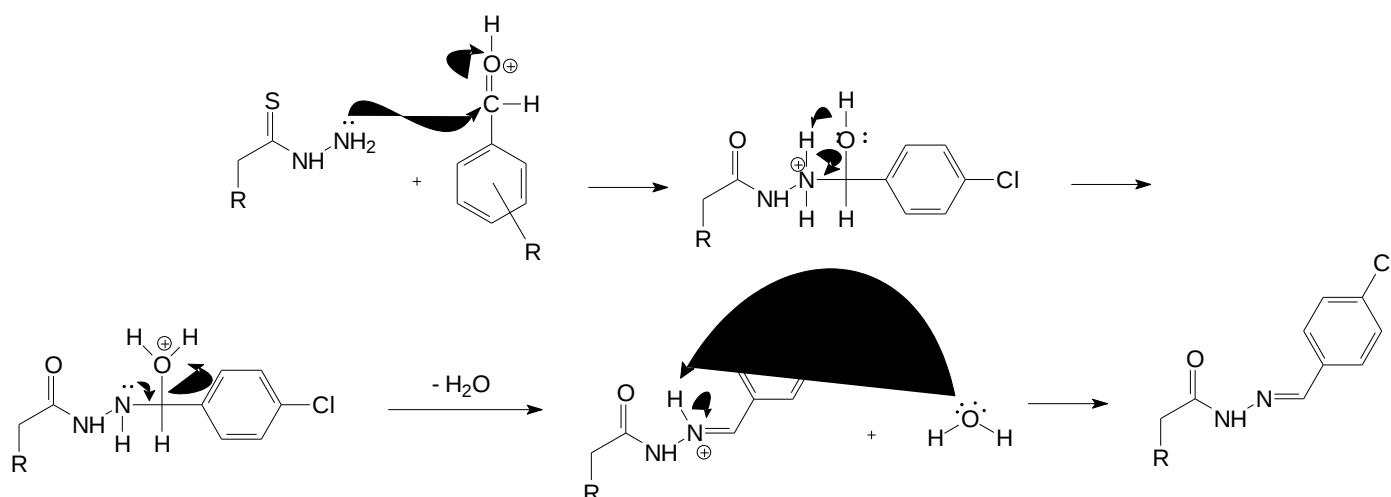
5.5.1 Mecanismo Reacional dos Derivados Acridínicos

A síntese dos derivados acridínicos ocorre através de duas etapas. Inicialmente, procedeu-se com a reação de formação dos intermediários tiossemicarbazidas substituídas, o qual caracteriza-se por ataque simultâneo do nitrogênio da hidrazina ao carbono da tiocarbonila, e deslocalização dos elétrons π para o nitrogênio vizinho. Seguido por, um balanço de cargas onde o nitrogênio rico em elétrons desprotona o nitrogênio com carga positiva, conduzindo ao derivado tiossemicarbazônico (Esquema 15).



Esquema 15. Mecanismo de formação dos compostos intermediários

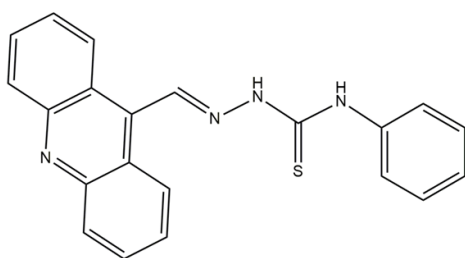
Numa etapa posterior, a síntese para obtenção dos compostos finais caracteriza-se por uma reação de condensação. A função aldeído do compostos aromático de escolha é ativado por meio do ácido presente na reação, isto é, a carbonila do grupo aldeído é protonada. Em seguida, o par de elétrons livres, presente no nitrogênio da hidrazina, ataca o carbono positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo (Esquema 16).



Esquema 16: Mecanismo de formação dos compostos acridina-tiossemicarbazonas.

5.5.2 Dados espectroscópicos dos Derivados Acridínicos

(*Z*)-2-(Acridin-9-ilmetil)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (Lqit/LT.26 - 3a)



Lqit/LT.26 (3a)

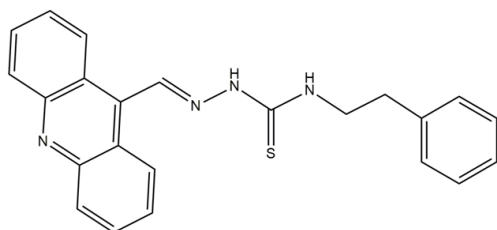
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.19 (t, 1H, fenil, $J = 7.5$ Hz), 7.36 (t, 2H, fenil, $J = 7.8$ Hz), 7.60 (d, 2H, fenil, $J = 7.8$ Hz), 7.72 (t, 2H, acridina, $J = 8.4$ Hz), 7.89 (t, 2H, acridina, $J = 8.4$ Hz), 8.20 (d, 2H, acridina, $J = 8.7$ Hz), 8.61 (d, 2H, acridina, $J = 8.7$ Hz), 9.39 (s, 1H, =CH), 10.23 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 123.3, 123.9, 124.9, 125.1, 126.9, 127.9, 128.4, 129.5, 130.8, 130.2, 134.6, 138.8, 139.8, 148.1, 176.3.

IR (cm^{-1}): 3114 (C-H), 3500 (NH), 1202 (C=S).

MS (m/z): calculado = 357.1129; encontrado = 357.124

(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-phenethylhydrazinecarbothioamide (Lqit/LT.42 - 3b)



Lqit/LT.42 (3b)

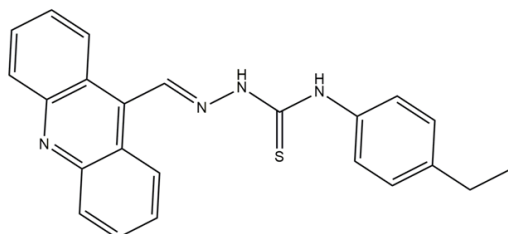
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2.93 (t, 3H, $J = 10.4\text{Hz}$, CH_3), 3.80 (q, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, CH_2), 7.27–7.18 (m, 5H, fenil), 7.68 (t, 2H, $J = 10.0\text{Hz}$, acridina), 7.88 (t, 2H, $J = 9.6\text{Hz}$, acridina), 8.19 (d, 2H, $J = 11.6$, acridina), 8.49 (d, 2H, $J = 10.8$, acridina), 8.50 (s, 1H, $=\text{CH-}$), 9.27 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 34.92, 45.67, 123.88, 125.66, 125.66, 126.64, 126.64, 127.59, 127.59, 128.88, 128.88, 129.12, 129.12, 130.18, 130.18, 130.76, 130.76, 135.48, 139.56, 139.68, 148.71, 148.71, 177.77.

IR (cm^{-1}): 3667.95 (NH), 3140.25 (NH), 1520.45 (C=S).

MS (m/z): calculado = 385.1442; encontrado = 385.134.

(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-ethylphenyl)hydrazinecarbothioamide (Lqit/LT.46 - 3c)



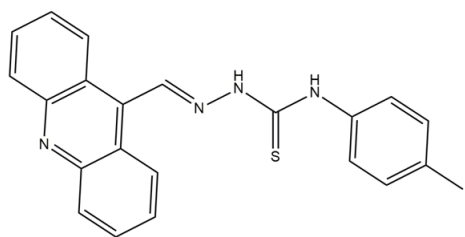
Lqit/LT.46 (3c)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.18 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$, CH_3), 2.57 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$, CH_2), 7.18 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridina), 7.48 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridina), 7.71 (t, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$, acridina), 7.89 (t, 2H, $J = 6.8\text{Hz}$, acridina), 8.20 (d, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, fenil), 8.60 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, fenil), 9.38 (s, 1H, $=\text{CH-}$), 10.08 (s, 1H, NH), 12.16 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 15.66, 27.70, 123.47, 123.47, 125.33, 125.33, 125.40, 125.40, 127.16, 127.16, 127.38, 127.38, 129.67, 129.67, 130.32, 130.32, 134.86, 136.57, 139.81, 140.91, 148.23, 148.23, 176.43.

IR (cm^{-1}): 1536.91 (C=S), 2968.91 ($=\text{CH-}$), 3125.53 (NH), 3400.00 (NH).

MS (m/z): calculado = 385.1442; encontrado = 385.131.

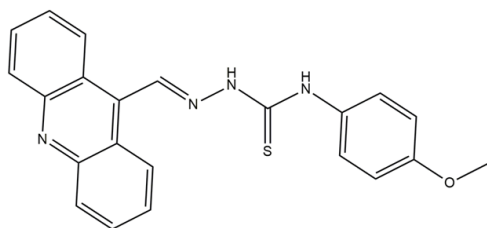
(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(p-tolyl)hydrazinecarbothioamide (Lqit/LT.47 - 3d)**Lqit/LT.47 (3d)**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2.29 (s, 3H, CH_3), 7.15 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridina), 7.45 (d, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridina), 7.71 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridina), 7.89 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridina), 8.20 (d, 2H, $J = 9.2\text{Hz}$, fenil), 8.60 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, fenil), 9.38 (s, 1H, =CH–), 10.01 (s, 1H, NH), 12.15 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 20.56, 123.48, 123.48, 125.34, 125.34, 125.37, 125.37, 127.16, 127.16, 128.56, 128.56, 129.68, 129.68, 130.32, 130.32, 134.55, 134.89, 136.37, 139.80, 148.25, 176.48.

IR (cm^{-1}): 3671.99 (NH), 3129.28 (NH), 1534.92 (C=S).

MS (m/z): calculado = 371.1286; encontrado = 371.120.

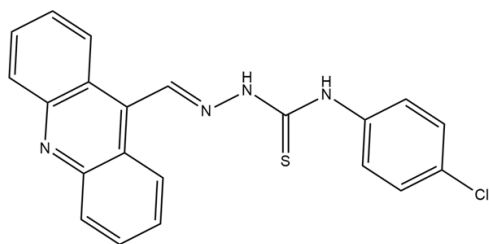
(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-methoxyphenyl)hydrazinecarbothioamide (Lqit/LT.40 - 3e)**Lqit/LT.40 (3e)**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 6.91 (m, 2H, acridina), 7.46 (m, 2H, acridina), 7.70 (m, 2H, fenil), 7.87 (m, 2H, fenil), 8.19 (m, 2H, acridina), 8.60 (m, 2H, acridina), 9.38 (s, 1H, =CH–), 9.25 (s, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 55.09, 113.21, 113.21, 123.32, 123.32, 125.09, 125.09, 126.69, 126.69, 126.86, 126.86, 129.50, 129.50, 129.99, 129.99, 131.69, 134.66, 139.57, 148.11, 148.11, 156.83, 176.67.

IR (cm^{-1}): 1514.52 (C=N), 1533.44 (C=S), 3138.17 (NH), 3320.32 (NH).

MS (m/z): calculado = 387.1235; encontrado = 387.073.

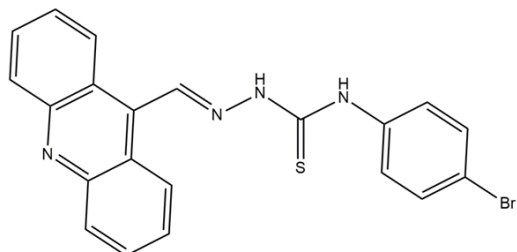
(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-chlorophenyl)hydrazinecarbothioamide**(Lqit/LT.27 - 3f)****Lqit/LT.27 (3f)**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7,40 (d, 2H, fenil, $J = 6.8\text{Hz}$), 7.63 (d, 2H, fenil, $J = 7.6\text{Hz}$), 7.72 (t, 2H, acridina, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.89 (t, 2H, acridina, $J = 7.2\text{Hz}$), 8.21 (d, 2H, acridina, $J = 9.2\text{Hz}$), 8.59 (d, 2H, acridina, $J = 8.4\text{Hz}$), 9.39 (s, 1H, $=\text{CH-}$), 10.23 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 123.3, 123.9, 124.9, 125.1, 126.9, 127.9, 128.4, 129.5, 130.8, 130.2, 134.6, 138.8, 139.8, 148.1, 176.3.

IR (cm^{-1}): 3114 (C-H), 3500 (NH), 1202 (C=S).

MS (m/z): calculado = 391.0739; encontrado = 391.041.

(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-bromophenyl)hydrazinecarbothioamide**(Lqit/LT.36 - 3g)****Lqit/LT.36 (3g)**

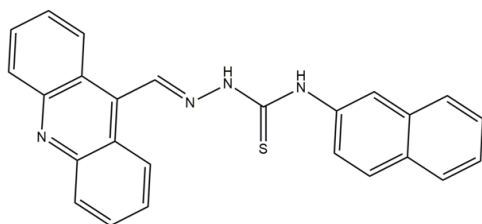
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.56 (q, 4H, fenil, $J = 8.8\text{Hz}$), 7.75 (t, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridina), 7.94 (t, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$, acridina), 8.23 (d, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, acridina), 8.62 (d, 2H, $J = 8.8\text{Hz}$, acridina), 9.40 (s, 1H, $=\text{CH-}$), 10.24 (s, 1H, NH), 12.31 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 117.60, 117.60, 123.52, 123.52, 123.52, 123.52, 125.51, 125.51, 127.34, 127.34, 127.45, 127.45, 127.45, 127.45, 130.91, 130.91, 130.91, 138.38, 140.05, 140.05, 176.48.

IR (cm^{-1}): 3350.00 (NH), 3128.54 (NH), 1539.02 (C=S).

MS (m/z): calculado = 436.0180; encontrado = 436.968.

(Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide
(Lqit/LT.29 - 3h)



Lqit/LT.29 (3h)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.49 (t, 2H, $J = 8.1\text{Hz}$, acridina), 7.58–7.54 (m, 3H, naftil, 7.61 (t, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridina), 7.78–8.50 (m, 3H, naftil), 8.17 (d, 2H, $J = 7.8\text{Hz}$, acridina), 8.28–8.32 (m, 1H, naftil), 8.82 (d, 2H, $J = 8.7\text{Hz}$, acridina), 9.51 (s, 1H, =CH–), 10.49 (s, 1H, NH), 12.41 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 157.95, 136.69, 133.85, 133.85, 133.85, 128.29, 128.29, 127.59, 126.04, 126.04, 126.04, 126.04, 125.63, 125.63, 125.63, 125.27, 125.27, 125.27, 123.56, 123.56, 122.69, 122.69, 121.91, 121.91, 115.37.

IR (cm^{-1}): 3309.48 (NH), 3199.93 (NH), 1471.72 (C=S), 1212.81 (C–N).

MS (m/z): calculado = 407.1286; encontrado = 407.024.

5.5.3 Características físico-químicas dos Derivados Acridínicos

As características físico-químicas de cada derivado acridínicos são apresentadas na Tabela 5. Os compostos demonstraram ponto de fusão na faixa de pureza e bons rendimentos variáveis entre 65 a 98 %.

Tabela 5. Características físico-químicas dos derivados acridínicos

Compostos	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Aspecto	Rdt (%)	Ponto de Fusão (° C)	Rf (n-hexano/EtOAc)
LT.26 (3a)	C ₂₁ H ₁₆ N ₄ S	356.44	Sólido amarelo	65	208-209	0.55 (7:3)
LT.42 (3b)	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ S	384.49	Sólido amarelo	97	220-221	0.48 (8:2)
LT.46 (3c)	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ S	384.49	Sólido verde	98	213-214	0.6 (7:3)
LT.47 (3d)	C ₂₂ H ₁₈ N ₄ S	370.47	Sólido amarelo	90	119-221	0.55 (7:3)
LT.40 (3e)	C ₂₂ H ₁₈ N ₄ OS	386.47	Sólido amarelo	82	219-220	0.43 (7:3)
LT.27 (3f)	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₄ S	390.88	Sólido amarelo	86.5	225-226	0.54 (7:3)
LT.36 (3g)	C ₂₁ H ₁₅ BrN ₄ S	435.34	Sólido amarelo	82	222-224	0.45 (7:3)
LT.29 (3h)	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ S	406.50	Sólido amarelo	32	208-210	0.55 (6:4)

5.6 RESULTADO E DISCUSSÃO - ANTIPROLIFERATIVO

Para determinar as propriedades antiproliferativas dos derivados Lqit/LTs (3a-h), a atividade antitumoral foi avaliada usando nove linhas celulares tumorais humanas diferentes: glioma (U251), leucemia (K-562), da mama (MCF7), mama resistente (NCI-ADR), rim (786-O), do pulmão (NCI-460), do ovário (OVCAR), da próstata (PC-3), e do cólon (HT-29) e uma linha celular de queratinócitos humanos normais (HaCat). Os compostos foram usados em concentrações compreendidas entre 0,25 e 250 µg/mL; doxorubicina (DOX) e m-AMSA foram utilizados como controles positivos. A análise da inibição do crescimento celular (GI) foi realizada utilizando o sulforrodamina B (SRB) ensaio.

A atividade anticâncer (µM) de um composto testado foi determinado por dois parâmetros para cada linha de células: GI₅₀ (concentração molar do composto que inibe o crescimento celular a 50%) e TGI (concentração molar do composto que conduz a uma inibição total do crescimento das células) (MONKS et al., 1991). O tipo de cadeia lateral influencia a atividade citotóxica de derivados de acridina (STEFANSKA et al., 2005). No caso dos derivados de acridina-tiosemicarbazona, a natureza do substituinte no anel de fenil influenciou significativamente a atividade antiproliferativa (Tabela 6).

O composto Lqit/LT.26 (3a) inibiu o crescimento de todas as linhas celulares de um modo dependente da dose, com valores de GI_{50} menores do que 10 μ M para todas as linhas de células de tumor. A seletividade de células de tumor não foi observada na inibição do crescimento, mas o padrão foi semelhante ao do controle positivo m-AMSA. No entanto, as concentrações GI_{50} do composto Lqit/LT.26 (3a) variaram amplamente entre 3 a 30 vezes mais elevados do que aqueles para o m-AMSA. Notavelmente, os derivados com grupos aceitadores de elétrons (LT.27, LT.36) e com substituintes doadores de elétrons (LT.46, LT.47, LT.40) apresentaram uma diminuição dramática na atividade antiproliferativa tal como demonstrado pelos valores de GI_{50} e TGI (Tabela 6). O composto Lqit/LT.42 (3b) contém um grupo etileno como espaçador entre o átomo de nitrogênio do radical tiossemicarbazona (acridina -C=N-N-C(S)-N) e o anel fenil que influenciou negativamente a atividade antiproliferativa quando comparado com o derivado Lqit/LT.26 (3a), tal como indicado pela diferença nos valores de GI_{50} .

Tabela 6. Valores de GI₅₀ e TGI (μM) dos compostos Lqit/LTs (3a-h) testados, doxorubicina (DOX) e amsacrina (*m*-AMSA) usados como controle positivo.

Compostos	Linhagens de Células Cancerígenas ^a																			
	U251		MCF-7		NCI-ADR		786-O		NCI-H460		PC-3		OVCAR-3		HT-29		K-562		HaCaT	
	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI
LT.26 (3a)	8.74	33.75	6.85	12.92	6.35	17.24	7.99	41.66	6.97	10.58	6.30	18.88	4.41	21.13	7.54	29.28	9.26	>100	4.17	51.42
LT.42 (3b)	80.84	>100	66.72	n.a.	>100	n.a.	64.44	92.31	16.75	>100	73.74	>100	7.26	98.48	>100	n.a.	n.a.	n.a.	>100	n.a.
LT.46 (3c)	>100	n.a.	62.73	n.a.	62.94	n.a.	28.75	>100	8.63	n.a.	22.98	n.a.	8.38	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.00	>100
LT.47 (3d)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LT.40 (3e)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LT.27 (3f)	>100	n.a.	27.19	>100	73.15	>100	>100	n.a.	28.36	n.a.	40.33	n.a.	62.41	>100	>100	n.a.	64.64	>100	>100	n.a.
LT.36 (3g)	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	>100	n.a.	>100	n.a.	45.89	>100	0.98	65.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LT.29 (3h)	>100	n.a.	69.24	n.a.	68.26	>100	>100	n.a.	70.37	n.a.	50.88	n.a.	71.39	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	70.06	n.a.
DOX ^b	0.046	1.20	0.036	1.48	0.24	3.80	0.051	0.63	0.04	0.54	0.075	1.20	0.17	1.52	0.43	8.37	0.18	27.64	0.053	0.42
<i>m</i>-AMSA	0.26	2.81	0.23	6.96	2.01	11.94	0.52	3.14	0.47	2.58	0.39	5.37	0.87	4.26	0.64	4.66	0.18	1.82	0.46	0.86

^a U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (mama resistente); 786-O (rim); NCI-H460 (pulmão); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon); K-562 (leucemia mieloide crônica); HaCat (queratinócitos normais);

^b Doxorubicina (DOX) foi usado como controle positivo. Linhagens de células foram expostas aos compostos em DMSO/RPMI/FBS 5% a 37° C, 5% CO₂, por 48h.

n.a. = não ativo na concentração mais elevada testada (600 μM).

5.7 RESULTADO E DISCUSSÃO - ESTUDO DA LIGAÇÃO COM O DNA

Os espectros de absorção dos novos derivados acridínicos-tiossemicarbazona Lqit/LTs (3a-h) mostram que todos os compostos apresentam bandas de absorção na região de 300-500 nm. Os diferentes substituintes doadores e aceptadores de elétrons presentes nos compostos Lqit/LT.46, LT.47, LT.40, LT.36, LT.29 (3c-h) induz um desvio para o vermelho no espectro de UV-Vis em relação ao composto LT.26 (3a), com a exceção de LT.27 (3f). A fim de examinar a afinidade geral dos derivados Lqit/LTs (3a-h) ao DNA, as interações de ligação destes ligantes com o DNA de timo de bezerro (ctDNA) foram examinadas por titulações espectrofotométricas. É amplamente aceito que, se os compostos podem se ligar ao DNA, as curvas de UV-Vis resultam em mudanças características do comprimento de onda de absorção máximo (desvio batocrômico ou hipsocrômico) e uma diminuição (hipocromismo) (LI et al., 2012; BARANOVSKY et al., 2009) ou aumento (hipercromismo) da absorbância (LAFAYETTE et al., 2013).

Os espectros de absorção dos compostos Lqit/LT.26, LT.42, LT.46, LT.47 (3a-d) (50 μ M) e dos compostos Lqit/LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (3e-h) (50 μ M) tanto na ausência e na presença de ctDNA (0-120 μ M) são dadas na Figura 41 e figura 42, respectivamente.

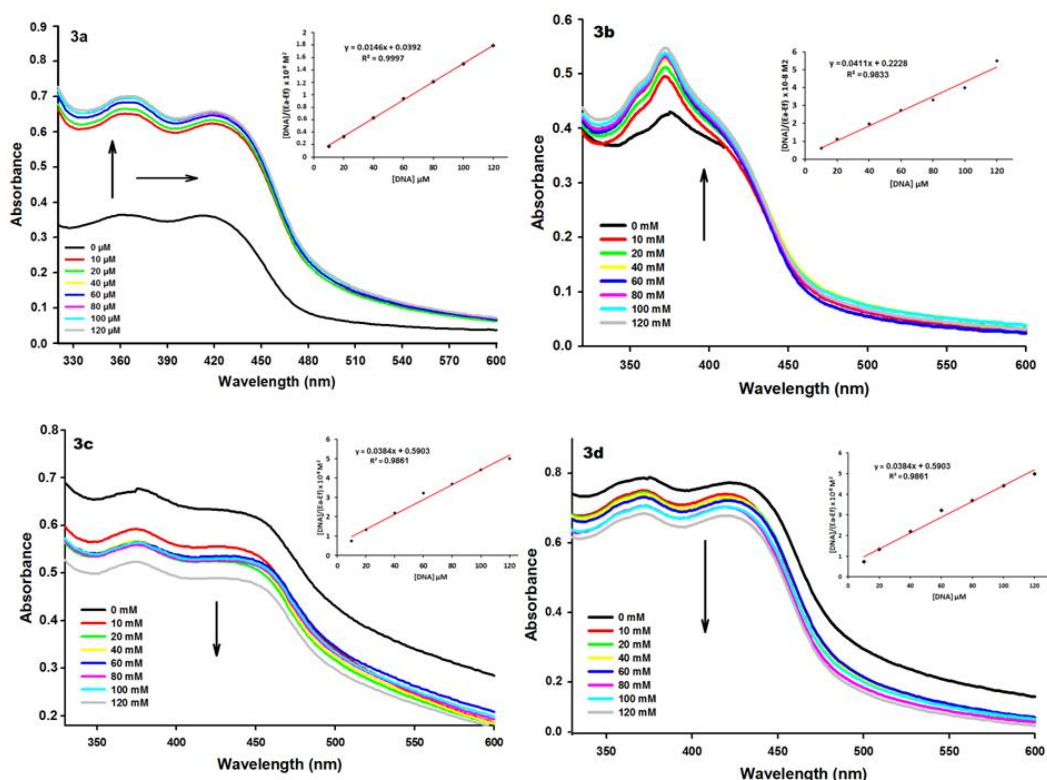


Figura 41. Espectros de absorção UV-Vis dos derivados Lqit/LT.26, LT.42, LT.46, LT.47 (3a-3d) (50 μ M) com concentrações crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μ M. Inserção: correspondente ao lote de $[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ como função da concentração de DNA, tal como determinado a partir dos dados espectrais de absorção. Seta ($\downarrow$) e ($\uparrow$) refere-se ao efeito hipocrômico e hipercrômico, respectivamente.

A análise do derivado Lqit/LT.26 (3a) mostra a curva de hipercromicidade significativa (92,58% a 120 μM de ctDNA) e uma ligeira mudança batocrômico ($\Delta\lambda$ 6 nm) com o aumento da concentração ctDNA, indicando uma formação do complexo DNA-composto LT.26. Na presença de ctDNA, todos os compostos Lqit/LTs (3a-h) produziram efeitos hipercrômicos ou hipocrômicos, com a maior hipocromismo sendo induzida pelo derivado de Lqit/LT.27 (3f) (Tabela 7). Com a exceção do composto Lqit/LT.36 (3g), todos os complexos com ctDNA mostraram efeitos batocrômico ou hipsocrômico com as mudanças mais notáveis para os derivados Lqit/LT.26 e LT.29 (3a e 3h), com variação de 6 nm e 12 nm, respectivamente.

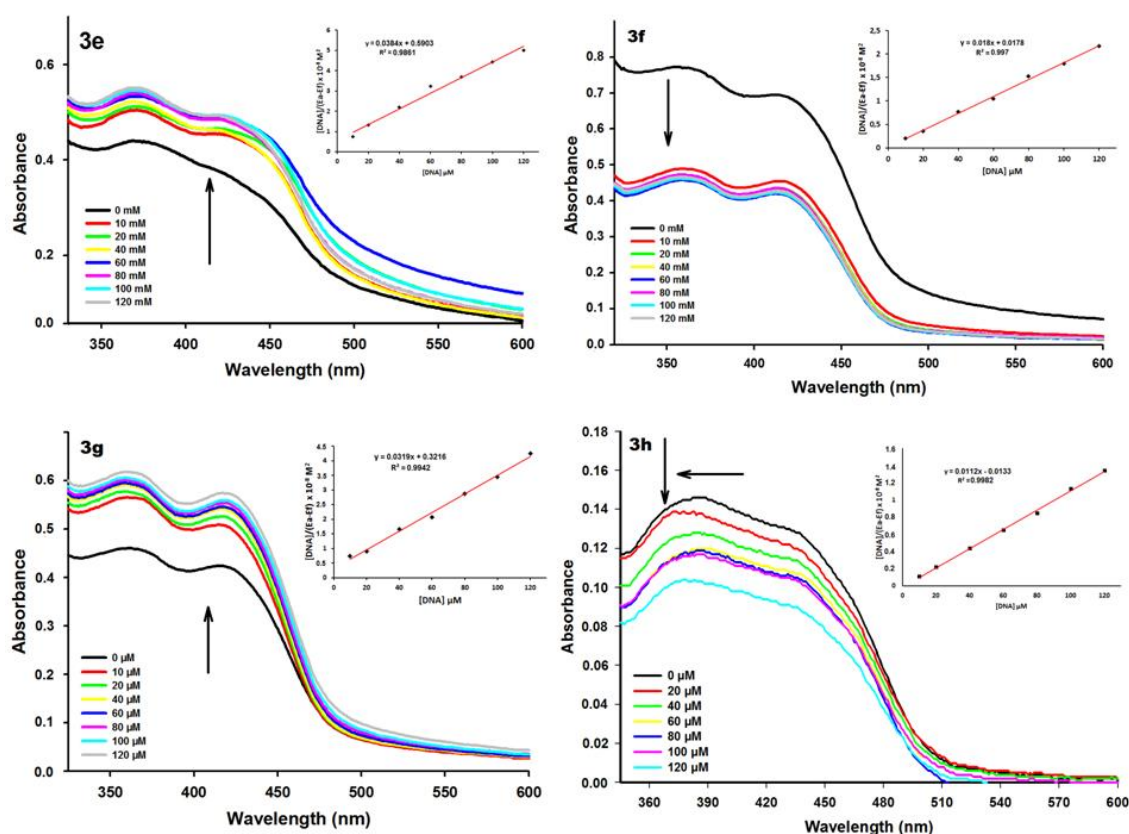


Figura 42. Espectros de absorção UV-Vis dos derivados Lqit/LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (3e-3h) (50 μM) com concentrações crescentes de ctDNA. $[\text{DNA}] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100$ e $120 \mu\text{M}$. Inserção: correspondente ao lote de $[\text{DNA}] / (\epsilon a - \epsilon f)$ como função da concentração de DNA, tal como determinado a partir dos dados espectrais de absorção. Seta (↓), (←) e (↑) refere-se ao efeito hipocrômico, hipsocrômico, hipercrômico, respectivamente.

Efeito hipocrômico e o desvio para o vermelho da absorção máxima são característicos da associação de um ligante com o DNA (FAULHABER et al., 2011), que é semelhante ao observado para a interação do ctDNA e tiazacridinas (LAFAYETTE et al., 2013). Estes resultados indicam que o anel da acridina tem um papel importante no processo de interação

de DNA (CHILIN et al., 2009) e confirmam que ambos os efeitos e hipercrômicas hipocrômicos, assim como deslocamentos vermelhos ou azuis refletem diferentes graus de alterações na estrutura da dupla hélice do DNA (ZHOU et al., 2007). O valor mais elevado K_b ($1,0 \times 10^6$) foi demonstrada pelo composto Lqit/LT.27 (3f) substituído com cloro (tabela 7). Este resultado indica que um substituinte cloro afeta positivamente a capacidade de um ligando para se ligar a ctDNA, uma vez que podem aumentar as propriedades hidrofóbicas do ligando. Além disso, o átomo de cloro aumenta as interações dipolo-dipolo no local de ligação, e pode ainda funcionar como um aceitador de ligação de hidrogênio (BENNER et al., 2014).

Tabela 7. Dados do espectro de absorção UV-Vis e emissão da fluorescência de derivados acridínicos-tiosemicarbazona, na presença e ausência do ctDNA.

Compostos	λ_{max} livre (nm)	λ_{max} ligado (nm)	Coefficiente de Extinção Molar (ϵ , M^{-1})	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocr (%) ^a	Hpercr (%) ^b	K_b (M^{-1})	λ Excitação (nm)	λ Emissão (nm)	K_{SV} ^c (M^{-1})
LT.26 (3a)	360	366	7.300	6	—	92.58	3.77×10^5	359	439	0.92×10^4
LT.42 (3b)	375	372	8.600	3	—	28.13	1.84×10^5	370	441	-0.2×10^4
LT.46 (3c)	376	375	13.780	1	20.32	—	1.2×10^5	370	440	0.18×10^4
LT.47 (3d)	375	371	14.040	4	4.69	—	1.74×10^4	370	441	0.87×10^4
LT.40 (3e)	375	371	8.760	4	—	25.22	6.5×10^4	361	441	-0.27×10^4
LT.27 (3f)	357	358	14.860	1	39.59	—	1.0×10^6	355	440	2.18×10^4
LT.36 (3g)	362	362	9.200	0	—	24.4	9.91×10^4	352	439	0.5×10^4
LT.29 (3h)	383	371	11.546	12	11.54	—	8.47×10^5	350	439	1.75×10^4

^a Hipocromismo dos complexos formados por compostos Lqit/LTs e 120 μM de ctDNA em comparação com ligantes livres; ^b Hiperchromismo dos complexos formados por compostos Lqit/LTs e 120 μM de ctDNA em comparação com ligantes livres; ^c Constante de extinção de Stern–Volmer, K_{SV} , obtido a partir de dados de fluorescência com ctDNA.

Estudos de fluorescência foram, também, realizados para analisar as propriedades de ligação entre derivados de acridina-tiosemicarbazona e ctDNA. A Tabela 7 resume a emissão de fluorescência a partir dos derivados sob investigação. Compostos Lqit/LTs exibiram uma banda de emissão na gama de 400-500 nm, comprimentos de onda de excitação de 350-370 nm, e os espectros foram monitorizadas a uma concentração fixa de 15 μM de cada derivado e diferentes concentrações ctDNA.

A fluorescência de derivados de acridina-tiosemicarbazona foi extinta por adição de ctDNA, exceto para os derivados Lqit/LT.42 e LT.40 (3b e 3e), que exibiram um aumento na intensidade de fluorescência após a adição de DNA. Em geral, o aumento da intensidade de fluorescência pode ser explicada por uma supressão significativa da flexibilidade conformacional do ligando no complexo DNA-ligante (FAULHABER et al., 2011). A Figura

43 e figura 44 apresenta o espectro de emissão dos compostos Lqit/LT.26, LT.42, LT.46, LT.47 (3a-d) e dos compostos Lqit/LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (3e-h), respectivamente, na presença de diferentes concentrações de ctDNA.

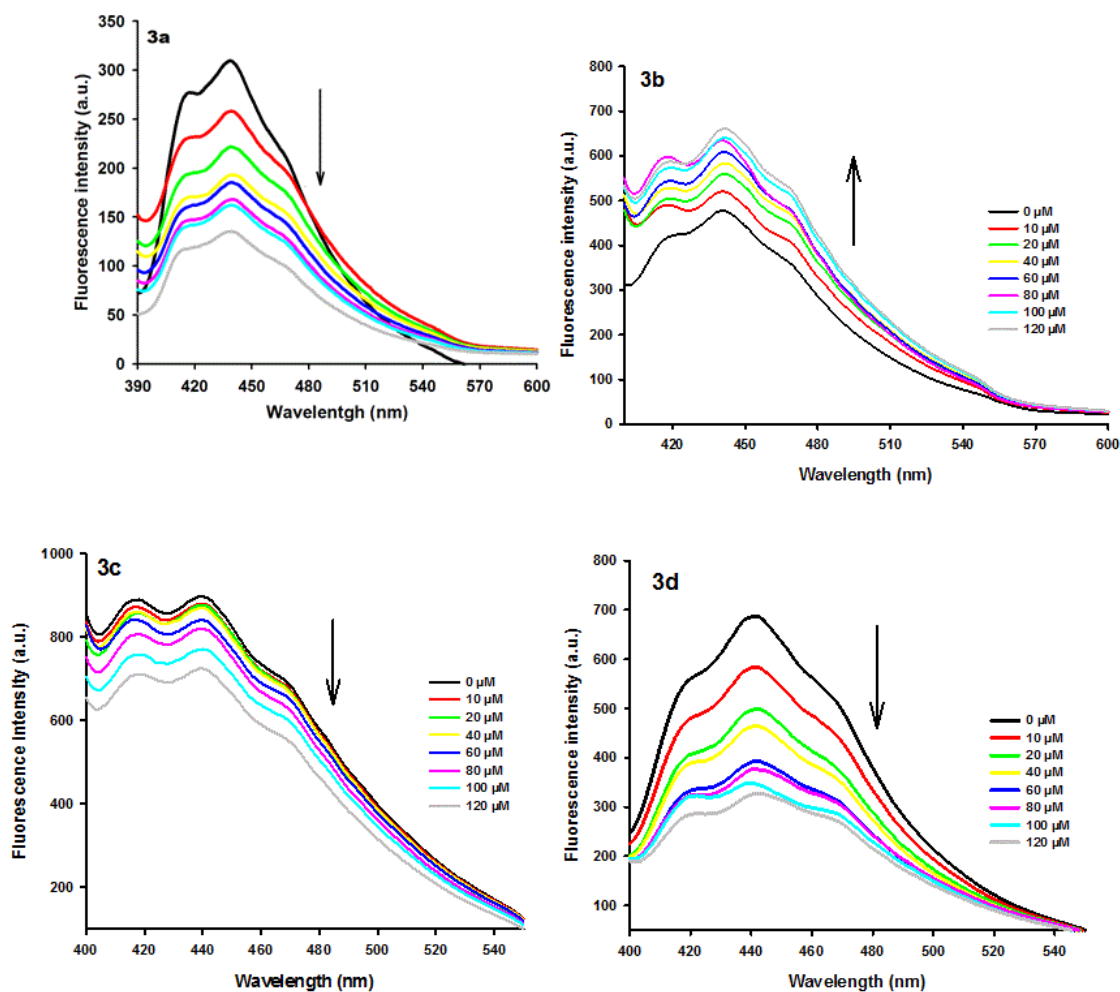


Figura 43. Espectros de fluorescência dos derivados Lqit/LT.26, LT.42, LT.46, LT.47 (3a-3d) (15 μM) com concentrações crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM. As setas (↑) e (↓) refere-se ao efeito hiperocrômico e hipocrômico.

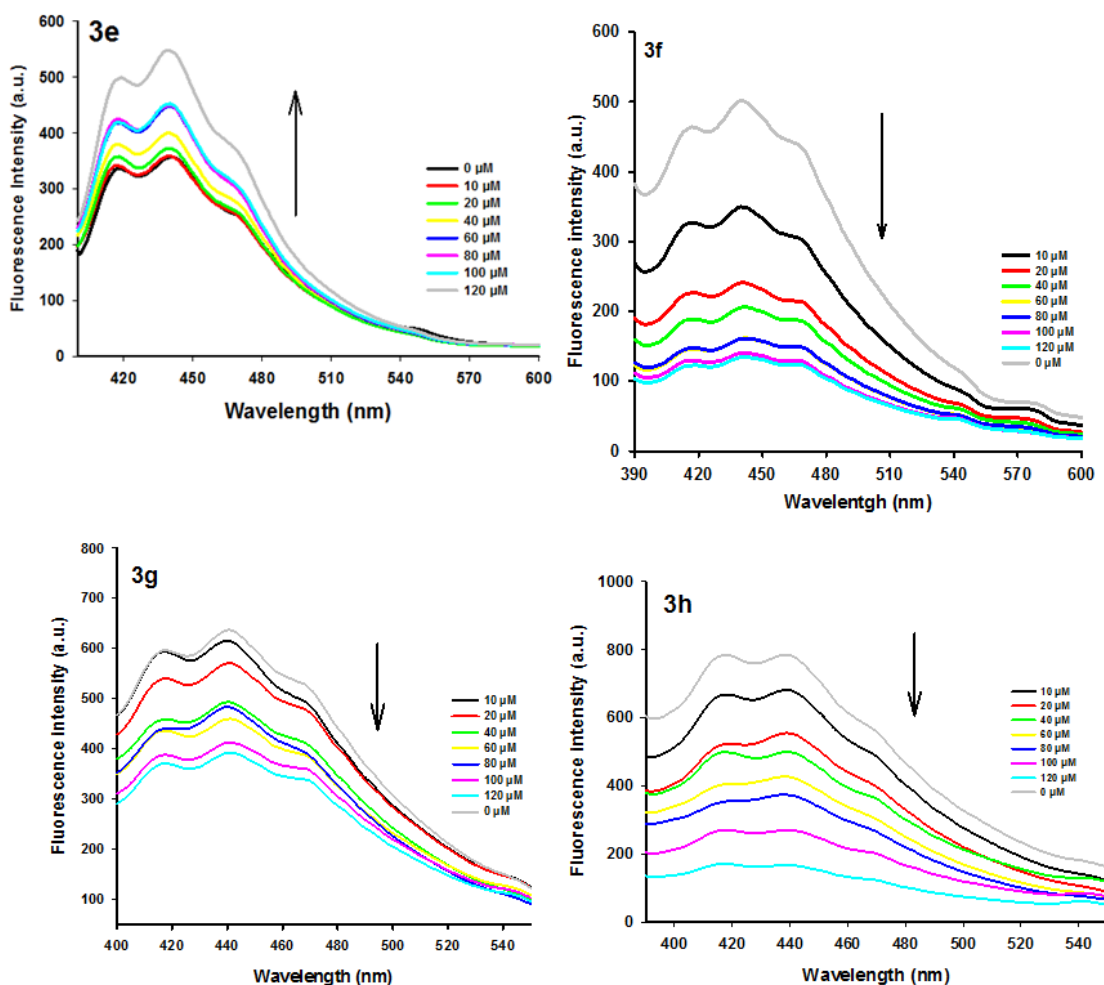


Figura 44. Espectros de fluorescência dos derivados Lqit/LT.40, LT.27, LT.36, LT.29 (3e-3h) (15 μM) com concentrações crescentes de ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μM. As setas (↑) e (↓) refere-se ao efeito hipercrômico e hipocrômico.

De acordo com as constantes de extinção de Stern-Volmer, K_{sv} , a extinção mais pronunciada foi demonstrada por derivado de Lqit/LT.27 (3f) ($2,18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Valores da K_{sv} diminuem na sequência dos derivados Lqit/LTs: LT.27 > LT.29 > LT.26 > LT.47 > LT.36 > LT.46 > LT.40 > LT.42. A intensidade de emissão dos derivados é extinta por adição de DNA, provavelmente devido a uma eficiente transferência de elétrons entre o ligante e as bases do ctDNA. Fenômenos de extinção da emissão refletem da interação entre os derivados e ctDNA, consistente com os resultados da espectroscopia de absorção eletrônica (GAO et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os novos derivados indólicos da séries: 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-amino-2-tioxo-tiazolidina-4-ona; 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-tiazolidin-4-ona; 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona; 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidina-4-on; 3-((1*H*-indol-3-il-metileno)amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona e 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-((1*H*-indol-3-il-metileno)-amino)-2-tioxotiazolidin-4-ona foram sintetizados com êxito por uma reação rápida e tiveram suas estruturas químicas confirmadas. Os derivados de acridina da série 2-acridin-9-il-metileno-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida foram obtidos através de rotas sintéticas eficientes, que apresentaram bons rendimentos.

Constantes de ligação dos derivados acridínicos apresentaram valores entre 1.74×10^4 e $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, o que indicam alta afinidade ao DNA. O composto com maior capacidade de ligação ao DNA foi o derivado com grupamento fenil da porção tiossemicarbazona substituído com cloro; e, o composto com maior atividade antiproliferativa possui o grupo fenil não substituído na mesma posição.

Os novos compostos indólicos Lqit/SEs mostraram constantes de ligação (K_b) compatível com boa interação ao ctDNA na faixa de $1,84 - 7,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. No ensaio de fluorescência, a supressão pronunciada do derivado SE.01 ($K_{sv} = 1,81 \times 10^4$) que possui o grupamento amino na cadeia lateral, torna uma estrutura favorável para a formação da ligação de hidrogênio com os pares de bases do DNA. Tal derivado, destacou-se, também, na eficácia nas duas linhagens de câncer de leucemia testadas. O derivado Lqit/SE.05 mostrou potência maior do que o controle positivo utilizado, a doxorrubicina, sendo promissor para maiores estudos com atividade antitumoral. Dentre os derivados indólicos da série Lqit/TEs, evidenciou-se o composto bis-indólico não substituído com eficácia atividade antitumoral nas linhagens testadas, porém como menor ligação ao ctDNA. O destaque destes derivados indólicos, com grupamento amino livre e bis-indol não substituído (Lqit/TE.04) conduziu na escolha para o ensaio da topoisomerase. Entretanto, não apresentaram a capacidade de inibir a enzima topoisomerase I, evidenciando que o mecanismo de ação não estar relacionado a esta enzima.

Os resultados nos dão uma visão sobre o mecanismo de ligação destes derivados indólicos e acridínicos ao DNA. O núcleo indol, assim como o núcleo da acridina, constituem de uma estrutura aromática que contribui para a incorporação das moléculas ao DNA, sendo evidente que as cadeias laterais básicas inseridas ao anel principal são atraentes para aumentar a afinidade de ligação ao DNA.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho e conclusões obtidas, verifica-se a importância em dar continuidade as pesquisas com compostos contendo núcleo indol e acridínico. Para dar seguimento aos conhecimentos sobre o mecanismo de ação destes derivados estudados, temos como perspectivas:

- Utilizar técnicas de dicroísmo circular e viscosidade com os derivados, para ampliar os estudos sobre a interação com o DNA;
- Ampliar a análise da atividade antitumoral dos derivados, através do estudo antiproliferativo in vivo e avaliação de morte celular;
- Verificar a eficácia dos derivados indólicos em apresentar atividade anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.S.; CASTANHEIRA, E.M.S.; COUTINHO, P.J.G.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, P.M.T.; VALE-SILVA, L.A.; PINTO, E. Interaction of antitumoral fluorescent heteroaromatic compounds, a benzothienopyrrole and two thienoindoles, with DNA and lipid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 240, p. 14-25, 2012.
- ACHESON, R.M. Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds. 3^o Ed. New York: Wiley Interscience, 501 p., 1956.
- ADDLA, D.; BHIMA; SRIDHAR, B.; DEVI, A.; KANTEVARI, S. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl-2-butyl-4-chloroimidazole embobied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. v. 22, p. 7475-7480, 2012.
- AHUJA, P.; SIDDIQUI, N. Anticonvulsant evaluation of clubbed indole-1,2,4-triazine derivatives: a synthetic approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 80, p. 509-522, 2014.
- ALBERT, A. The acridine. 2^o Ed. London: Edward Arnold Publishers, Ltd. p. 1966.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 22, p. 4506-4521, 2014.
- ALI, A.Q.; TEOH, S.G.; SALHIN, A.; ELTAYEB, N.E.; AHAMED, M.B.K.; MAJID, A.M.S.A. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 125, p. 440-448, 2014.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, B. DEL C.L.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. *Química Nova*. 2005; 28(1):118-129.
- ANITHA, P.; CHITRAPRIYA, N.; JANG, Y.J.; VISWANATHAMURTHIM P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer ACTIVITY of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 129, p. 17-26, 2013.
- ANTONINI, I.; POLUCCI, P.; MAGNANO, A.; CACCIAMANI, D.; KONIECZNY, M.T.; PARADZIEJ-LUKOWICZ, J.; MARTELLI, S. Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation of Thiadiazinoacridines: A New Class of Antitumor Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.11, p.399-405, 2003.
- ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-target scaffold in medicinal chemistry: potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 87, p. 814-833, 2014.
- AUFFINGER, P.; HAYS, F.A.; WESTHOF, E.; HO, S. Halogen bonds in biological molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 101, p. 16789-16794, 2004.

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

AZIZMOHAMMADI, M.; KHOOBI, M.; RAMAZANI, A.; EMAMI, S.; ZARRIN, A.; FIRUZI, O.; MIRI, R.; SHAFIEE, A. @H-chromene derivatives bearing thiazolidine-2,4-dione, rhodanine or hydantoin moieties as potential anticancer agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. x, p. 15-22, 2013.

BAN, J.O.; KWAK, D.H.; OH, J.H.; PARK, E.J.; CHO, M.C.; SONG, H.S.; SONG, M.J.; HAN, S.B. MOON, D.C.; KANG, K.W.; HONG, J.T. *Chemical Biological Interaction*. v. 188, p. 75-85, 2010.

BARANOVSKY, S.F.; BOLOTIN, P.A.; EVSTIGNEEV, M.P.; CHENYSHEV, D.N. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. *Journal Applied Spectroscopy*. v. 76, p. 132–139, 2009.

BARREIRO, E.J. E BALZANI, C.A.M. Biodiversidade: fonte e inspiração para a descoberta de fármacos. *Química Nova*. v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS F.W.A, BEZERRA D.P., FERREIRA P.M.P., CAVALCANTI B.C., SILVA T.G., PITTA M.G.R., LIMA M.C.A., GALDINO S.L., PITTA I.R, COSTA-LOTUFO L.V, MORAES M.O, BURBANO R.R, GUECHEVA T.N, HENRIQUES J.A.P, PESSOA C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. *Toxicology Application Pharmacological*. v. 268: p. 37–46, 2013.

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 citotoxic 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 derivates, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistrys*. v. 7, p. 139-169, 2007.

BENNER, K.; IHMELS, H.; KOLSCH, S.; PITHAN, P.M. Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolizium derivatives: the influence of size, shape and substituents. *Organic & Biomolecular Chemistry*. v. 12, p. 1725-1734, 2014.

BI, S.; ZHANG, H.; QIAO, C.; SUN, Y.; LIU, C. Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A*. v. 69, p. 123-129, 2008.

BIRADAR, J.S.; SASIDHAR, B.S.; PARVEEN, R. Synthesis, antioxidant and DNA cleavage activities of novel indole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 45, p. 4074-4078, 2010.

BISWAL, S.; SAHOO, U.; SETHY, S.; KUMAR, H.K.S.; BANERJEE, M. Indole: the molecule of diverse biological activities. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. v. 5, p. 1-6, 2012

BOBKO, M.A.; EVANS, K.A.; KAURA, A.C.; SHUSTER, L.E.; SU, D.S. Synthesis of 2,5-disubstituted-3-cyanoindoles. *Tetrahedron Letters*. v. 53, p. 200-202, 2012.

BRANDÃO, HN; DAVID, JP; COUTO, RD; NASCIMENTO, JAP; DAVID, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos anti-neoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

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.

CHILIN, A.; MARZARO, G.; MARZANO, C.; VIA, L.D.; FERLIN, M.G.; PASTORINI, G.; GUIOTTO, A. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 523-529, 2009.

CINAR, M.; KARABACAK, M. Determination of conformational and spectroscopic features of ethyl trans- α -cyano-3-indole-acrylate compound: An experimental and quantum chemical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 104, p. 428-436, 2013.

COOPER, G.M. A célula – uma abordagem molecular. 2ed. Artmed, Porto Alegre, 2001. p. 633-669.

CORSARO, A.; PISTARÁ, V.; RESCIFINA, A.; ROMEO, G.; ROMEO, R.; CHIACCHIO, U. 1,3-Dipolar cycloadditions of acridine with nitrile oxides. *Archive for Organic Chemistry - Arkivoc*. v. 8, 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.

DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher; 2007.1186p.

DONNICI, C.L.; ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. v. 28, p. 118-129, 2005.

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

DUSKOVA, K.; SIERRA, S.; FERNANDEZ, M.J.; GUDE, L.; LORENTE, A. Synthesis and DNA interaction of ethylenediamine platinumium (II) complexes linked to DNA intercalants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 20, p. 7112-7118, 2012.

EBRAHIMI, H.; HABI, J.S.; AL-ANSARI, H.S. A new series os Schiff bases derived from sulfa drugs and indole-3-carboxaldehyde: Synthesis, characterization, spectral and DFT computational studies. *Journal of Molecular Structure*. v. 1039, p. 37-45, 2013.

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 (Cl-921) in combination with cisplatin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. v. 3, nº 6, p. 1153-1159, 1996.

ESTEVIÃO, M.S.; CARVALHO, L.C.; FREITAS, M.; GOMES, A.; VIEGAS, A.; MANSO, J.; ERHARDT, S.; FERNANDES, E.; CABRITA, E.J.; MARQUES, M.M. Indole based cyclooxygenase inhibitors: synthesis, biological evaluation, docking and NMR screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 54, p. 823-833, 2012.

FALCO, J.L.; PIQUE, M.; GONALEZ, M.; BUIRA, I.; MENDEZ, E.; TERCENIO, J.; PEREZ, C.; PRINCEP, M.; PALOMER, A.; GUGLIETTA, A. Synthesis, pharmacology and molecular modeling of N-substituted 2-phenyl-indoles and benzimidazoles as potent GABA_A agonist. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 41, p. 985-990, 2006

FARGHALY, M.; ABDEL-WAHAB, B.F.; AHMED, E.M. Synthesis antiviral and antimicrobial screening of some new 2-oxoindoline derivatives. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. v. 45, p. 539-544, 2009.

FAULHABER K.; GRANZHAN, A.; IHMELS, H.; OTTO, D.; THOMAS, L.; WELLS, S. Studies of the fluorescence light-up effect of amino-substituted benzo[b]quinolizinium derivatives in the presence of biomacromolecules. *Photochemistry & Photobiology Science*. v. 10, p. 1535-1545, 2011.

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

FINKIELSZTEIN, L.M.; CASTRO, E.L.; FABIÁN, L.E.; MOLTRASIO, G.Y.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. V.; MOGLIONI, A.G. New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 43, p. 1767-1773, 2008.

FOURMIGUÉ, M. Halogen bonding: recent advances. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. v. 13, p. 36-45, 2009.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIÍDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 18, p. 627-641, 2008.

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.

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.

- GENG, S.; WU, Q.; SHI, L.; CUI, F. Spectroscopic study as thiosemicarbazone derivative with ctDNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 60, p; 288-294, 2013.
- GENTRY, A.C.; JUUL, S.; VEIGAARD, C.; KNUDSEN, B.R.; OSHEROFF, N. The geometry of DNA supercoils modulates the DNA cleavage activity of human topoisomerase I. *Nucleic Acids Research*. v. 39, p. 1014-1022, 2011.
- GHOSH, P.; PURKAYASTHA, P.; Selective interaction of methylindoloquinolines with DNA. *The Royal Society of Chemistry*. v. 4, p.22442-22448, 2014.
- 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.
- GIGANT, B.; WANG, C.; RAVELLI, R.B.G; ROUSSI, F.; STEINMETZ, M.O.; CURMI, P.A.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*. v. 435, p. 519-522, 2005.
- GORE, S.; BASKARAN, S.; KONING, B. Fischer indole synthesis in low melting mixtures. *Organic Letters*. v. 14, p. 4568-4571, 2012.
- GRIBBLE, G.W. Indoles. *Tetrahedron organic Chemistry Series*. Chapter 3. v. 26, p. 81-188, 2007.
- GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and chemistry: applications to infectious diseases. *Estudos Avançados*. v. 24, p. 81-98, 2010.
- GURKAN-ALP, A.S.; MUMCUOGLU, M.; ANDAC, C.A.; DAYANC, E.; CETIN-ATALAY, R.; BUYUKBINGOL, E. Synthesis, anticancer activities and molecular modeling studies of novel indole retinoid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, p. 346-354, 2012.
- GÜRSOY, A.; TERZIOGLU, N.; ÖTUK, G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials. *European Journal Medicinal Chemistry*. v. 32, p. 753-757, 1997.
- 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.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer.[Acesso em novembro de 2015]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335.
- HALLIWELL, M.; GUTTERIDGE, M.; Free radicals in biology and medicine. 3^{ed}, *Oxford Science Publications*, Oxford University Press, 1998.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, mar. 2011.
- HEDA, L.C.; SHARMA, R.; PAREEK, C.; CHAUDHARI, P.B. Synthesis and antimicrobial activity of some derivatives of 5-substituted indole dihydropyrimidines. *E-Journal of Chemistry*. v. 6, p; 770-774, 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.

HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *Journal Chemistry Thermodynamics*. v. 41, p; 764-774, 2009.

IGOSHEVA, N.; LORZ, C.; O'CONNER, E.; GLOVER, V.; MEHMET, H.; Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose-and time-dependent switch from apoptosis to necrosis human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*. v. 47, p. 216-224, 2005.

JADHAV, J.; SHARANABASAPPA, K.; HURANE, R.; SALUNKHE, R.; RASHINKAR, G. Facile access to 3-cyano-4-azaindoles via a modified Madelung indole synthesis. *Tetrahedron Letters*. v. 54, p. 6858-6863, 2013.

JAIN, A.K.; BHATTACHARYA, S. Interaction of G-Quadruplexes with nonintercalating duplex-DNA minor groove binding ligands. *Bioconjugate Chemistry*. v. 22, p; 2355-2368, 2011.

JANOVEC, L.; KOZUURKOVA, 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.

Jl, X.Y.; XUE, S.T.; ZHAN, Y.C.; SHEN, J.J.; WU, L.T.; JIN, J.; WANG, Z.; LIN, Z.R. Design, synthesis and antiproliferative activity of a novel class of indole-2-carboxylate derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 83, p. 409-418, 2014.

Jl, Y.Y.; ZHU, Y.M.; WANG, J.W. GS-2, apyrazolo[1,5-a]indole derivative with inhibitory activity of topoisomerases, exerts its potent cytotoxic activity by ROS generation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 36, n.x, p. 1186-1196, 2013.

JOULE J.; MILLS, K. Indole: Reactions e synthesis. In: *Heterocyclic Chemistry*. 5th edition, p. 373-400, 2010.

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.

KAMATH, P.R.; SUNIL, D.; AJEES, A.A., PAI, K.S.R.; DAS, S. Some new indole-coumarin hybrids; Synthesis, anticancer and Bcl-2 docking studies. *Bioorganic Chemistry*, v. 63, p. 101-109, 2015.

KARALI, N.; GURSOY, A.; KANDEMIRLI, F.; SHVETS, N.; KAYNAK, B.F.; OZBEY, S.; KOVALISHYN, V.; DIMOGLO, A. Synthesis and structure-antituberculosis activity

relationship of 1*H*-indole-2,3-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 15, p. 5888-5904, 2007.

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.

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

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

KORTAGERE, S.; EKINS, S.; WELSH, W.J. Halogenated ligands and their interactions with amino acids: implications for structure-activity and structure-toxicity relationships. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. v. 27, p. 170-177, 2008.

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

KURUVILLA, E.; JOSEPH, J.; RAMAIAH, D. Novel Bifunctional Acridine-Acrinium 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.

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

LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006.

LI, H.; YANG, T.; DING, L.; WANG, W. Synthesis, characterization, fluorescence and DNA-binding studies of europium (III) complexes with amide-based 2,3-dihydroxynaphthalene derivatives. *Journal of Rare Earths*. v. 30, p. 297-303, 2012.

LI, X.; WANG, Q.; QING, Y.; LIN, Y.; ZHANG, Y.; QIAN, X.; CUI, J. Novel DNA intercalators without basic side chains as efficient antitumor agents: Design, synthesis and evaluation of benzo-[c,d]-indol-malononitrile derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 18, p. 3279-3284, 2010.

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.

LI, J.J.; GRIBBLE, G.W.; BALDWIN, J.E.; WILLIAMS, F.R.S. Palladium in heterocyclic chemistry. *Eds. Pergamon Press: New York*, v. 20, p. 73, 2000.

LIESEN, A.P.; AQUINO, T.M.; CARVALHO, C.S.; LIMA, V.T.; ARAÚJO, J.M.; LIMA, J.G.; FARIA, A.R.; MELO, E.J.T.; ALVES, A.J.; ALVES, E.W.; *et al.* Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-

thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles.
European Journal Medicinal Chemistry. v. 45, p. 3685–3691, 2010.

LIU, J.C.; ZHENG, C.J.; WANG, M.X.; LI, Y.R.; MA, L.; HOU, S.; PIAO, H. Synthesis and evaluation of the antimicrobial activities of 3-((5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)-2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 74, p. 405-410, 2014

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.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, v. 136, n. 5, p. 823–37, mar. 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.

MACEBEO, A.P.; ALLEJANDRO, G.J.D.; HALLARES, A.V.; VIDAR, W.S.; VILLAFLORES, O.B. Photochemical survey and pharmacological activities of the indole alkaloids in the genus *Voacanga Thouars* (Apocynaceae) - An update. *Phocognosis Review*. v. 3, p. 132-142, 2009.

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

MADADI, R. N.; PENTHALA, N. R.; JANGANATI, V.; CROOKS, P.A. Synthesis and anti-proliferative activity of aromatic substituted 5-((1-benzyl-1H-indol-3-yl)methylene)-1,3-dimethylpyrimidine-2, 4,6(1H,3H,5H)-trione analogs against human tumor cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 601-603, 2014.

MAGNANO, A.; SPARAPANI, S.; LUCCIARINI, R.; MICHELA, M.; AMANTINI, C.; SANTONI, G.; ANTONINI, I. Synthesis and biological evaluation of indazolo[4,3-bc]-[1,5]naphthyridines(10-aza-pyrazolo[3,4,5-kl]acridines): a new class of antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 5941–5947, 2004.

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.

MAJUNDAR, P.; BATHULA, C.; BASU, S.M.; DAS SUBHENDU, K.; AGARWAL, R.; HATI, S.; SINGH, A.; SEN, S.; DAS BRATA, B. Design, synthesis and evaluation of thiohydantoin derivatives as potent topoisomerase I (Top1) inhibitors with anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 102, p. 540-551, 2015.

MALUMBRES, M. e BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. v. 9, p. 153 - 166, 2009.

MARTINEZ, R. e CHAVÓN-GARCIA, L. The Search of DNA-intercalators as antitumor drugs what it worked and what did not work, *Current Medicinal Chemistry*. v. 12, p. 127-151, 2005.

MARTÍNEZ, A.; VÁZQUEZ, M.V.; CARREÓN-MACEDO, J.L.; SANSORES, L.E.; SALCEDO, R. Benzene fused five-membered heterocycles. A theoretival approach. *Tetrahedron*. v. 59, p. 6415-6422, 2003.

MARTINS, M.A.P.; FRIZZO, C.P.; MOREIRA, D.N.; BURIOL, L.; MACHADO, P. Solvente-Free heterocyclic synthesis. *Chemical Review*. v. 109, p. 4140-4182, 2009.

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

MONKS, A.D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *National Cancer Institute*. v. 83, p. 757–766, 1991.

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.

NAFISI, S.; SABOURY, A.A.; KERAMAT, N.; NEAULT, J.F.; RIAHI, H.A.T. Stability and structrural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene bue. *Journal of Molecular Structure*. v. 827, p. 35-43, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 4º Ed. Sao Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NEVES, J.K.A.L.; LIMA, M.C.A.; PEREIRA, V.R.A.; MELO, C.M.L.; PEIXOTO, C.A.; PITTA, I.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; GALDINO, S.L. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: an ultrastructural and cytotoxicity study. *Experimental Parasitology*. v. 128, p. 82-90, 2011.

NICOLAU, K.C.; SNYDER, S.A. Classical in Total Synthesis II. Wiley-VCH, Weinheim, 658p. 2003.

NGUYEN, H.H.; LAVRENOV, S.N.; SUNDAR, S.N.; NGUYEN, H.H.D.; TSENG, M.; MARCONETT, C.N.; KUNG, J.; STAUB, R.E.; PREOBRAZHENSKAYA, M.N.; BJELDANES, L.F.; FIRESTONE, G.L. 1-Benzyl-indole-3-carbinol is a novel indole-3-carbinol derivative with significantly enhanced potency of anti-proliferative and anti-estrogenic properties in human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 186, p. 255–266, 2010.

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; AMORIM, C.A.C.; CAMPOS, J.F.; RIBEIRO, A.G.; MOURA, R.O.; NEVES, J.L.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; LIMA, M.C.A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 104, p. 148-156, 2015.

OLIVEIRA, S.R. *Avaliação da atividade antimicrobiana de novas tiazolidinas e imidazolidinas*. 2010 (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

OZDEMIR, A.; ALTINTOP, M.D.; TURAN-ZITOUNI, G.; ÇİFTÇİ, G.A.; ERTORUN, I.; ALATAS, O.; KAPLANCIKLI, Z.A. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 89, p. 304-309, 2015.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 18, p. 497-503, 2007.

PANDYA, P.; ISLAM, M.M.; KUMAR, G.S.; JAYARAM, B.; KUMAR, S. DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence. *Journal of Chemical Sciences*. v. 122, p. 247-257, 2010.

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.

PEREZ-TOMAS, R.; MONTANER, B.; LIAGOSTERA, E.; SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical Pharmacological*. v. 66, p. 1447-1452, 2003.

POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Reviews*. v. 109, p. 2894-2902, 2009.

PRUDHOMME M. Reveccamycin analogues as topoisomerases I inhibitors and antitumor agentes. *Current Medicinal Chemistry*. v. 7, n. 12, p. 1189-1212, 2000.

QIAO, C.; BI, S.; SUN, Y.; SONG, D.; ZHANG, H.; ZHOU, W. Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *Spectrochimica Acta Part A*. v. 70, p. 136-143, 2008.

RAPOLI, S.; ALLA, M.; BOMMENA, V.R.; MURTHY, R.; JAIN, N.; BOMMAREDDY, R.V.; BOMMINENI, M.R. Synthesis and biological screening of 5-(alkyl(1H-indol-3-yl))-2-(substituted)-1,3,4-oxadiazoles as antiproliferative and antiinflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 66, p. 91-100, 2013.

REINHOLD, W.C.; MERGNY, H.L.; RYAN, L.M.; PFISTER, T.D.; KINDERS, R.; PARCHMENT, R.; DOROSHOW, J.; WEINSTEIN, J.N.; POMMIER, Y. Exon array analyses across the NCI-60 reveal potential regulation of TOP1 by transcription pausing at guanosine quartets in the first intron, *Cancer Research*. v. 70, p. 2191-2203, 2010.

RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M.G.; PISTARA, V.; CORSARO, A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: synthesis, activity and modeling, *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 74, p. 95-115, 2014.

SALUM, L.B. *Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais*. 2011 (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

SAMALA, G.; DEVI, P.B.; NALLANGI, R.; SRIDEVI, P. J.; SAXENA, S.; YOGEEESWARI, P.; SRIRAM, D. Development of novel tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide based Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors: Molecular hybridization from known antimycobacterial leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 22, p. 1938-1947, 2014.

SÁNCHEZ, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. Indolecarbazole natural products: occurrence, biosynthesis and biological activity. *Natural Product Reports*. v.23, p. 1007-1045, 2006.

SCHOLFIELD, M.R.; ZANDEN, C.M.V.; CARTER, M.; HO, P.S. Halogen bonding (X-bonding): a biological perspective. *Protein Science*. v. 22, p. 139-152, 2013.

SCHWALM, C.S.. Utilização de haletos metálicos hidratados como novos catalisadores na reação de Friedel-Crafts entre indóis e olefinas ativadas. 2010 (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

SHAH, A.; NOSHEEN, E.; MUNIR, S.; BADSHAH, A.; QURESHI, R.; REHMAN, Z.; MUHAMMAD, N.; HUSSAIN, H. Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 120, p; 90-97, 2013.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. *Journal Heterocyclic Chemistry*. v. 47, p. 491-502, 2010.

SHERER, C. e SNAPE, T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agentes against tumours of the central nervous system: exploring the scope of indole and carbazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, n. x, p. 552-560, 2015.

SHIMAZAKIA, Y.; YAJIMAB, T.; TALANIC, M.; YAMAUCHIB, O. Metal complexes involving indole rings: Structures and effects of metal-indole interactions. *Coordination Chemistry Reviews*. v. 253, p. 479-492, 2009.

SIEBER O.M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I.P.M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nature Reviews*. 2003; 3:701-708.

SILVERMAN, RB. The organic chemistry of drug design and drug action. *California: Academic Press, Inc.*, 1992.

SNYDER, R.D. Assessment of atypucal DNA intercalating agents in biological and in silico systems. *Mutation Research*. v. 623, p. 72-82, 2007.

SOMERS, K.R.F.; KRYACHJO, E.S.; CEULEMANS, A. Theoretical study of indole: protonation, indolyl radical, tautomers of indole, ant its interaction with water. *Chemical Physics*. v. 301, p. 61-79, 2004.

STEFANSKA, B.; BONTEMPS-GRACZ, M.M.; ANTONINI, I.; MARTELLI, S.; ARCIEMIUK, M.; PIWKOWSKA, A.; ROGACKA, D.; BOROWSKI, E. 2,7-Dihydro-3H-pyridazino[5,4,3-kl]acridin-3-one derivatives, novel type of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines. Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 13, p. 1969–1975, 2005.

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

SUNDBERG, R.J. Review on electrophilic substitution reactions of indoles. *Topics Heterocyclic Chemistry*. Editor Springer. v. 26, p. 47-115, 2010.

TABER, D.F.; TIRUNAHARI, P.K. Indole synthesis: a review and proposed classification. *Tetrahedron*. v. 67, p. 7195-7210, 2011.

TALAZ, O.; GULCIN, I.; GOSKU, S.; SARACOGLU, N. Antioxidant activity of 5,10-dihydroindeno[1,2-b]indoles containing substituents on dihydroindeno part. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 6583-6589, 2009.

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° 11, p. 1477- 1485, 1963.

VIDEIRA, M.; REIS, R.L.; BRITO, M.A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1846, p. 312-325, 2014.

VIEIRA, E.S. *Síntese, Estrutura e Modelagem Molecular de novos derivados Acridino-imidazolidínicos e Benzilideno-tiazolidínicos*. 2004 (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.

WANG, Q.; LI, W.; LIU, A.; ZHANG, B.; GAO, F.; LI, S.; LIAO, X. Binding and photocleavage of a neutral nickel (II) bis(hydrogen pyridine-2,6-dicarboxylato) complex DNA. *Journal of Molecular Structure*. v. 985, p. 129-133, 2011.

WHITTY, A. Cooperativity and biological complexity. *Nature Chemical Biology*. v. 4, n. 8, p. 435-439, 2008.

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

WOO, M.H., VANCE, J.R., MARCOS A.R., BAILLY C., BJORNSTU M.A. Active site mutations in DNA topoisomerase I distinguish the cytotoxic activities of camptothecin and the indolocarbazole, rebeccamycin. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n.6, p. 3813-3822, 2002.

YIN, H.; XU, Y.; QIAN, X. Novel antitumor agent family of 1H-benzo[c,d]indol-2-one with flexible basic side chains: synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 15, p. 1356-1362, 2007.

ZHANG, M.-Z.; CHEN, Q.; YANG, G.-F. Review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 89, p. 421-441, 2015.

ZHANG, G.; HU, X.; FU, P. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 108, p. 53-61, 2012.

ZHANG, F.; ZHAO, Y.; SUN, L.; DING, L.; GU, Y.; GONG, P. Synthesis and anti-tumor activity of 2-amino-3-cyano-6-(1*H*-indol-3-yl)-4-phenylpyridine derivatives in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 46, p. 3149-3157, 2011.

ZHANG, X.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; YANG, Z. The interaction of taurine-salicylaldehyde Schiff base copper(II) complex with DNA and the determination of DNA using the complex as a fluorescence probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 77, p. 1-5, 2010.

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.

ZHOU, C.Y.; XI, X.L.; YANG, P. Studies on DNA binding to metal complexes of sal₂trien. *Biochemistry*. v. 72, p. 37-43, 2007.

ZHU, J.; CHEN, L.; DONG, Y.; LI, J.; LIU, X. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 124, p. 78-83, 2014

ZHUANG, S.H.; LIN, C.Y.; CHOU, L.C.; HSU, M.H.; LIN, H.Y.; HUANG, C.H.; LIEN, J.C.; KUO, S.C.; HUANG, L.J. Synthesis and anticancer activity of 2,4-disubstituted furo[3,2-*b*] indole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 66, p. 466-479, 2013.

ZITVOGEL, L. *et al.* Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews. Immunology*, v. 8, n. 1, p. 59-73, jan. 2008

APÊNDICE

Artigo publicado no periódico *International Journal of Molecular Sciences*



International Journal of
Molecular Sciences

Qualis: B1 - Farmácia
Fator de Impacto: 2.862

Almeida, Sinara Mônica Vitalino; Lafayette, Elizabeth Almeida; Silva, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes; Amorim, César Augusto da Cruz; Oliveira, Tiago Bento; Ruiz, Ana Lucia Tasca Gois; Carvalho, João Ernesto; Moura, Ricardo Olímpio; Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro; Lima, Maria do Carmo Alves; Carvalho Junior, Luiz Bezerra. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 13023-13042, 2015.

Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives

Sinara Mônica Vitalino de Almeida ^{1,2,*}, Elizabeth Almeida Lafayette ³,
 Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva ¹, Cézar Augusto da Cruz Amorim ³,
 Tiago Bento de Oliveira ³, Ana Lucia Tasca Gois Ruiz ⁴, João Ernesto de Carvalho ^{4,5},
 Ricardo Olímpio de Moura ⁶, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão ¹,
 Maria do Carmo Alves de Lima ³ and Luiz Bezerra de Carvalho Júnior ¹

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, PE, Brazil; E-Mails: lucia-patricia@hotmail.com (L.P.B.G.S.); ebeltrao@hotmail.com (E.I.C.B.); lbcj@hotmail.com.br (L.B.C.J.)

² Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns 55290-000, PE, Brazil

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, PE, Brazil; E-Mails: elizabeth.almeidalafayette@gmail.com (E.A.L.); cezar.amoriim@gmail.com (C.A.C.A.); tiagobento2006@gmail.com (T.B.O.); nenalima.mariadocarmo@gmail.com (M.C.A.L.)

⁴ Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (DFT/CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-970, SP, Brazil; E-Mails: aa_ruiz@hotmail.com (A.L.T.G.R.); carvalho@cpqba.unicamp.br (J.E.C.)

⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-859, SP, Brazil.

⁶ Departamento de Farmácia, Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; E-Mail: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed: E-Mail: sinara.monica@gmail.com; Tel.: +55-81-2126-8484; Fax: +55-81-2126-8485.

Academic Editor: Eric C. Long

Received: 27 March 2015 / Accepted: 29 May 2015 / Published: 2015

Abstract: In this work, the acridine nucleus was used as a lead-compound for structural modification by adding different substituted thiosemicarbazide moieties. Eight new (Z)-2-(acridin-9-ylmethylene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide derivatives (**3a–h**) were synthesized, their antiproliferative activities were evaluated, and DNA binding properties were performed with calf thymus DNA (ctDNA) by electronic absorption and

fluorescence spectroscopies. Both hyperchromic and hypochromic effects, as well as red or blue shifts were demonstrated by addition of ctDNA to the derivatives. The calculated binding constants ranged from 1.74×10^4 to $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and quenching constants from -0.2×10^4 to $2.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ indicating high affinity to ctDNA base pairs. The most efficient compound in binding to ctDNA *in vitro* was (Z)-2-(acridin-9-ylmethylene)-N-(4-chlorophenyl) hydrazinecarbothioamide (**3f**), while the most active compound in antiproliferative assay was (Z)-2-(acridin-9-ylmethylene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide (**3a**). There was no correlation between DNA-binding and *in vitro* antiproliferative activity, but the results suggest that DNA binding can be involved in the biological activity mechanism. This study may guide the choice of the size and shape of the intercalating part of the ligand and the strategic selection of substituents that increase DNA-binding or antiproliferative properties.

Keywords: acridine; thiosemicarbazone; DNA binding; antiproliferative

5.1 Introduction

DNA has a strong affinity for many heterocyclic aromatic compounds; hence studies of the interaction between DNA and new chemotherapeutic agents play a key role in the fight against cancer [1]. DNA recognition is a critical step in the antitumor action of DNA intercalators. Given that intercalation constitutes a pivotal step in several clinically used anticancer drugs such as anthracyclines, acridines, and anthraquinones [2], understanding how small molecules interact with DNA is crucial for the formulation of more powerful and selective anticancer agents [3].

The synthesis of acridine and analogues has attracted considerable attention from organic and medicinal chemists for many years [4]. Amsacrine (*m*-AMSA) is an anticancer agent that displays activity against refractory acute leukemia as well as Hodgkin and non-Hodgkin's lymphomas. The drug is comprised of an intercalative acridine moiety coupled to a 4'-amino-methanesulfon-*m*-anisidide head group. *m*-AMSA is historically significant in that it was the first drug demonstrated to function as a topoisomerase II poison. Although *m*-AMSA was designed as a DNA binding agent, much of its activity and specificity as topoisomerase II poison is embodied in the head group, while DNA intercalation is used primarily to increase the affinity of *m*-AMSA for the topoisomerase II-DNA cleavage complex [5]. Furthermore, DNA binding studies indicate that *m*-AMSA binds to DNA both by intercalation and by minor groove binding [6].

Although *m*-AMSA is a DNA-intercalator and inhibitor of topoisomerase II, its metabolism may be associated with the production of free radicals, which causes serious damage in both cancer cells and normal tissues. For this reason, its clinical use is limited and researchers have been seeking to make further chemical modifications to *m*-AMSA by changing the nature of the 9-anilino substituent and the substituent pattern on the aniline and acridine nuclei, leading to a range of new *m*-AMSA-like derivatives [7]. It is worthwhile noting that the replacement of the acridine moiety with the analogous 2-oxo-2H-pyrano[2,3-

b]quinolone system yielded *m*-AMSA-like compounds that showed drastically reduced anticancer activity as well as an ability to intercalate into double stranded DNA (dsDNA) [8].

One strategy that has been used for the synthesis of new acridine derivatives involves combining the acridine ring with a different and independently acting moiety into one covalently linked hybrid compound, using for example the thiazolidine or imidazolidine nucleus [9]. As Barros *et al.* [10] have demonstrated, synthesizing new acridine-thiazolidine derivatives causes a distortion of the double helix of dsDNA. Concerning the cytotoxicity activity, the thiazacridines were selective for solid tumor cell lines. On the other hand, Lafayette *et al.* [9] provided insight into the DNA binding mechanism of imidazacridine and thiazacridine derivatives suggesting both intercalation and external binding.

Thiosemicarbazone derivatives exhibit important biological activities [11], such as antibacterial [12], antimalarial, [13] and antitumor activities [14]. The antiproliferative properties of thiosemicarbazones have been attributed to their ability to chelate metal ions because of the presence of an NNS (Nitrogen–Nitrogen–Sulfur) tridentate set of donor atoms that bind not only iron, but also copper [15–17], molybdenum [18], nickel [16,19], zinc [17,19], and ruthenium [20]. The thiosemicarbazone-metal complexes are lipophilic and pass through the cell membrane to release the metal intracellularly. The free chelator can then complex with intracellular iron that can subsequently pass through the cell membrane mobilizing it out of the cell [21]. Besides, thiosemicarbazone antiproliferative activity can be due to DNA binding and cleavage, apoptosis induction, and cell enzyme inhibition [22,23]. The small molecule chelator 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP; Triapine[®], anotherapeutics, Alachua, FL, USA) inhibits the ribonucleotide reductase and prevents the replication of tumor cells by blocking a critical step in DNA synthesis [24]. This molecule is under Phase 2 clinical trials evaluation for the treatment of solid tumors such as cervical and vaginal cancers [25].

Recently, several kinds of thiosemicarbazone derivatives were synthesized and their antitumor activities were also reported [26–30]. Geng *et al.* [31] used the anthracyclines as lead-compounds for structural modification by adding thiosemicarbazide to the anthraquinone ring.

(*E*)-2-((1,4-Dihydroxy-9,10-anthraquinone-2-yl)methylene)-*N*-(4-fluorophenyl)hydrazinecarbothioamide (DAFPT) was successfully synthesized and its interaction with ctDNA showed groove binding and preference for A–T rich regions. It was expected that this structural modification might overcome drug resistance and decrease the cardiotoxicity of anthracyclines.

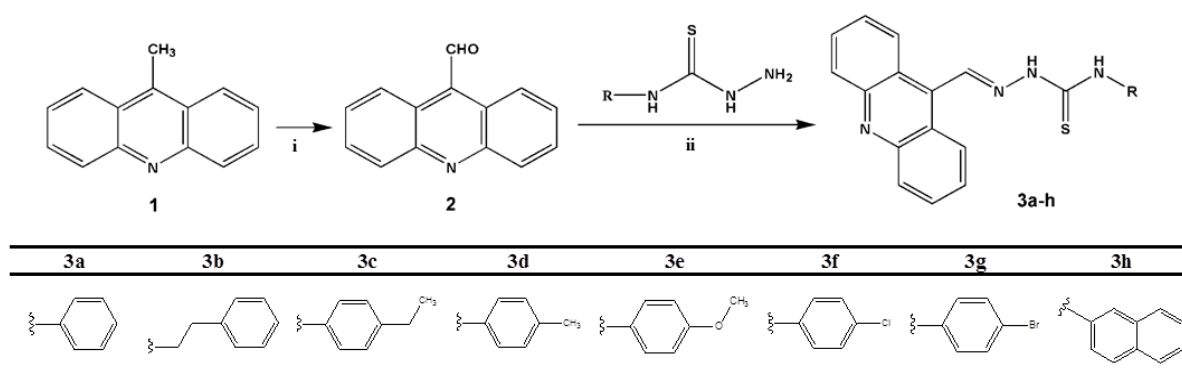
In this work, the acridine nucleus was used as a lead-compound for structural modification by adding different substituted thiosemicarbazide moieties. This paper describes the synthesis, DNA binding properties using ctDNA, as well as the antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives.

5.2 Results and Discussion

5.2.1 Chemistry

The reaction sequence used for the synthesis of novel acridine-thiosemicarbazone compounds is shown in Scheme 1. The compound 9-methylacridine (**1**) was prepared from diphenylamine with zinc dichloride in acetic acid according to Tsuge *et al.* [32]. Subsequently, the oxidation of **1** with pyridinium chlorochromate (PCC) was accomplished according to Mosher and Natale [33] yielding 9-acridinaldehyde (**2**). Compound **2** was used as starting reagent in the synthesis of different types of acridine-thiosemicarbazone derivatives. Thiosemicarbazides were synthesized in good yields (>90%) by adding hydrazine hydrate to different aryl isothiocyanates as previously described [34]. Thus, condensation of different thiosemicarbazide derivatives with 9-acridinaldehyde afforded the corresponding acridine-thiosemicarbazone derivatives **3a–h** (Scheme 1).

All known compounds (**1**, **2** and thiosemicarbazides) were identified by comparison with literature data. All new compounds (**3a–h**) were characterized by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, high-resolution mass spectrometry and infrared spectroscopy (Figures S1–S16 and Table S2).



Scheme 1. Synthesis of acridine-thiosemicarbazone derivatives. Reagents and conditions: (i) pyridinium chlorochromate (PCC); (ii) EtOH, CH_3COOH , reflux, 70°C .

5.2.2 DNA Binding Studies

The absorption spectra of the new acridine-thiosemicarbazone derivatives **3a–h** show that all compounds displayed absorption bands in the region of 300–500 nm. The different donor or acceptor substituents present in compounds **3c–h** induced red shifts on UV–Vis spectra relative to that of **3a**, with exception of **3f**. In order to examine the general affinity of the derivatives **3a–h** to dsDNA, the binding interactions of these ligands with calf thymus DNA (ctDNA) were examined by spectrophotometric titrations. It is widely accepted that if the compounds can bind to DNA, their UV–Vis curves result in a characteristic shift of the absorption maximum wavelength (bathochromic or hypsochromic shift) and a decrease (hypochromicity) [35,36] or increase (hyperchromicity) of the absorbance [9]. The absorption spectra of **3a** (50 μM) in both the absence and presence of ctDNA (0–120 μM) are given in Figure 1 (for the other derivatives see Figures S17–S23). The curve shows significant hyperchromicity (92.58% at 120 μM of ctDNA) and a slight bathochromic shift ($\Delta\lambda$ 6 nm) with increasing ctDNA concentration, indicating a complex **3a**-DNA formation. In the presence of ctDNA, all compounds (**3a–h**) produced hyperchromic or hypochromic effects, with the highest hypochromism being induced by the **3f** derivative

(Table 1). With the exception of compound **3g**, all complexes with ctDNA showed bathochromic or hypsochromic effects with the most remarkable shifts for derivatives **3a** and **3h**, 6 nm and 12 nm, respectively.

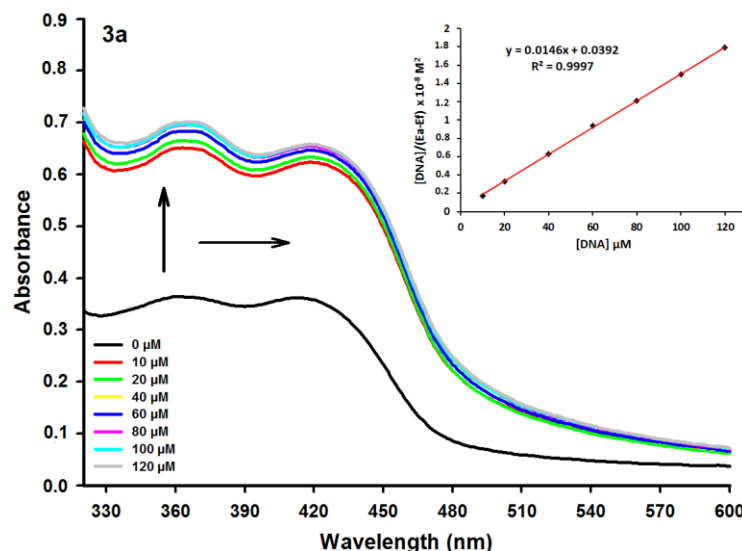


Figure 1. Absorption spectra of derivative **3a** (50 μM) with increasing concentrations of calf thymus DNA (ctDNA). $[\text{DNA}] = 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100$ and $120 \mu\text{M}$. Arrows ($\uparrow$) and ($\rightarrow$) refer to hyperchromic, and bathochromic effects, respectively. Inset: Plot of $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ as function of DNA concentration as determined from the absorption spectral data.

Table 1. UV–Vis absorption and fluorescence emission data of new acridine-thiosemicarbazone derivatives in the absence and presence of ctDNA.

Compound	λ_{max} Absent (nm)	λ_{max} Present (nm)	Extinction Coefficient (ϵ , M^{-1})	$\Delta\lambda$ (nm)	Hypochr. (%) ^a	Hyperchr. (%) ^b	K_b (M^{-1})	λ Excitation (nm)	λ Emission (nm)	K_{SV} ^c (M^{-1})
3a	360	366	7.300	6	–	92.58	3.77×10^5	359	439	0.92×10^4
3b	375	372	8.600	3	–	28.13	1.84×10^5	370	441	-0.2×10^4
3c	376	375	13.780	1	20.32	–	1.2×10^5	370	440	0.18×10^4
3d	375	371	14.040	4	4.69	–	1.74×10^4	370	441	0.87×10^4
3e	375	371	8.760	4	–	25.22	6.5×10^4	361	441	-0.27×10^4
3f	357	358	14.860	1	39.59	–	1.0×10^6	355	440	2.18×10^4
3g	362	362	9.200	0	–	24.4	9.91×10^4	352	439	0.5×10^4
3h	383	371	11.546	12	11.54	–	8.47×10^5	350	439	1.75×10^4

^a Hypochromicity for complexes formed by compounds (**3a–h**) and 120 μM of ctDNA in comparison to free ligands; ^b Hyperchromicity for complexes formed by compounds (**3a–h**) and 120 μM of ctDNA in comparison to free ligands; ^c Stern–Volmer quenching constant, K_{SV} , obtained from fluorimetric titrations with ctDNA.

After compound intercalation into the DNA base pairs, the π orbitals of the intercalated compounds are able to couple with the π orbitals of the base pairs, thereby decreasing the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition energies [15]. These interactions result in the observed hypochromism that is

predictive of intercalation [37]. Besides this, the hypochromic effect and the red shift of the absorption maximum are characteristic of the association of a ligand with DNA [38] which is similar to the interaction recently observed for ctDNA and thiazacridine [9]. These results indicate that the acridine ring has an important role in the DNA interaction process [8] and confirm that both hyperchromic and hypochromic effects, as well as red or blue shifts reflect different degrees of DNA helix structure changes [39].

Absorbance intensity changes were used to calculate the DNA binding constants (K_b) of the acridine-thiosemicarbazone derivatives according to McGhee and von Hippel (Table 1) [40]. The calculated K_b ranged from 1.74×10^4 to $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, proves a high affinity of the new acridine-thiosemicarbazone derivatives for ctDNA base pairs. Typical K_b for intercalation complexes between organic dyes and DNA range from 1×10^4 to $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and are usually significantly smaller than the binding constants of groove binders (1×10^5 to $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) [41]. The K_b values increased as follows: **3d** < **3e** < **3g** < **3c** < **3b** < **3a** < **3h** < **3f**. The high K_b presented by **3f** suggests a strong binding towards ctDNA.

Acridine substitution with thiosemicarbazone moiety influenced positively the intercalation power of the new derivatives since amsacrine-DNA link analysis has shown that the binding constant of the formed complex was $K_b = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, indicating weak or moderate strength of binding between them [6]. The binding constants of 3,6-bis(3-alkylguanidino)acridines with ctDNA investigated by UV-Vis and fluorescence spectroscopies, were estimated to range from 1.25×10^5 to $5.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and the percentage of hypochromism was found to be 17%–42% (from spectral titration) [42]. DNA binding constant studies of *N*-(9-acridinylthiocarbamoyl) amino acids (glycine, proline, leucine, histidine, phenylalanine, and tryptophan) derivatives by UV-Vis spectrophotometry, fluorescence titration, and quantum chemical calculation revealed that the lowest binding affinity was observed for *N*-(9-acridinylthiocarbamoyl)glycine ($K = 1.4 \times 10^5$) and the highest for *N*-(9-acridinylthiocarbamoyl) tryptophan ($K = 2.9 \times 10^6$) [43].

Herein, the highest K_b value (1.0×10^6) was demonstrated by the chloro-substituted derivative **3f**. This result indicates that a chloro substituent affects positively the ability of a ligand to bind to ctDNA, since it can increase the ligand's hydrophobic properties. In addition, the chloro atom leads to a slightly changed dipole of the ligand, thus increasing dipole-dipole interactions in the binding site, and it may even operate as a hydrogen-bond acceptor [44]. Derivative **3h** presented the second highest K_b value (8.47×10^5), this finding supports the idea that intercalative π -stacking interactions of the ligands with DNA are essential for their efficient electron transfer reaction. Moreover, uniformity of K_b magnitudes for different substituted acridine rings validates the assumption that the DNA binding mechanism is heavily dependent on a common structural component of all studied systems, that is, the acridine skeleton, while its lateral substituents influence binding to a much lesser extent [45].

Spectrofluorimetric studies were also performed to analyze the binding properties between acridine-thiosemicarbazone derivatives and ctDNA. Table 1 summarizes the fluorescence emission from the derivatives under investigation (excitation and emission spectra can be seen in Figures S24–S31). Compounds **3a–h** exhibited an emission band in the range of 400–500 nm. Excitation wavelengths were at 350–370 nm and spectra were monitored at a fixed

concentration of 15 μM of each derivative and different ctDNA concentrations. The fluorescence of acridine-thiosemicarbazone derivatives was quenched upon addition of ctDNA, except for **3b** and **3e** derivatives that exhibited an increase in their fluorescence intensity upon DNA addition. In general, the enhancement of fluorescence intensity may be explained by a significant suppression of the conformational flexibility of the ligand within the DNA–ligand complex [38]. Figure 2 presents the emission spectra of **3a** in the presence of different concentrations of ctDNA (for the other derivatives see Figures S32–S38).

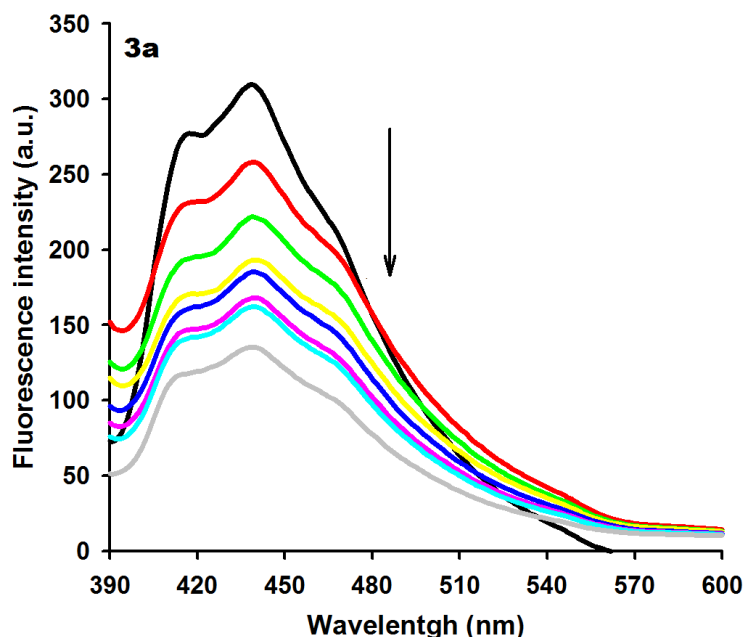


Figure 2. Fluorescence spectra of derivative **3a** (15 μM) with increasing concentrations of ctDNA. [DNA] = 0 (black), 10 (red), 20 (green), 40 (yellow), 60 (blue), 80 (pink), 100 (light blue) and 120 (gray) μM . Arrow ($\downarrow$) refers to hypochromic effect.

The efficiency of the quenching process was deduced from the plot of the relative emission intensity, I_0/I , versus the DNA concentration (Figure 3) [46]. According to the resulting Stern–Volmer quenching constants, K_{SV} , the most pronounced quenching was demonstrated by **3f** derivative ($2.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). K_{SV} values decreased as follows: **3f** > **3h** > **3a** > **3d** > **3g** > **3c** > **3e** > **3b**. The emission intensity of the derivatives is quenched upon addition of DNA, most likely due to an efficient electron transfer between the excited ligand and the ctDNA bases. Emission-quenching phenomena reflect the interaction between the derivatives and ctDNA, consistent with the electronic absorption spectroscopy results [47]. Both Stern–Volmer (K_{SV}) and binding constants (K_b) of the derivatives indicate static quenching due to complex formation by the new derivatives and ctDNA. The results indicate that the most efficient compound in binding to ctDNA *in vitro* was **3f** (39.59% hypochromism and the highest K_b , K_{SV} values).

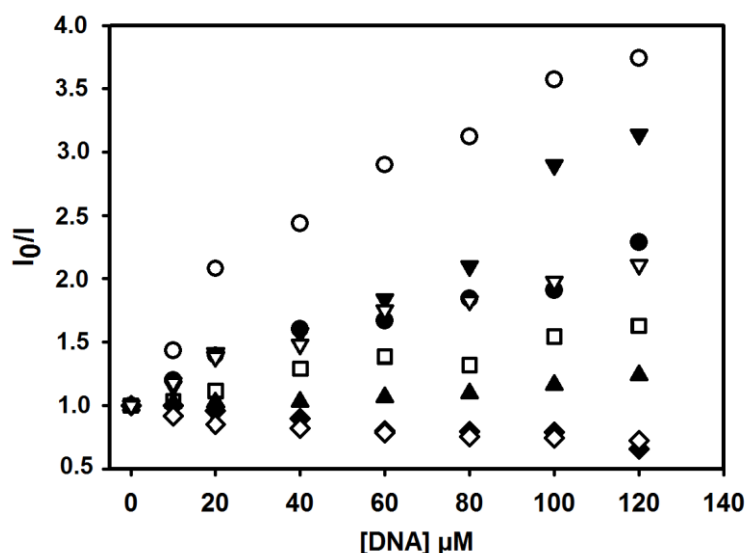


Figure 3. Relative fluorescence intensities of acridine-thiosemicarbazone derivatives **3a** (●), **3b** (◇), **3c** (▲), **3d** (▽), **3e** (◆), **3f** (○), **3g** (□) and **3h** (▼), upon addition of ctDNA in Tris buffer (0.01 M, pH = 7.6).

According to fluorescence emission studies of the interaction of ctDNA and 3'-azido-daunorubicin thiosemicarbazone performed by Cui *et al.* [48], the increasing amounts of ctDNA caused fluorescence intensity decrease without apparent shift of maximum fluorescence emission wavelength, which indicated the ctDNA binding. Interaction evaluation of DAFPT and ctDNA by competitive DNA binding assay demonstrated that DAFPT induced a fluorescence intensity decrease of ctDNA-ethidium bromide complex, probably through displacement of intercalated ethidium bromide from the adjacent base pairs of ctDNA [31]. These results demonstrated that thiosemicarbazone groups do not impair the DNA binding properties of other well established intercalators such as daunorubicin and the anthraquinone ring. In this work, the new acridine-thiosemicarbazones were able to interact with ctDNA since both the “light up” and “light off” effects were observed in fluorescence emission spectra.

5.2.3 Antiproliferative Activity of **3a–h**

To determine the antiproliferative properties of the derivatives **3a–h**, their *in vitro* antitumoral activities were assessed using nine different human tumor cell lines: glioma (U251), leukemia (K-562), breast (MCF7), breast resistant (NCI-ADR), kidney (786-O), lung (NCI-460), ovarian (OVCAR), prostate (PC-3), and colon (HT-29) and a normal cell line of human keratinocyte (HaCat). The compounds were used at concentrations ranging from 0.25 to 250 mg/mL; doxorubicin (DOX) and *m*-AMSA were used as positive controls. The analysis of cell growth inhibition (GI) was performed using the sulforhodamine B (SRB) assay. The anti-cancer activity (μM) of a tested compound was given by two parameters for each cell line: GI₅₀ (molar concentration of the compound that inhibits 50% cell growth) and TGI (molar concentration of the compound leading to total inhibition of the cell growth) [49].

The type of side chain influences the cytotoxic activities of acridine derivatives [50]. For acridine-thiosemicarbazone derivatives, the nature of the substituent on the phenyl ring significantly influenced the antiproliferative activity (Table 2). The most active derivative was **3a** as demonstrated in Figure 4 (for the other derivatives see Figures S39–S45). Compound **3a** inhibited the growth of all cell lines in a dose-dependent manner, with GI_{50} values lower than 10 μ M for all tumor cell lines. Tumor cell selectivity was not observed in the growth inhibition, but the pattern was similar to the positive control *m*-AMSA, also presented in Figure 4. However, the GI_{50} concentrations of **3a** ranged widely from 3- to 30-fold higher than those for *m*-AMSA.

Notably, derivatives with electron-withdrawing (**3f**, **3g**) and electron-donating substituents (**3c**, **3d** and **3e**) presented a dramatic decrease in antiproliferative activity as demonstrated by GI_{50} and TGI values (Table 2). Compound **3b** bears an ethylene group as spacer between the nitrogen of the thiosemicarbazone moiety (acridine–C=N–N–C(S)–N) and the phenyl ring that negatively influenced the antiproliferative activity when compared to **3a**, as indicated by the difference in GI_{50} values (approximately 10-times higher). It was supposed that a high rotational freedom for the phenyl ring in **3b** permitted substituent rotation negatively influencing its growth inhibition activity. Bulky substituents on the phenyl ring also caused a decrease of antiproliferative power, as can be seen from the GI_{50} and TGI values of the pair **3a** and **3h**. Derivative **3g** presenting the 4-bromophenyl moiety exhibited selective cytostatic effects on OVCAR-3 cells.

The lethal concentration LC_{50} , represents the drug concentration required to kill 50% of the initial cell number, giving an idea of the cytotoxic action of the drug. Considering the LC_{50} (50% cell kill) values, compound **3a** was lethal to NCI-H460, MCF-7, U251, NCI-ADR/RES, HT-29, and PC-3 cells at the respective concentrations: 43.41, 60.26, 68.93, 70.2, 70.24, and 72.95 μ M. For the others cell lines, **3a** LC_{50} concentrations were above 300 μ M.

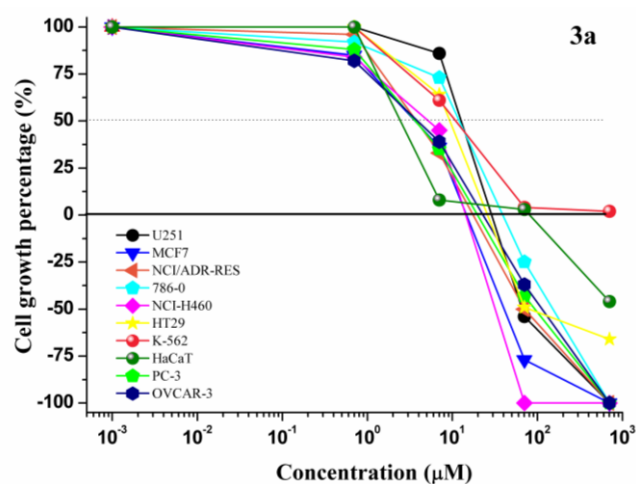


Figure 4. Antiproliferative activity of **3a** (concentrations of 0.7, 7.0, 70 and 702 μM) and amsacrine (*m*-AMSA) (concentrations of 0.6, 6.35, 63.5 and 635 μM) against nine cancerous cell lines: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (breast adenocarcinoma); NCI-ADR/RES (ovary, multidrug resistance phenotype); 786-O (kidney); NCI-H460 (lung non-small cell adenocarcinoma); PC-3 (prostate); OVCAR-3 (ovary); HT-29 (colon); K-562 (Chronic myeloid leukemia) and human keratinocytes (HaCaT).

Table 2. GI₅₀ and TGI (in μ M) values for tested compounds **3a–h**, doxorubicin (DOX) and amsacrine (*m*-AMSA) as positive controls.

Compound	Cancer Cell Lines ^a																			
	U251		MCF-7		NCI-ADR		786-O		NCI-H460		PC-3		OVCAR-3		HT-29		K-562		HaCaT	
	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI	GI ₅₀	TGI
3a	8.74	33.75	6.85	12.92	6.35	17.24	7.99	41.66	6.97	10.58	6.30	18.88	4.41	21.13	7.54	29.28	9.26	>100	4.17	51.42
3b	80.84	>100	66.72	n.a.	>100	n.a.	64.44	92.31	16.75	>100	73.74	>100	7.26	98.48	>100	n.a.	n.a.	n.a.	>100	n.a.
3c	>100	n.a.	62.73	n.a.	62.94	n.a.	28.75	>100	8.63	n.a.	22.98	n.a.	8.38	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.00	>100
3d	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3e	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3f	>100	n.a.	27.19	>100	73.15	>100	>100	n.a.	28.36	n.a.	40.33	n.a.	62.41	>100	>100	n.a.	64.64	>100	>100	n.a.
3g	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	>100	n.a.	>100	n.a.	45.89	>100	0.98	65.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3h	>100	n.a.	69.24	n.a.	68.26	>100	>100	n.a.	70.37	n.a.	50.88	n.a.	71.39	>100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	70.06	n.a.
DOX ^b	0.046	1.20	0.036	1.48	0.24	3.80	0.051	0.63	0.04	0.54	0.075	1.20	0.17	1.52	0.43	8.37	0.18	27.64	0.053	0.42
<i>m</i> -AMSA	0.26	2.81	0.23	6.96	2.01	11.94	0.52	3.14	0.47	2.58	0.39	5.37	0.87	4.26	0.64	4.66	0.18	1.82	0.46	0.86

^a U251 (glioma, SNC); MCF-7 (breast adenocarcinoma); NCI-ADR/RES (ovary, multidrug resistance phenotype); 786-O (kidney); NCI-H460 (lung non-small cell adenocarcinoma); PC-3 (prostate); OVCAR-3 (ovary); HT-29 (colon); K-562 (Chronic myeloid leukemia); HaCaT (human keratinocytes);

^b Doxorubicin (DOX) was employed as the positive control. Cell lines were exposed to the compounds in DMSO/RPMI/FBS 5% at 37 °C, 5% CO₂, for 48 h. n.a. = non-active at highest tested concentration (600 μ M).

Even though there was no quantitative correlation between DNA-binding and *in vitro* activity, a lack of activity was observed for **3d** and **3e**, which possess the weakest K_b values, 1.74×10^4 and 6.5×10^4 , respectively, and the most active compound **3a** presented the third highest K_b value (3.77×10^5). The chloro-substituted derivative **3f** showed the highest K_b value, but its antiproliferative activity was dramatically lower than **3a** and similar to other substituent groups that have essentially the same steric requirement such as methyl- and bromo-substituted derivatives, **3d** and **3g** respectively. Our findings suggest that the biological activity could be due to the interaction with DNA and/or to any other not studied mechanism. This study may guide the choice of the size and shape of the intercalating part of the ligand and the strategic selection of substituents that increase DNA-binding or antiproliferative properties.

5.3 Experimental Section

5.3.1 Materials and Methods

The starting materials hydrazine hydrate, phenyl-, 4-tolyl-, 4-chlorophenyl-, 1-naphthyl-, 4-bromophenyl-, 4-methoxyphenyl-, 4-ethylphenyl- and 2-phenylethyl-isothiocyanate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and were used as received for the synthesis of different thiosemicarbazides. Common solvents used for synthesis and analysis were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany) and Fluka (Buchs, SG, Switzerland) and used without purification. Melting points were measured in capillary tubes on a Quimis Model 340.27 apparatus (Quimis, Diadema, Brasil). Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 plates from Merck (Darmstadt, Germany) with fluorescent detection at 254 nm. Infrared (IR) spectroscopy were recorded on a Bruker IFS66 spectrometer (Bruker, Berlin, Germany), using KBr pellets. The proton (^1H -NMR) and carbon (^{13}C -NMR) NMR experiments were performed on Varian Model Plus Spectrophotometer (Varian, Santa Clara, CA, USA) at 300 MHz, in DMSO- d_6 as solvent. Mass spectra were recorded on matrix-assisted laser desorption/ionization recorded with a time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF) Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). UV-Vis spectra were measured on an Ultraspec 3000 PRO UV-Visible spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) and fluorescence spectra on a JASCO FP-6300 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) spectrofluorometer.

5.3.2 General Preparation of the Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives **3a–h**

The starting thiosemicarbazide	(<i>N</i> -phenylhydrazinecarbothioamide;
<i>N</i> -(4-chlorophenyl)hydrazinecarbothioamide;	<i>N</i> -(naphthalen-1-
yl)hydrazinecarbothioamide;	
<i>N</i> -(4-bromophenyl)hydrazinecarbothioamide;	<i>N</i> -(4-
methoxyphenyl)hydrazinecarbothioamide;	

N-phenethylhydrazinecarbothioamide; *N*-(4-ethylphenyl)hydrazinecarbothioamide and *N*-(*p*-tolyl)hydrazinecarbothioamide) were prepared according to the published procedures [34,51].

Compound 2, 9-acridinaldehyde, (1.0 equivalent) and the thiosemicarbazide of choice (1.0 equivalent), were refluxed in ethanol (10 mL) in the presence of acetic acid (30 drops) and heated at 70 °C for 24 h. After this period, the mixture was filtered and washed with water and ethanol.

5.3.2.1 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-*N*-phenylhydrazinecarbothioamide (**3a**)

Yellow solid. Formula: C₂₁H₁₆N₄S; M.W.: 356.44 g/mol; Melting point: 208–209 °C; Yield: 65%; Rf: 0.55 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.19 (t, 1H, phenyl, *J* = 7.5 Hz), 7.36 (t, 2H, phenyl, *J* = 7.8 Hz), 7.60 (d, 2H, phenyl, *J* = 7.8 Hz), 7.72 (t, 2H, acridine, *J* = 8.4 Hz), 7.89 (t, 2H, acridine, *J* = 8.4 Hz), 8.20 (d, 2H, acridine, *J* = 8.7 Hz), 8.61 (d, 2H, acridine, *J* = 8.7 Hz), 9.39 (s, 1H, =CH), 10.23 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR: δ 123.3, 123.9, 124.9, 125.1, 126.9, 127.9, 128.4, 129.5, 130.8, 130.2, 134.6, 138.8, 139.8, 148.1, 176.3. IR (cm⁻¹): 3114 (C–H), 3500 (NH), 1202 (C=S). MS (*m/z*): calculated = 357.1129; found = 357.124.

5.3.2.2 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-*N*-phenethylhydrazinecarbothioamide (**3b**)

Yellow solid. Formula: C₂₃H₂₀N₄S; M.W.: 384.49 g/mol; Melting point: 220–221 °C; Yield: 97%; Rf: 0.48 (*n*-hexane/EtOAc 8:2). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.93 (t, 3H, *J* = 10.4 Hz, CH₃), 3.80 (q, 2H, *J* = 8.4 Hz, CH₂), 7.27–7.18 (m, 5H, phenyl), 7.68 (t, 2H, *J* = 10.0 Hz, acridine), 7.88 (t, 2H, *J* = 9.6 Hz, acridine), 8.19 (d, 2H, *J* = 11.6, acridine), 8.49 (d, 2H, *J* = 10.8, acridine), 8.50 (s, 1H, =CH–), 9.27 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR: δ 34.92, 45.67, 123.88, 125.66, 125.66, 126.64, 126.64, 127.59, 127.59, 128.88, 128.88, 129.12, 129.12, 130.18, 130.18, 130.76, 130.76, 135.48, 139.56, 139.68, 148.71, 148.71, 177.77. IR (cm⁻¹): 3667.95 (NH), 3140.25 (NH), 1520.45 (C=S). MS (*m/z*): calculated = 385.1442; found = 385.134.

5.3.2.3 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-*N*-(4-ethylphenyl)hydrazinecarbothioamide (**3c**)

Pale green solid. Formula: C₂₃H₂₀N₄S; M.W.: 384.49 g/mol; Melting point: 213–214 °C; Yield: 98%; Rf: 0.6 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.18 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃), 2.57 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 7.18 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, acridine), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, acridine), 7.71 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, acridine), 7.89 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, acridine), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, phenyl), 8.60 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, phenyl), 9.38 (s, 1H, =CH–), 10.08 (s, 1H, NH), 12.16 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR: δ 15.66, 27.70, 123.47, 123.47, 125.33, 125.33, 125.40, 125.40, 127.16, 127.16, 127.38, 127.38, 129.67, 129.67, 130.32, 130.32, 134.86, 136.57, 139.81, 140.91, 148.23, 148.23,

176.43. IR (cm^{-1}): 1536.91 (C=S), 2968.91 (=CH–), 3125.53 (NH), 3400.00 (NH). MS (m/z): calculated = 385.1442; found = 385.131.

5.3.2.4 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(p-tolyl)hydrazinecarbothioamide (**3d**)

Yellow solid. Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}$; M.W.: 370.47 g/mol; Melting point: 119–221 °C; Yield: 90%; Rf: 0.55 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.29 (s, 3H, CH_3), 7.15 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, acridine), 7.45 (d, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridine), 7.71 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridine), 7.89 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$, acridine), 8.20 (d, 2H, $J = 9.2\text{Hz}$, phenyl), 8.60 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, phenyl), 9.38 (s, 1H, =CH–), 10.01 (s, 1H, NH), 12.15 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR: δ 20.56, 123.48, 123.48, 125.34, 125.34, 125.37, 125.37, 127.16, 127.16, 128.56, 128.56, 129.68, 129.68, 130.32, 130.32, 134.55, 134.89, 136.37, 139.80, 148.25, 176.48. IR (cm^{-1}): 3671.99 (NH), 3129.28 (NH), 1534.92 (C=S). MS (m/z): calculated = 371.1286; found = 371.120.

5.3.2.5 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-methoxyphenyl)hydrazinecarbothioamide (**3e**)

Yellow solid. Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS}$; M.W.: 386.47 g/mol; Melting point: 219–220 °C; Yield: 82%; Rf: 0.43 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 6.91 (m, 2H, acridine), 7.46 (m, 2H, acridine), 7.70 (m, 2H, phenyl), 7.87 (m, 2H, phenyl), 8.19 (m, 2H, acridine), 8.60 (m, 2H, acridine), 9.38 (s, 1H, =CH–), 9.25 (s, 1H, NH), 12.02 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR: δ 55.09, 113.21, 113.21, 123.32, 123.32, 125.09, 125.09, 126.69, 126.69, 126.86, 126.86, 129.50, 129.50, 129.99, 129.99, 131.69, 134.66, 139.57, 148.11, 148.11, 156.83, 176.67. IR (cm^{-1}): 1514.52 (C=N), 1533.44 (C=S), 3138.17 (NH), 3320.32 (NH). MS (m/z): calculated = 387.1235; found = 387.073.

5.3.2.6 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-chlorophenyl)hydrazinecarbothioamide (**3f**)

Yellow solid. Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{S}$; M.W.: 390.88 g/mol; Melting point: 225–226 °C; Yield: 86.5%; Rf: 0.54 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.40 (d, 2H, phenyl, $J = 6.8\text{Hz}$), 7.63 (d, 2H, phenyl, $J = 7.6\text{Hz}$), 7.72 (t, 2H, acridine, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.89 (t, 2H, acridine, $J = 7.2\text{Hz}$), 8.21 (d, 2H, acridine, $J = 9.2\text{Hz}$), 8.59 (d, 2H, acridine, $J = 8.4\text{Hz}$), 9.39 (s, 1H, =CH–), 10.23 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR: δ 123.3, 123.9, 124.9, 125.1, 126.9, 127.9, 128.4, 129.5, 130.8, 130.2, 134.6, 138.8, 139.8, 148.1, 176.3. IR (cm^{-1}): 3114 (C–H), 3500 (NH), 1202 (C=S). MS (m/z): calculated = 391.0739; found = 391.041.

5.3.2.7 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(4-bromophenyl)hydrazinecarbothioamide (**3g**)

Yellow solid. Formula: $C_{21}H_{15}BrN_4S$; M.W.: 435.34 g/mol; Melting point: 222–224 °C; Yield: 82%; Rf: 0.45 (*n*-hexane/EtOAc 7:3). 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.56 (q, 4H, phenyl, J = 8.8Hz), 7.75 (t, 2H, J = 8.4Hz, acridine), 7.94 (t, 2H, J = 8.0Hz, acridine), 8.23 (d, 2H, J = 8.8Hz, acridine), 8.62 (d, 2H, J = 8.8Hz, acridine), 9.40 (s, 1H, =CH–), 10.24 (s, 1H, NH), 12.31 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR: δ 117.60, 117.60, 123.52, 123.52, 123.52, 123.52, 125.51, 125.51, 127.34, 127.34, 127.45, 127.45, 127.45, 127.45, 130.91, 130.91, 130.91, 138.38, 140.05, 140.05, 176.48. IR (cm^{-1}): 3350.00 (NH), 3128.54 (NH), 1539.02 (C=S). MS (m/z): calculated = 436.0180; found = 436.968.

5.3.2.8 (Z)-2-(Acridin-9-ylmethylene)-N-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide (**3h**)

Yellow solid. Formula: $C_{25}H_{18}N_4S$; M.W.: 406.50 g/mol; Melting point: 208–210 °C; Yield: 32%; Rf: 0.55 (*n*-hexane/EtOAc 6:4). 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.49 (t, 2H, J = 8.1Hz, acridine), 7.58–7.54 (m, 3H, naphthyl), 7.61 (t, 2H, J = 8.4Hz, acridine), 7.78–8.50 (m, 3H, naphthyl), 8.17 (d, 2H, J = 7.8Hz, acridine), 8.28–8.32 (m, 1H, naphthyl), 8.82 (d, 2H, J = 8.7Hz, acridine), 9.51 (s, 1H, =CH–), 10.49 (s, 1H, NH), 12.41 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR: δ 157.95, 136.69, 133.85, 133.85, 133.85, 128.29, 128.29, 127.59, 126.04, 126.04, 126.04, 126.04, 125.63, 125.63, 125.63, 125.27, 125.27, 125.27, 123.56, 123.56, 122.69, 122.69, 121.91, 121.91, 115.37. IR (cm^{-1}): 3309.48 (NH), 3199.93 (NH), 1471.72 (C=S), 1212.81 (C–N). MS (m/z): calculated = 407.1286; found = 407.024.

5.3.3 UV–Vis Absorption Measurements

UV–Vis spectra titrations were performed using 0.01 M Tris buffer, pH 7.6. Calf thymus DNA (ctDNA) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and 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 coefficient $6600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 260 nm [52]. The DNA purity was determined by monitoring the value of the A_{260}/A_{280} ratio. DNA concentration was expressed as micromolar equivalents of the base pairs. Acridine-thiosemicarbazone derivatives were dissolved in DMSO at a concentration of 1 mM (stock solution) from which working solutions of concentrations ranging from 10 to 50 μM were prepared by dilution using Tris buffer. After compound concentration optimization, ctDNA titration was performed with constant acridine derivative 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) [40]:

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

where ε_a , ε_b and ε_f are the apparent, bound with DNA, and free extinction coefficients of compounds, respectively. ε_a , ε_b and ε_f are all calculated from the Lambert–Beer's law (ε

= $A/[\text{compound}]$). 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 the Origin 8.0[®] software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.3.4 Fluorescence Measurements

Fluorescence measurements of non-bound derivatives were performed with solution concentration of 15 μM in 0.01 M Tris buffer, pH 7.6. Emission spectra were recorded in the region 380–600 nm using an excitation wavelength of 356–364 nm. All measurements were performed at 25 °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 μM bp) directly into the cell containing derivative solutions. Fluorescence intensities of compound solutions exposed to different ctDNA concentrations were used to calculate the Stern–Volmer constant, K_{SV} , by the following Equation (2) [46]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

where F_0 and F are the steady-state fluorescence intensities of compounds in the absence and in the presence of quencher (ctDNA), K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant, and $[Q]$ is the concentration of quencher.

5.3.5 Determination of Antiproliferative Activity

Nine human cancer cell lines (U251 (glioma, CNS), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovarian expressing phenotype multiple drugs resistance), 786-O (kidney), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-03 (ovarian), HT-29 (colon adenocarcinoma) and K-562 (chronic myeloid leukemia)) and a normal cell line HaCat (human keratinocyte) were kindly provided by Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute, Frederick, MA, USA. Stock cultures were grown in 5 mL of RPMI-1640 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL). Penicillin: streptomycin mixture 1000 U/mL:1000 $\mu\text{g/mL}$ (1 mL/L RPMI-1640) was added to experimental cultures. Cells in 96-well plates (100 μL cells/well, cell densities can be seen in Table S1) were exposed to different concentrations of samples (0.25, 2.5, 25 and 250 $\mu\text{g/mL}$) in DMSO/RPMI/FBS 5% at 37 °C, 5% CO_2 , for 48 h. Final DMSO concentration did not affect cell viability. Cells were then fixed with trichloroacetic acid solution (50%, v/v) and cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using sulforhodamine B assay [49]. Doxorubicin (DOX; 0.025–25 $\mu\text{g/mL}$) and *m*-AMSA at the same concentration were used as a positive control. Three measurements were obtained: at the beginning of incubation (T_0) and 48 h post-incubation for compound-free (C) and tested (T) cells. The choice of 48 h incubation

was based on the NCI60 protocol, proposed by NCI/EUA for antiproliferative screening. Cell proliferation was determined according to the equation:

$$\text{Cell proliferation} = 100 \times [(T - T_0)/C - T_0] \quad (3)$$

Cytostatic effect was observed when $T_0 \leq T < C$ while cytocidal effect occurred when $T < T_0$. From the concentration–response curve for each cell line, GI_{50} , TGI, and LC_{50} values were determined through nonlinear regression analysis using the software Origin 8.0 (OriginLab Corporation). The experiments were done in triplicate.

5.4 Conclusions

Eight new (Z)-2-(acridin-9-ylmethylene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide derivatives (**3a–h**) proved binding constants with ctDNA in the range 1.74×10^4 to $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and quenching constants from -0.2×10^4 to $2.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ indicating high affinity to ctDNA base pairs. Combinations of hyperchromic or hypochromic effect and red or blue shifts were observed for most compounds, except for **3g** derivative. The most efficient compound in binding to ctDNA *in vitro* was the chloro-substituted derivative **3f** which was demonstrated by hypochromism, red shift and fluorescence quenching. On the other hand, the non-substituted phenyl ring derivative **3a** showed the highest antiproliferative activity. In comparison with biochemical and biological properties (**3a–h**) produced in this study the following conclusions can be drawn: both binding constants with ctDNA and antiproliferative activities were influenced by substitution on the phenyl ring of thiosemicarbazone moieties since the most active compounds did not possess substitution (**3a**). There was no correlation between electron-withdrawing (**3c**, **3d** and **3e**) or electron-donating substituents on the phenyl ring (**3f**, **3g**) and antiproliferative activity, since both dramatically decreased this property. The results indicate that the coupling of the acridine ring and the thiosemicarbazide moiety yielded new acridine-thiosemicarbazone derivatives with promising DNA binding. However, the characteristics of substituents on the phenyl ring influence both the DNA-binding and the antiproliferative properties.

Supplementary Materials

Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/6/xxx/s1>.

Acknowledgments

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

Author Contributions

Sinara Mônica Vitalino de Almeida participated in the study design, carried out the *in vitro* studies (cell culture and DNA binding assays) and wrote the manuscript. Cézar Augusto da Cruz Amorim participated in the chemical synthesis of the new derivatives. Tiago Bento de Oliveira and Ricardo Olímpio de Moura characterized all new compounds by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, high-resolution mass spectrometry and infrared spectroscopy. Elizabeth Almeida Lafayette and Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva performed DNA binding studies and analyzed the data. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz, and João Ernesto de Carvalho designed and supervised the antiproliferative study. Maria do Carmo Alves de Lima designed and supervised all study steps. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior and Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão supervised the study and reviewed the manuscript content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5.5 References

1. Maaloum, M.; Muller, P.; Harlepp, S. DNA-intercalator interactions: Structural and physical analysis using atomic force microscopy in solution. *Soft Matter* **2013**, *9*, 11233–11240.
2. Rescifina, A.; Zagni, C.; Varrica, M.G.; Pistarà, V.; Corsaro, A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 95–115.
3. Sheng, J.; Gan, J.; Huang, Z. Structure-based DNA-targeting strategies with small molecule ligands for drug discovery. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 1119–1173.
4. Kumar, R.; Kaur, M.; Kumari, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. *Acta Pol. Pharm.* **2012**, *69*, 3–9.
5. Ketron, A.C.; Denny, W.A.; Graves, D.E.; Osheroff, N. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1730–1739.

6. 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. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *114*, 38–43.
7. Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: Where are we now? *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 139–169.
8. Chilin, A.; Marzaro, G.; Marzano, C.; Via, L.D.; Ferlin, M.G.; Pastorini, G.; Guiotto, A. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 523–529.
9. Lafayette, E.A.; Almeida, S.M.V.; Pitta, M.G.R.; Beltrão, E.I.C.; Silva, T.G.; Moura, R.O.; Pitta, I.R.; Carvalho Júnior, L.B.; Lima, M.C.A. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules* **2013**, *18*, 15035–15050.
10. 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.; *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3533–3539.
11. Yu, Y.; Gutierrez, E.; Kovacevic, Z.; Saletta, F.; Obeidy, P.; Rahmanto, Y.S.; Richardson, D.R. Iron chelators for the treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2689–2702.
12. Viñuelas-Zahínos, E.; Luna-Giles, F.; Torres-García, P.; Fernández-Calderón, M.C. Co(III), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with 2-acetyl-2-thiazoline thiosemicarbazone: Synthesis, characterization, X-ray structures and antibacterial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 150–159.
13. Chellan, P.; Nasser, S.; Vivas, L.; Chibale, K.; Smith, G.S. Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity. *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 2225–2232.
14. Ferraz, K.O.S.; Cardoso, G.M.M.; Bertollo, C.M.; Souza-Fagundes, E.M.; Speziali, N.; Zani, C.L.; Mendes, I.C.; Gomes, M.A.; Beraldo, H. *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron* **2011**, *30*, 315–321.
15. Ali, A.Q.; Teoh, S.G.; Eltayeb, N.E.; Ahamed, M.B.K.; Majid, A.M.S.A. Synthesis of copper (II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: *In vitro* anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. *Polyhedron* **2014**, *74*, 6–15.
16. Chandra, S.; Vandana. Synthesis, spectroscopic, anticancer and antibacterial studies of Ni(II) and Cu(II) complexes with 2-carboxybenzaldehyde

- thiosemicarbazone. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *129*, 333–338.
17. Shao, J.; Ma, Z.-Y.; Li, A.; Liu, Y.-H.; Xie, C.-Z.; Qiang, Z.-Y.; Xu, J.-Y. Thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes as potential anticancer agents: Syntheses, crystal structure, DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *136*, 13–23.
 18. Hussein, M.A.; Guan, T.S.; Haque, R.A.; Ahamed, M.B.K.; Abdul Majid, A.M.S. Synthesis and characterization of thiosemicarbazone molybdenum(VI) complexes: *In vitro* DNA binding, cleavage, and antitumor activities. *Polyhedron* **2015**, *85*, 93–103.
 19. Kumar, S.M.; Rajesh, J.; Anitha, K.; Dhahagani, K.; Marappan, M.; Gandhi, N.I.; Rajagopal, G. Synthesis, characterization, crystal structure and cytotoxic properties of thiosemicarbazide Ni(II) and Zn(II) complexes. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *142*, 292–302.
 20. Thota, S.; Vallala, S.; Yerra, R.; Barreiro, E.J. Design, Synthesis, Characterization, Cytotoxic and Structure Activity Relationships of Novel Ru(II) Complexes. *Chin. Chem. Lett.* **2015**, in press.
 21. Kovacevic, Z.; Kalinowski, D.S.; Lovejoy, D.B.; Yu, Y.; Rahmanto, Y.S.; Sharpe, P.C.; Bernhardt, P.V.; Richardson, D.R. The medicinal chemistry of novel iron chelators for the treatment of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 483–499.
 22. Krishnan, K.; Prathiba, K.; Jayaprakash, V.; Basu, A.; Mishra, N.; Zhou, B.; Hu, S.; Yen, Y. Synthesis and ribonucleotide reductase inhibitory activity of thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6248–6250.
 23. Rao, V.A. Iron chelators with topoisomerase-inhibitory activity and their anticancer applications. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 930–955.
 24. Aye, Y.; Long, M.J.C.; Stubbe, J. Mechanistic studies of semicarbazone triapine targeting Human ribonucleotide reductase *in vitro* and in mammalian cells tyrosyl radical quenching not involving reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **2012**, *28*, 35768–35778.
 25. Kunos, C.A.; Radivoyevitch, T.; Waggoner, S.; Debernardo, R.; Zanotti, K.; Resnick, K.; Fusco, N.; Adams, R.; Redline, R.; Faulhaber, P.; *et al.* Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *130*, 75–80.
 26. Vandresen, F.; Falzirolli, H.; Batista, S.A.A.; Silva-Giardini, A.P.B.; Oliveira, D.N.; Catharino, R.R.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Foglio, M.A.; Silva, C.C. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 110–116.
 27. Xie, W.; Xie, S.; Zhou, Y.; Tang, X.; Liu, J.; Yang, W.; Qiu, M. Design and synthesis of novel 5,6-disubstituted pyridine-2,3-dione-3-thiosemicarbazone derivatives as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 22–27.

28. Gan, C.; Cui, J.; Su, S.; Lin, Q.; Jia, L.; Fan, L.; Huang, Y. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids* **2014**, *87*, 99–107.
29. Ali, A.Q.; Teoh, S.G.; Salhin, A.; Eltayeb, N.E.; Ahamed, M.B.K.; Abdul Majid, A.M.S. Synthesis of platinum(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: *In vitro* anti-cancer and deoxyribose nucleic acid binding activities. *Inorg. Chim. Acta* **2014**, *416*, 235–244.
30. Ali, A.Q.; Teoh, S.G.; Salhin, A.; Eltayeb, N.E.; Ahamed, M.B.K.; Abdul Majid, A.M.S. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: *In vitro* anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *125*, 440–448.
31. Geng, S.; Wu, Q.; Shi, L.; Cui, F. Spectroscopia study one thiosemicarbazone derivative with ctDNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 288–294.
32. Tsuge, O.; Nishinohara, M.; Tashiro, M.B. Compounds related to acridine. I. Condensation of acridine derivatives having active methyl group and aromatic nitroso compounds. *Bull. Chem. Soc.* **1963**, *36*, 1477–1485.
33. Mosher, M.D.; Natale, N.R. The preparation of intercalating isoxazoles via a nitrile oxide cycloaddition. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 779–781.
34. Gürsoy, A.; Terzioglu, N.; Ötük, G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 753–757.
35. Li, H.Y.; Yang, T.L.; Ding, L.; Wang, W.H. Synthesis, characterization, fluorescence and DNA-binding studies of europium(III) pirates complexes with amide-based 2,3-dihydroxynaphthalene derivatives. *J. Rare Earths* **2012**, *30*, 297–303.
36. Baranovsky, S.F.; Bolotin, P.A.; Evstigneev, M.P.; Chenyshev, D.N. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.* **2009**, *76*, 132–139.
37. Raja, D.S.; Bhuvanesh, N.S.P.; Natarajan, K. DNA binding, protein interaction, radical scavenging and cytotoxic activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde(2'-hydroxybenzoyl) hydrazone and its Cu(II) complexes: A structure activity relationship study. *Inorg. Chim. Acta.* **2012**, *385*, 81–93.
38. Faulhaber, K.; Granzhan, A.; Ihmels, H.; Otto, D.; Thomas, L.; Wells, S. Studies of the fluorescence light-up effect of amino-substituted benzo[b]quinolizinium derivatives in the presence of biomacromolecules. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1535–1545.
39. Zhou, C.Y.; Xi, X.L.; Yang, P. Studies on DNA binding to metal complexes of sal₂trien. *Biochemistry* **2007**, *72*, 37–43.

40. McGhee, J.D.; von Hippel, P.H. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Co-operative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469–489.
41. Ihmels, H.; Otto, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *258*, 161–204.
42. Plsikova, J.; Janovec, L.; Koval, J.; Ungvarsky, J.; Mikes, J.; Jendzelovsky, R.; Fedorocko, P.; Imrich, J.; Kristian, P.; Kasparkova, J. *et al.* 3,6-Bis(3-alkyl-guanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 283–295.
43. Sabolova, D.; Kozurkova, M.; Kristian, P.; Danihel, I.; Podhradsk, D.; Imrich, J. Determination of the binding affinities of plasmid DNA using fluorescent intercalators possessing an acridine skeleton. *Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, *38*, 94–98.
44. Benner, K.; Ihmels, H.; Kölsch, S.; Pithan, P.M. Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolizinium derivatives: the influence of size, shape and substituents. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1725–1734.
45. 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. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1790–1801.
46. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006.
47. 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(10*H*)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7507–7514.
48. Cui, F.; Liu, Q.; Luo, H.; Zhang, G. Spectroscopic, viscositic and molecular modeling studies on the interaction of 3'-azido-daunorubicin thiosemicarbazone with DNA. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 189–195.
49. Monks, A.D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Nat. Cancer. Inst.* **1991**, *83*, 757–766.
50. Stefanska, B.; Bontemps-Gracz, M.M.; Antonini, I.; Martelli, S.; Arciemiuik, M.; Piwkowska, A.; Rogacka, D.; Borowski, E. 2,7-Dihydro-3*H*-pyridazino[5,4,3-*kl*]acridin-3-one derivatives, novel type of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines. Synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1969–1975.

51. Liesen, A.P.; Aquino, T.M.; Carvalho, C.S.; Lima, V.T.; Araújo, J.M.; Lima, J.G.; Faria, A.R.; Melo, E.J.T.; Alves, A.J.; Alves, E.W.; *et al.* Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3685–3691.
52. Wolfe, A.; Shimer, G.H.; Meehan, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6392–6396.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).