

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



**AMÉLIA GALDINO RIBEIRO**

**DESIGN E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS 4-  
QUINOLINA-TIOSSEMICARBAZONAS POTENCIAIS AGENTES ANTICÂNCER**

**RECIFE – 2018**

**AMÉLIA GALDINO RIBEIRO**

**DESIGN E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS 4-  
QUINOLINA-TIOSSEMICARBAZONAS POTENCIAIS AGENTES ANTICÂNCER**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora:**

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

**Co-orientadora:**

**Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida**

**Recife – 2018**

R484d Ribeiro, Amélia Galdino.  
Design e elucidação estrutural de novos derivados 4-quinolina-  
tiossemicarbazonas potenciais agentes anticâncer / Amélia Galdino Ribeiro. –  
2018.  
155 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. DNA. 2. Albumina. 3. Espectroscopia. 4. Absorção. 5. Fluorescência. I.  
Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-200)

AMÉLIA GALDINO RIBEIRO

**DESIGN E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE NOVOS DERIVADOS 4-  
QUINOLINA-TIOSSEMICARBAZONAS POTENCIAIS AGENTES ANTICÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 11/05/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Interno)  
Universidade Estadual da Paraíba

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Oliveira dos Santos Gomes (Examinadora externa)  
Faculdade Integrada de Pernambuco

Recife - 2018

*Aos meus pais Jonas e Socorro, dedicar esta dissertação a vocês não é suficiente.*

*A minha irmã Beatriz por todo o estímulo e grande ajuda.*

*A Luis pelo apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela vida e oportunidades concedidas. Ele que está sempre comigo, iluminando meus passos e guiando meus caminhos. Sem Ele não teria conseguido!

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Carmo, por sua valiosa orientação, seus ensinamentos científicos e por acreditar que eu merecia a oportunidade de viver esta experiência acadêmica.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Sinara Mônica, pela ajuda e conhecimento compartilhado.

À Jamerson Ferreira, por toda a colaboração e contribuição científica durante o tempo de pesquisa.

Ao professor Túlio Couto da UFRPE – Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST) pela colaboração nos ensaios de modelagem molecular.

Aos meus pais Jonas e Socorro, que me educaram, me deram amor, carinho, limites, possibilidades e sabedoria, para que eu pudesse trilhar meu caminho sozinha, reconhecendo princípios, valores e agisse de forma honesta e digna. Obrigada por tudo!

À minha irmã Beatriz, por nunca ter medido esforços para me ajudar e alcançar os meus sonhos, contribuindo essencialmente na construção deste trabalho. Sem palavras para descrever o quanto te amo, o quanto me sinto melhor quando está por perto e o quanto me orgulho de você!

A todos os meus familiares, em especial à minha tia Jonaide, que sempre me incentivou, e comemorou comigo mais esta etapa de minha vida.

Ao meu amor Luís, pela compreensão nos momentos de ausência, companheirismo e amizade nos períodos difíceis dessa caminhada, além do incentivo de todos os dias, sem os quais não teria realizado este trabalho.

Ao meu querido cunhado Prudenciano, que me acompanhou nesta jornada e sempre torceu por mim, alegrando-se com as minhas conquistas.

À nossa equipe, “Tops da interação”, Denise e Emanuel, os quais participaram diretamente na execução de minha pesquisa, por todo o apoio e momentos de descontração que tivemos.

Às minhas amigas da UFPE para a vida, Alessandra e Gabriela, por todo o apoio, amizade única e momentos inesquecíveis que juntas compartilhamos. Sei que sempre posso contar com vocês!

A todos os amigos do laboratório de Química e Inovação terapêutica, entre eles: Tiago, Pedro, Íris, Keriolaine, Suellen, Paula, Allana, Cézar, Luiz, Miguel, Rubinho, Charles, Natanael, Cleberson, Hanna, Mirelly, Ariany, Cristiane e Rafaela por participarem no meu dia a dia de trabalho e pelos momentos de aprendizagem e brincadeiras durante tanto tempo de convívio.

À Aurenice, do grupo IMOBIO, pelas conversas, risadas e companhia ao longo deste percurso acadêmico e àquelas que formam o grupo de pesquisa *BmC*: Amanda, Aline e Cida, por todo o auxílio e boa vontade prestados a mim.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF – UFPE, do Laboratório de Combustíveis – LAC/UFPE e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE pela realização de algumas análises essenciais para o meu trabalho.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo apoio financeiro, viabilizando este trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram e estiveram na torcida por mais uma conquista minha.

## RESUMO

O câncer é uma neoplasia maligna caracterizada pela perda do controle do crescimento e a capacidade de invadir diferentes tecidos e órgãos. Apresenta altas incidências com suprimas taxas de mortalidade, e o seu tratamento quimioterápico vem causando diversas complicações no organismo, levando-se à busca de novos fármacos. O DNA, é bastante estudado no planejamento de novos compostos antitumorais pois interações com esta biomolécula, através de intercalações, ligações nos sulcos e atrações eletrostáticas são importantes para a morte celular tumoral. Proteínas plasmáticas, como a albumina (BSA), são também utilizadas nestes estudos para verificar as propriedades farmacocinéticas dos fármacos. Nestes estudos, moléculas contendo porções quinolina e tiossemicarbazonas são consideradas promissoras por possuírem atividade antitumoral já descrita. Neste sentido, elas foram escolhidas para serem estudadas neste trabalho, que teve como objetivo sintetizar doze novos derivados da série 2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamidas e avaliar seu potencial antitumoral através da investigação da capacidade de interação com o ctDNA e a BSA. Todos os compostos foram sintetizados com êxito utilizando tiossemicarbazidas substituídas e o aldeído 4quinolina-carboxaldeído, em temperatura ambiente, e suas estruturas químicas elucidadas satisfatoriamente por meio das técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , técnicas bidimensionais de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e DEPT, infravermelho (IV) e espectrometria de massas (MS), apresentando rendimentos entre 65,70 e 91,02% e sinais diagnósticos de formação das tiossemicarbazonas (LqIT/JF-88 =  $\delta$  9,02 ppm: H-C=N;  $\delta$  10,38 e  $\delta$  12,14 ppm: NH). A atividade de ligação ao ctDNA e à BSA dos derivados foi estudada através das técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e dicróismo circular (DC), em diferentes concentrações, verificando-se que todos os compostos possuem afinidade de interação com estas biomoléculas. O derivado que teve destaque nesses estudos foi o JF-92, apresentando os maiores valores de  $K_b$  e  $K_{sv}$  tanto para o ctDNA quanto para a BSA, além de promover alterações da elipticidade e no empilhamento de bases do DNA, verificados no DC. Estudos de docking molecular também comprovaram a capacidade de ligação dos derivados, verificando-se que o JF-92 se liga ao DNA por intercalação e ligação nos sulcos e interage com a BSA entre os subdomínios IIA e IIIA. Estes dados possibilitam inferir que padrões de substituições são importantes para a melhor eficácia de ligação e que estudos adicionais devem ser realizados para prever os mecanismos de interação entre os outros compostos e o ctDNA e BSA.

**Palavras-chave:** DNA. Albumina. Espectroscopia. Absorção. Fluorescência.

## ABSTRACT

Cancer is a malignant neoplasm characterized by loss of growth control and the ability to invade different tissues and organs. It presents high incidence with supreme mortality rates, and its chemotherapy treatment has caused several complications in the body, leading to the search for new drugs. DNA is well studied in the design of new antitumor compounds because interactions with this biomolecule through intercalations, linkages in the sulci and electrostatic attractions are important for tumor cell death. Plasma proteins, such as albumin (BSA), are also used in these studies to check the pharmacokinetic properties of the drugs. In these studies, molecules containing quinoline and thiosemicarbazone moieties are considered promising because they have antitumor activity already described. In this sense, they were chosen to be studied in this work, whose objective was to synthesize twelve new derivatives of the series 2-(quinolin-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamides and to evaluate their antitumor potential by investigating the interaction capacity with ctDNA and BSA. All compounds were successfully synthesized using substituted thiosemicarbazides and 4quinoline-carboxaldehyde aldehyde at room temperature and their chemical structures satisfactorily elucidated by  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR techniques, two-dimensional techniques of COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and DEPT, infrared (IV) and mass spectrometry (MS), yielding between 65.70 and 91.02% and diagnostic signals of thiosemicarbazones (LqIT/JF-88 =  $\delta$  9.02 ppm: HC = N;  $\delta$  10.38 and  $\delta$  12.14 ppm: NH). The binding activity to ctDNA and BSA of the derivatives was studied by spectroscopic techniques of absorption, fluorescence and circular dichroism (DC) in different concentrations, all compounds having an affinity for interacting with these biomolecules. The JF-92 derivative, with the highest  $K_b$  and  $K_{sv}$  values for both ctDNA and BSA, also promoted changes in ellipticity and stacking of DNA bases, verified in DC. Molecular docking studies have also demonstrated the ability of the derivatives to bind, with JF-92 being bound to DNA by intercalation and ligation in the grooves and interacting with the BSA between sub-domains IIA and IIIA. These data make it possible to infer that substitution patterns are important for better binding efficacy and that further studies should be performed to predict the interaction mechanisms between the other compounds and ctDNA and BSA.

**Keywords:** DNA. Albumin. Spectroscopy. Absorption. Fluorescence.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Principais alterações celulares que permitem o desenvolvimento de células tumorais. ....                                                                                                 | 20 |
| <b>Figura 2</b> – Estruturas químicas dos derivados utilizados na terapia anticâncer. (1) Doxorubicina; (2) Amsacrina; (3) 5-Fluorouracil; (4) Mitoxantrona. ....                                          | 22 |
| <b>Figura 3</b> – Representação dos modos de interação entre ligantes e a molécula de DNA.....                                                                                                             | 23 |
| <b>Figura 4</b> – Espectro de absorção e DC do ctDNA na concentração de 100 µM. ....                                                                                                                       | 25 |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura da albumina do soro bovino com seus respectivos subdomínios e resíduos de triptofano.....                                                                                      | 27 |
| <b>Figura 6</b> – Espectro de emissão da BSA apresentando diminuição da intensidade de fluorescência na presença de um extintor.....                                                                       | 28 |
| <b>Figura 7</b> – Estratégia de simplificação molecular utilizando o núcleo acridina para obtenção do núcleo quinolina. ....                                                                               | 29 |
| <b>Figura 8</b> – Estrutura do anel quinolínico. ....                                                                                                                                                      | 30 |
| <b>Figura 9</b> – Representação da síntese de Skraup para obtenção do núcleo quinolínico. ....                                                                                                             | 30 |
| <b>Figura 10</b> – Derivados quinolínicos com melhor atividade citotóxica nas linhagens de células de câncer de mama MCF-7 (a) e T47d (b). ....                                                            | 32 |
| <b>Figura 11</b> – Derivados cinamamidas quinolínicos (a), aril dihidrodioxinos quinolínicos (b) e benzoquinolínicos (c) com potenciais atividades citotóxicas frente a linhagens celulares tumorais. .... | 32 |
| <b>Figura 12</b> – Estrutura genérica das tiossemicarbazonas. R1, R2, R3, R4 = H, grupos arila ou grupos alquila. ....                                                                                     | 33 |
| <b>Figura 13</b> – Derivado tiofeno-tiossemicarbazona com melhor atividade antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . ....                                                                             | 34 |
| <b>Figura 14</b> – Derivado tiossemicarbazona com atividade antiproliferativa, ligante ao DNA e inibidor da enzima topoisomerase IIα. ....                                                                 | 35 |
| <b>Figura 15</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto LqIT/J-88 com evidência de seus sinais diagnósticos. ....                                                                                    | 48 |
| <b>Figura 16</b> – Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup> H do composto LqIT/JF-88.....                                                                                                                     | 48 |
| <b>Figura 17</b> – Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto LqIT/JF-88 com atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel quinolina e fenil. ....                                 | 49 |
| <b>Figura 18</b> – Espectro de COSY mostrando as correlações entre os hidrogênios do derivado LqIT-JF-88. ....                                                                                             | 50 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do derivado LqIT/JF-88. ....                                                       | 51 |
| <b>Figura 20</b> – Espectro de DEPT do derivado LqIT/JF-88. ....                                                                      | 51 |
| <b>Figura 21</b> – Espectro de HSQC do composto LqIT/JF-88 evidenciando as correlações entre carbono-hidrogênio $^1\text{J}$ . ....   | 52 |
| <b>Figura 22</b> – Espectro de infravermelho (IV) do derivado LqIT/JF-88. ....                                                        | 53 |
| <b>Figura 23</b> – Espectro de massas do composto LqIT/JF-88 com seu respectivo pico do íon molecular. ....                           | 54 |
| <b>Figura 24</b> – Espectros de absorção do LqIT/JF-94 e LqIT/JF-92 na presença de quantidades crescentes do ctDNA. ....              | 64 |
| <b>Figura 25</b> – Espectros de absorção dos derivados LqIT/JF-93 e LqIT/JF-96, na presença de quantidades crescentes do ctDNA. ....  | 65 |
| <b>Figura 26</b> – Diagrama de Craig com intercorrelações eletrônicas e lipofílicas em <i>para</i> -substituição aromática. ....      | 66 |
| <b>Figura 27</b> – Espectros de fluorescência dos derivados LqIT/JF-87 e 94. ....                                                     | 68 |
| <b>Figura 28</b> – Espectro de DC do ctDNA na ausência e presença dos derivados LqIT/JFs. ....                                        | 70 |
| <b>Figura 29</b> – Espectro de absorção da albumina do soro bovino na presença de quantidades crescentes do composto LqIT/JF-92. .... | 72 |
| <b>Figura 30</b> – Espectro de emissão da albumina do soro bovino na presença de quantidades crescentes do composto LqIT/JF-92. ....  | 73 |
| <b>Figura 31</b> – Estrutura do derivado LqIT/JF-92 com os respectivos modos de interação com o DNA e a topoisomerase. ....           | 80 |
| <b>Figura 32</b> – Estrutura do LqIT/JF-92-DNA + Topo com os respectivos tipos de interações. ....                                    | 81 |
| <b>Figura 33</b> – Representação do complexo de ligação entre LqIT/JF-92 e DNA + Topoisomerase. ....                                  | 82 |
| <b>Figura 34</b> – Estruturas do derivado LqIT/JF-92 em diferentes regiões da albumina com suas respectivas interações. ....          | 84 |
| <b>Figura 35</b> – Estrutura da BSA em complexo com o ligante LqIT/JF-92 (em azul) ( $\text{Trp}^{213}$ indicado em amarelo). ....    | 85 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Dados espectroscópicos de absorção UV-vis dos derivados LqIT/JFs na presença e ausência do ctDNA.....              | 63 |
| <b>Tabela 2</b> – Dados espectroscópicos de emissão dos derivados LqIT/JFs na presença e ausência do ctDNA.....                      | 69 |
| <b>Tabela 3</b> – Dados de absorção e emissão da albumina do soro bovino na presença dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas..... | 75 |
| <b>Tabela 4</b> – Dados farmacocinéticos <i>in silico</i> calculados na plataforma SwissADME ou pkCSM. ....                          | 77 |
| <b>Tabela 5</b> – Série de ligantes LqIT/JFs para o complexo DNA-topoisomerase II $\alpha$ por docking molecular. ....               | 79 |
| <b>Tabela 6</b> – Série de ligantes para a BSA por docking molecular. ....                                                           | 83 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1</b> – Esquema reacional para obtenção das tiosemicarbazidas substituídas (a-m).....               | 37 |
| <b>Esquema 2</b> – Esquema reacional para obtenção dos derivados quinolina-tiosemicarbazonas substituídos..... | 38 |
| <b>Esquema 3</b> – Mecanismo reacional das tiosemicarbazidas substituídas.....                                 | 45 |
| <b>Esquema 4</b> – Mecanismo reacional dos derivados quinolina-tiosemicarbazonas substituídos.....             | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- CCD** – Cromatografia de camada delgada
- COSY** – Espectroscopia Correlacionada (do inglês *homonuclear COrrrelation SpectroscopY*)
- COX-2** – Cicloxigenase 2
- ctDNA** – DNA de timo bovino (do inglês *calf thymus DNA*)
- DC** – Dicroísmo Circular
- DEPT** – Intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DMSO-*d*6** – Dimetilsulfóxido deuterado
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)
- HSA** – Albumina do soro humano (do inglês *Human Serum Albumin*)
- HSQC** – Correlação Quântica Única Heteronuclear (do inglês *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*)
- IC<sub>50</sub>** – Inibição em 50% das células
- IV** – Infravermelho
- LqIT** – Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
- MCF-7** – Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
- MS** – Espectrometria de massas
- R<sub>f</sub>** – Fator de retenção
- RMN <sup>13</sup>C** – Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
- RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
- T47D** – Linhagem celular de carcinoma mamário
- Tris** - Tetrametilhidroxiaminometano
- Trp** – Aminoácido triptofano
- UV-Vis** – Ultravioleta-Visível
- δ ppm** – Deslocamento químico em parte por milhão

## SUMÁRIO

|              |                                                                            |           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                    | <b>17</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                     | <b>19</b> |
| 2.1          | GERAL.....                                                                 | 19        |
| 2.2          | ESPECÍFICOS .....                                                          | 19        |
| <b>3</b>     | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                                          | <b>20</b> |
| 3.1          | CÂNCER.....                                                                | 20        |
| <b>3.1.1</b> | <b>DNA como alvo terapêutico .....</b>                                     | <b>22</b> |
| 3.1.1.1      | <i>Interação ligantes-DNA .....</i>                                        | <i>24</i> |
| 3.2          | ALBUMINA .....                                                             | 26        |
| 3.2          | QUÍMICA MEDICINAL .....                                                    | 29        |
| <b>3.1.2</b> | <b>Núcleo Quinolínico .....</b>                                            | <b>30</b> |
| <b>3.1.3</b> | <b>Derivados Tiossemicarbazonas .....</b>                                  | <b>33</b> |
| <b>4</b>     | <b>METODOLOGIA .....</b>                                                   | <b>36</b> |
| 4.1          | METODOLOGIA QUÍMICA .....                                                  | 36        |
| <b>4.1.1</b> | <b>Materiais e equipamentos .....</b>                                      | <b>36</b> |
| <b>4.1.2</b> | <b>Procedimentos experimentais.....</b>                                    | <b>36</b> |
| 4.1.2.1      | <i>Síntese das tiossemicarbazidas .....</i>                                | <i>36</i> |
| 4.1.2.2      | <i>Obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs).....</i> | <i>37</i> |
| 4.2          | ENSAIO DE INTERAÇÃO .....                                                  | 40        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Estudo da interação dos derivados LqIT/JFs e albumina/DNA .....</b>     | <b>40</b> |
| 4.2.1.1      | <i>Materiais e equipamentos .....</i>                                      | <i>40</i> |
| 4.2.1.2      | <i>Preparação das soluções de ctDNA e albumina .....</i>                   | <i>40</i> |
| 4.2.1.3      | <i>Espectroscopia de absorção eletrônica .....</i>                         | <i>40</i> |
| 4.2.1.4      | <i>Espectroscopia de emissão de fluorescência .....</i>                    | <i>41</i> |
| 4.2.1.5      | <i>Espectroscopia de dicroísmo circular .....</i>                          | <i>42</i> |
| 4.3          | ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR.....                                        | 42        |

|         |                                                                                                              |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1   | <b>Análise das propriedades ADME <i>in silico</i> e docking molecular</b>                                    | 42 |
| 4.3.2   | <b>Preparação da estrutura dos ligantes</b>                                                                  | 42 |
| 4.3.3   | <b>Preparação das estruturas das topoisomerase e albumina do soro bovino (BSA)</b>                           | 43 |
| 4.3.4   | <b>Docking</b>                                                                                               | 43 |
| 4.3.4.1 | <i>Topoisomerase II<math>\alpha</math> na presença dos ligantes</i>                                          | 43 |
| 4.3.4.2 | <i>BSA na presença dos ligantes</i>                                                                          | 43 |
| 5       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                | 45 |
| 5.1     | <b>PARTE QUÍMICA</b>                                                                                         | 45 |
| 5.1.1   | <b>Mecanismo reacional da síntese dos derivados tiossemicarbazidas</b>                                       | 45 |
| 5.1.2   | <b>Mecanismo reacional da síntese dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs)</b>                  | 45 |
| 5.1.3   | <b>Análises espectroscópicas dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs)</b>                       | 47 |
| 5.1.4   | <b>Dados espectroscópicos, espectrométricos e físico químicos dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas</b> | 54 |
| 5.2     | <b>ENSAIO DE INTERAÇÃO</b>                                                                                   | 62 |
| 5.2.1   | <b>Estudos de ligação com o ctDNA</b>                                                                        | 62 |
| 5.2.1.1 | <i>Espectroscopia de absorção eletrônica</i>                                                                 | 62 |
| 5.2.1.2 | <i>Espectroscopia de fluorescência</i>                                                                       | 67 |
| 5.2.1.3 | <i>Espectroscopia de dicroísmo circular</i>                                                                  | 70 |
| 5.2.2   | <b>Estudo de ligação com a albumina do soro bovino</b>                                                       | 71 |
| 5.2.2.1 | <i>Espectroscopia de absorção eletrônica</i>                                                                 | 71 |
| 5.2.2.2 | <i>Espectroscopia de fluorescência</i>                                                                       | 72 |
| 5.3     | <b>ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR</b>                                                                        | 76 |
| 5.3.1   | <b>Propriedades ADME dos ligantes</b>                                                                        | 76 |
| 5.3.2   | <b>Docking da enzima topoisomerase II<math>\alpha</math> com os derivados LqIT/JFs</b>                       | 78 |
| 5.3.3   | <b>Docking da proteína albumina com os derivados LqIT/JFs</b>                                                | 82 |

|          |                                                                                                                                                             |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                            | <b>86</b> |
| 6.1      | PERSPECTIVAS .....                                                                                                                                          | 87        |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                    | <b>88</b> |
|          | APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN $^1\text{H}$ E RMN $^{13}\text{C}$ , COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , INFRAVERMELHO<br>E MASSAS DOS DERIVADOS LqIT/JFs..... | 100       |
|          | APÊNDICE B – ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DOS DERIVADOS LqIT/JFs<br>COM ctDNA E ALBUMINA DO SORO BOVINO .....                                            | 128       |
|          | APÊNDICE C – ARTIGO.....                                                                                                                                    | 136       |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é umas das doenças que mais afetam a população mundial devido, principalmente, à sua alta incidência e mortalidade. É basicamente caracterizado por alterações fenotípicas que conferem potenciais proliferativos que, em estágios bastante avançados, também adquirem a capacidade de invasão e metástase. Estas diversas alterações são primordiais para o crescimento do câncer (BIST et al. 2017; FIETELSON et al. 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Dentre as diversas formas de tratamento (radioterapia, imunoterapia e quimioterapia), a quimioterapia é a modalidade terapêutica mais frequentemente usada para o tratamento do câncer. Os principais medicamentos utilizados agem basicamente contra a replicação do DNA, interferindo na maquinaria celular ou impedindo o crescimento do câncer com a inibição de repectores e quinases (DOBBELSTEIN, MOLL, 2014). Entretanto, a célula cancerígena modifica o microambiente, constituído por células, vasos sanguíneos, tecidos e outros elementos estromáticos chamado, então, de microambiente tumoral, o qual oferece um ambiente mais propício para seu estabelecimento e progressão. Este fenômeno provoca problemas para o tratamento quimioterápico utilizado nos pacientes portadores desta doença, causando resistência, toxicidade e aparecimento de outros efeitos indesejáveis, como baixa imunidade, náuseas, vômitos, perda de cabelos, fadiga, entre outros (AKHTAR et al. 2016; CAMPOS, 2010; KLEM; JOYCE, 2014; NICOLUSSI et al. 2016; ROESE; FONTANA; PEREIRA, et al. 2018).

O DNA, como sendo um dos principais alvos terapêuticos de fármacos antitumorais, é bastante estudado por participar ativamente do processo de replicação das células cancerígenas. Fármacos que possuem a capacidade de se ligar ao DNA são utilizados de longa data para a atividade anticâncer, pois conseguem interferir em todo o funcionamento do ciclo celular, resultando na inibição do crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011; RESCIFINA et al. 2014; ZHU et al. 2014). As moléculas orgânicas interagem com o DNA através de diferentes formas, tais como ligação nos sulcos, intercalação entre os pares de bases e atração eletrostática. Estes modos de interação podem mudar de acordo com as propriedades físico químicas dos fármacos, mas, independente do tipo de ligação, esta interação é de grande relevância para o planejamento de novos compostos com direcionamento a esta biomolécula (BI et al. 2008; GIRI et al., 2017; NARVA et al. 2016). Estes podem ser avaliados por meio de

técnicas espectroscópicas, verificando alterações nos espectros de absorção, fluorescência e dicroísmo circular (DC) (ALAM et al. 2018; ALMEIDA et al. 2015; LAFAYETTE et al. 2017)

Para o melhor entendimento do potencial farmacológico dos fármacos, o estudo de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas também deve ser explorado. Uma das maneiras de investigar estas propriedades é através do estudo de sua capacidade de ligação com a proteína albumina do soro bovino (BSA), que mimetiza a albumina do soro humano (HSA) (RAHMAN et al. 2017). Esta proteína está presente em abundância no sistema biológico, sendo capaz de se ligar a diferentes substâncias, com a função de transportá-las neste sistema. Devido a isto, a compreensão da interação entre compostos e a BSA é de primordial importância para elucidar os mecanismos de ação dos fármacos com propriedades terapêuticas e obter informações a cerca do carreamento destas moléculas no plasma (ISHTIKHAR; RABBANI; KHAN, 2014). Neste contexto, moléculas que possuem a habilidade de se ligar ao DNA bem como interagir com a BSA são alvos de grande interesse para a proposição de novos fármacos. Podemos destacar os derivados contendo o núcleo quinolina e a porção tiossemicarbazona em sua estrutura. Ambos possuem importantes propriedades farmacológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiparasitária e, inclusive, antitumoral (BLAU, 2013; PINHEIRO et al. 2010; MARELLA et al. 2013; OLIVEIRA et al. 2015; PINZ et al. 2017). A capacidade de interagir com a BSA também é discutida, onde são analisadas através de técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência, observando-se possíveis alterações nos seus perfis espectrais após o contato BSA-ligante (THIRUNAVUKKARASU et al. 2017; YU et al. 2013).

Estudos prévios realizados com os derivados tiossemicarbazonas destacam o seu potencial anticâncer, sendo capaz de inibir o crescimento de diferentes linhagens celulares tumorais, interagindo com a dupla hélice do DNA e a enzima topoisomerase, funcionalidades estas importantes para a interrupção do ciclo celular (OLIVEIRA et al. 2015; OLIVEIRA et al. 2017). Derivados acridínicos, análogos aos derivados quinolinas, também possuem relevância quanto à capacidade de se ligar ao DNA e à enzima topoisomerase, demonstrando que a presença de anéis aromáticos facilita a sua interação com estas biomoléculas (ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA et al. 2016).

Diante disto, este trabalho teve como objetivo sintetizar doze novos derivados quinolina-tiossemicarbazonas com o intuito de avaliar a capacidade destes de interagir com a molécula de DNA e a proteína albumina através de técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e dicroísmo circular, a fim de verificar o potencial terapêutico dos fármacos produzidos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer através da síntese dos derivados 4-quinolina-tiossemicarbazonas substituídos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar e determinar as características físico-químicas de 12 novos derivados 4-quinolina-tiossemicarbazonas substituídos;
- Elucidar as estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), DEPT, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no infravermelho (IV) e espectrometria de massas (MS);
- Analisar a interação dos derivados com o DNA e albumina, através de técnicas espectroscópicas de absorção UV-visível, fluorescência e dicroísmo circular;
- Realizar estudos *in silico* das propriedades farmacocinéticas dos derivados;
- Simular computacionalmente, através de estudos de docking molecular, a interação BSA-ligante e DNA/topoisomerase-ligante.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

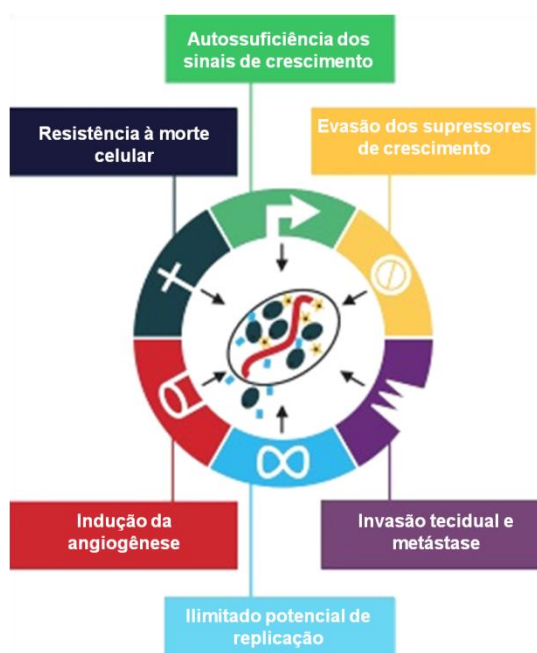
#### 3.1 CÂNCER

A palavra “câncer” é um termo utilizado para definir um conjunto de doenças que possuem a capacidade de se desenvolver desordenadamente, podendo, muitas vezes, invadir diferentes tecidos e órgãos e espalhar-se para outras regiões do corpo, um processo habitualmente chamado de metástase. É considerada uma das principais causas de mortes em todo o mundo. Foram relatados mais de 200 mil óbitos/100.000 habitantes de ambos os sexos em 2015, no Brasil, e estima-se, ainda, que aproximadamente 600 mil novos casos de câncer sejam descritos para o ano de 2018 (BRASIL, 2018; INCA, 2017).

A intensa proliferação das células cancerígenas pode determinar a formação de tumores, visto que esta proliferação é um fator importante para o desenvolvimento e progressão do câncer. Este processo sobrevém através da alteração da expressão e/ou atividade alterada de proteínas, a partir de numerosas mutações genéticas e/ou epigenéticas, relacionadas ao ciclo celular (BIST et al. 2017; FIETELSON et al. 2015).

Algumas outras características, adquiridas por estas células, são descritas por Hanahan e Weinberg (2011) (Figura 1) e consideradas primordiais para o desenvolvimento da célula tumoral e sua complexidade. Incluem: 1- sustentada sinalização proliferativa, 2- resistência à morte celular, 3- evasão dos supressores de crescimento, 4- replicação imortal, 5- indução da angiogênese e 6- ativação da invasão e metástase.

**Figura 1** – Principais alterações celulares que permitem o desenvolvimento de células tumorais.



Pode-se dizer que os tumores têm em comum a proliferação celular de forma rápida e anormal, com perda da diferenciação celular, mesmo com toda a diversidade e heterogeneidade existente entre eles (BIST et al. 2017). São tecidos complexos compostos por diferentes tipos celulares que interagem entre si, incluindo as células normais que, quando recrutadas, participam ativamente na tumorigênese. Como consequência, ocorre a redefinição do estroma, composto por elementos estromáticos (fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e linfáticos) que, constituindo grande parte da massa tumoral, contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer. Forma-se, assim, todo o microambiente necessário para o crescimento e estabelecimento das células cancerosas, provocando efeitos profundos na eficácia terapêutica (HANAHA; WEINBERG, 2011; CAMPOS, 2010; KLEM; JOYCE, 2014).

Desta forma, com o maior conhecimento sobre a biologia dos tumores, se faz necessário que seu estudo aborde como o microambiente tumoral contribui para a tumorigênese (HANAHA; WEINBERG, 2011; PIETRAS; ÖSTMAN, 2010). Durante este processo, a célula incorpora características que permitem sua proliferação anormal, ativando muitas vias de transdução de sinal, resultando também na seleção de células com mutação (es) que fornecem sobrevivência e vantagens proliferativas (FEITELSON et al. 2015).

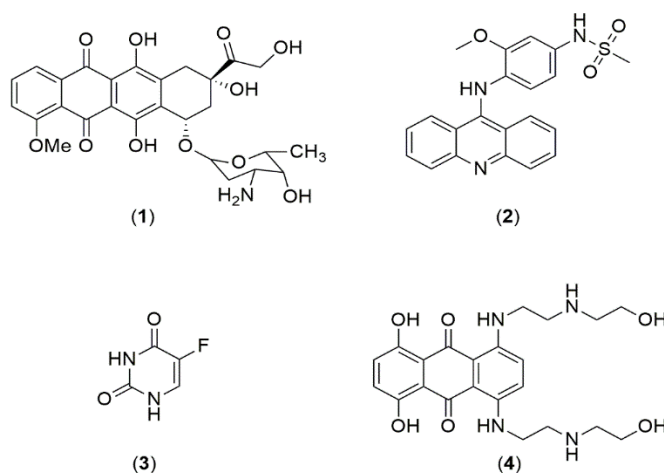
Neste cenário, a utilização de terapias que consigam retardar ou, até mesmo, eliminar o tumor é a alternativa empregada durante várias décadas. Os principais tipos de tratamentos que são utilizados na clínica são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia, além da imunoterapia e, em alguns casos, transplantes de medula óssea. Dentre os quimioterápicos antineoplásicos existe uma classificação, sendo divididos em: agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais e inibidores mitóticos. Os agentes alquilantes polifuncionais são os mais antigos e mais usados, exercendo sua atividade basicamente através da interação com o DNA. Os antimetabólitos atuam inibindo a biossíntese de moléculas essenciais para o processo de divisão celular. Outra classe, denominada antibióticos antitumorais, não agem em ciclos celulares específicos, mas possui atividade inibitória da síntese de proteínas e DNA. Já os inibidores mitóticos exercem sua função na proteína tubulina (proteína formadora dos microtúbulos e do fuso mitótico), impedindo a migração dos cromossomos durante a metáfase (ALMEIDA et al. 2005; INCA 2018).

Sabe-se que o uso de fármacos isolados (monoterapia) é comprovadamente ineficaz para o tratamento do câncer, sendo necessário a utilização destes associados a outros tipos de tratamentos, visando uma maior eficácia e erradicação do tumor. Porém, os efeitos indesejáveis causados pela grande maioria dos quimioterápicos, por atuarem de forma não específica, traz a necessidade de mais estudos a respeito dos mecanismos de ação e desenvolvimento de

moléculas mais seletivas e direcionadas para alvos específicos, como por exemplo, a molécula de DNA (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; KUMAR et al. 2017).

Alguns compostos utilizados na clínica para a terapia do câncer, como a Doxorrubicina, Amsacrina, 5-Fluorouracil e Mitoxantrona (Figura 2), foram avaliados quanto à sua capacidade de ligação ao DNA, sendo suas atividades anticancerígenas provenientes de suas propriedades de interação com esta biomolécula (LEI; WANG; WU, 2012; JANGIR et al. 2012; JANGIR et al. 2011; SHAHABADI; HEIDARI, 2012). Sabendo-se disso, o estudo de novos fármacos através da análise de sua capacidade de interação com o DNA é bastante promissor, podendo ser bastante explorado como uma via de inibição de células tumorais.

**Figura 2** – Estruturas químicas dos derivados utilizados na terapia anticâncer. (1) Doxorrubicina; (2) Amsacrina; (3) 5-Fluorouracil; (4) Mitoxantrona.



Diversos efeitos indesejáveis também têm sido detectados com o uso destes fármacos para a terapia anticâncer. Dentre eles, podemos citar a fadiga, perda de apetite, baixa imunidade para outras doenças, perda de cabelos, entre outros (NICOLUSSI et al. 2016; ROESE; FONTANA; PEREIRA, et al. 2018). Outro fator bastante preocupante é a resistência das células ao tratamento, não só pela ineficácia terapêutica, mas também pela recidiva do tumor em outros locais do corpo, sendo distantes ou não. Estas recorrências geralmente se desenvolvem justamente a partir de células tumorais que sobreviveram ao tratamento antineoplásico prévio (ABDELMOEZ et al. 2017). Por isso, buscar novos compostos que promovam menor resistência e melhor eficácia, considerando o DNA como um dos alvos terapêuticos a serem estudados, é de primordial importância para o desenvolvimento de novos fármacos.

### 3.1.1 DNA como alvo terapêutico

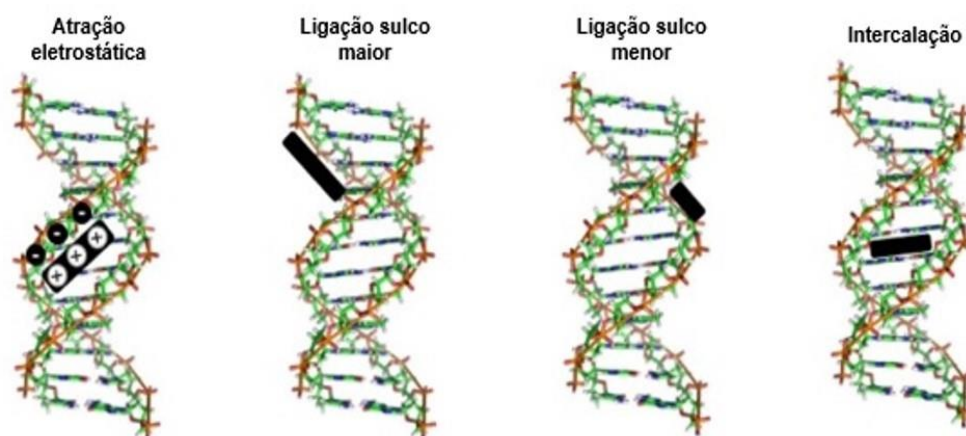
A molécula de DNA é uma dupla hélice que compreende duas cadeias antiparalelas complementares contendo fosfato de açúcar e bases nitrogenadas, ligadas entre si por ligações de hidrogênio, as quais estabilizam sua estrutura. O enrolamento das cadeias forma sulcos maiores e menores que proporcionam suporte para o reconhecimento de proteínas e uma região que favorece a ligação de pequenas moléculas (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

O mecanismo de reparo e dano do DNA é uma das principais formas de eliminar lesões que causam diversos tipos de mutações, mantendo assim, a estabilidade e integridade do genoma. Defeitos e/ou mudanças nestes mecanismos podem ocasionar o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer (MAJIDINIA et al. 2017).

Moléculas que se ligam ao DNA podem modificar suas funções fisiológicas, inibindo sua replicação, transcrição ou expressão da informação genética nas células-alvo e, conseqüentemente, seu crescimento celular (RESCIFINA et al. 2014; ZHU et al. 2014).

A alquilação e a intercalação ao DNA são as principais formas de interação com a biomolécula e muitos compostos também atuam interagindo com o DNA através de ligações nos sulcos e atrações eletrostáticas (Figura 3). Intercalantes e ligantes no sulco são mais comuns para moléculas pequenas que se ligam direta e seletivamente à dupla cadeia de DNA (GIRI et al., 2017; NARVA et al. 2016; OZLUER; KARA, 2014; PALANIMUTHU; SAMUELSON, 2013; RESCIFINA et al. 2014).

**Figura 3** – Representação dos modos de interação entre ligantes e a molécula de DNA.



Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2017, p. 1540).

Na intercalação, anéis aromáticos dos ligantes inserem-se entre os pares de bases do DNA, aumentando a distância entre as bases nitrogenadas, sendo um modo de ligação não covalente. A ligação no sulco também é um tipo de ligação não covalente, onde regiões dos fármacos interagem com os sulcos maiores e menores da molécula de DNA. Já as que se ligam

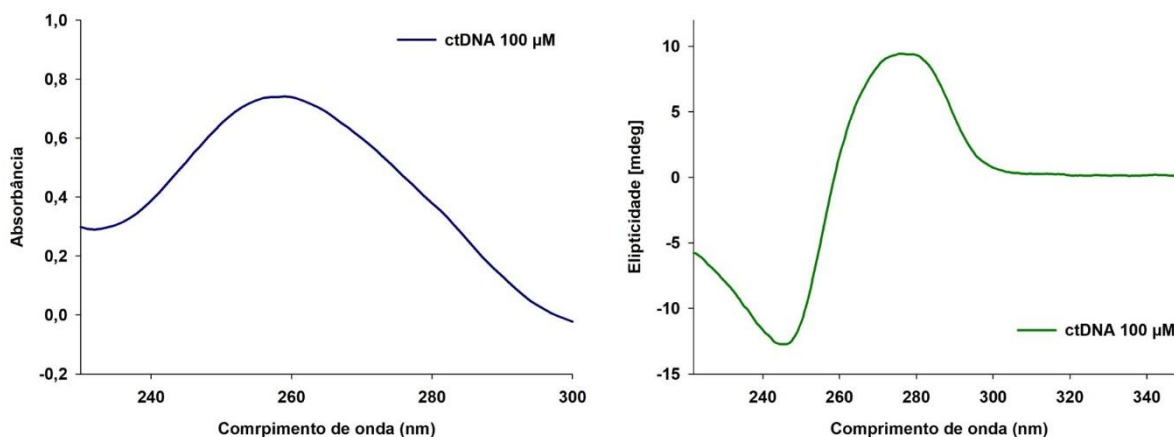
eletrostaticamente, ao longo da face exterior da dupla hélice, possuem espécies catiônicas que interagem com a porção fosfato do DNA carregada negativamente. Muitas moléculas podem exibir mais de um modo de interação, dependendo das propriedades estruturais dos fármacos (ALMEIDA et al. 2017; KABIR; HOSSAIN; KUMAR, 2013; OZLUER; KARA, 2014).

#### *3.1.1.1 Interação ligantes-DNA*

O estudo dos tipos de interações de fármacos com a molécula de DNA pode ser auxiliado por meio de técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e dicroísmo circular (DC). As espectroscopias de absorção e fluorescência são técnicas analíticas muito utilizadas nos estudos de sistemas biológicos, fornecendo informações estruturais das diferentes substâncias químicas orgânicas, tais como os derivados quinolínicos, e ajudando na melhor compreensão da complexidade de macromoléculas biológicas (FERREIRA et al. 2014; ITO, 2004). O DC também é usado para identificar e avaliar conformações e possíveis alterações estruturais de biomacromoléculas como, por exemplo, o DNA após o contato com outras substâncias (KARAMI et al. 2017; LAFAYETTE et al. 2013; PSLIKOVA et al. 2012; SHANKARAIAH et al. 2016).

O pico máximo de absorção de luz do DNA é verificado em aproximadamente 260 nm (Figura 4) (BRESCIA, 2012; CHARAK et al. 2012) porém, ele não emite luz. No espectro de DC do ctDNA, observa-se duas bandas características. A banda negativa, à 247 nm, é referente à sua elipticidade e a banda positiva em 277 nm é devido às interações no empilhamento das bases, sendo característica da conformação helicoidal B direita (Figura 4) (KARAMI et al. 2017). Quando o DNA interage com substâncias químicas, estes espectros podem sofrer alterações nos comprimentos de onda, detectando-se deslocamentos das intensidades máximas e verificando também alterações na elipticidade do DNA, quando comparados em sua forma livre (ALAM et al. 2018; ANITHA et al. 2013; MA et al. 2011; NETO; LAPIS, 2009; PLSIKOVA et al. 2012; TEMERK et al. 2015).

**Figura 4** – Espectro de absorção e DC do ctDNA na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Próprio autor.

Os efeitos que podem ser verificados, após esta interação, são: (i) efeito hiper-crômico, o qual corresponde ao aumento da intensidade de luz; (ii) efeito hipocrômico, sendo considerado uma diminuição da luz; (iii) e (iv) efeitos hipsocrômico e batocrômico, caracterizados pelo deslocamento do pico máximo para a região do azul e vermelho, respectivamente. Estas mudanças são úteis para determinar possíveis interações entre ligantes e biomoléculas, podendo prever, nos estudos com o DNA, o potencial antitumoral destes compostos avaliados (ANITHA et al. 2013; GAO et al. 2010; JANNESARI et al. 2013; JANOVEC et al. 2011; SHAHABADI; HEIDARI, 2012).

Derivados sintéticos contendo anéis aromáticos e/ou heterocíclicos têm sido submetidos a inúmeros estudos por conta de seus potenciais antitumorais. São considerados promissores devido, principalmente, às suas estruturas planas e porções aromáticas que conferem a capacidade de interagir com a dupla cadeia de DNA. Esta característica planar pode ocasionar efeitos hiper-crômicos e hipocrômicos, nos espectros de absorção do DNA, bem como grandes alterações em ambas as bandas positivas e negativas nos espectros de CD devido à intercalação dos ligantes entre as bases nitrogenadas do DNA. Contudo, quando há ligações aos sulcos, pode-se observar pequenas ou nenhuma alteração nas bandas de CD. Heteroátomos como o nitrogênio, enxofre e oxigênio possibilitam o aumento da força do complexo ligante-DNA através de ligações de hidrogênio, correlacionando-se com atividades antitumorais. E se, nas estruturas químicas, um ou mais heteroátomos existirem, a porção cromófora intercaladora promove uma melhor interação (AKHTAR et al. 2016; ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA et al. 2016; LAFAYETTE et al. 2017; OZKAY et al. 2010; THAMILARASAN et al. 2016).

As interações ligantes-DNA também podem ser estudadas por meio de técnicas de modelagem molecular, utilizando métodos computacionais para a predição de conformações dos ligantes bem como seus possíveis modos de ligação. Dentre estas técnicas, o docking molecular é o mais utilizado (HARIBABU et al. 2015; SUBASTRI et al. 2015).

Existem variados estudos na literatura utilizando o estudo de docking para auxiliar na visualização da formação de complexos entre ligantes e biomoléculas. São baseados em algoritmos de busca para a obtenção de possíveis conformações e orientações dos ligantes, indicando a melhor forma de interação (EL-SONBATI et al. 2016; LIU et al. 2014).

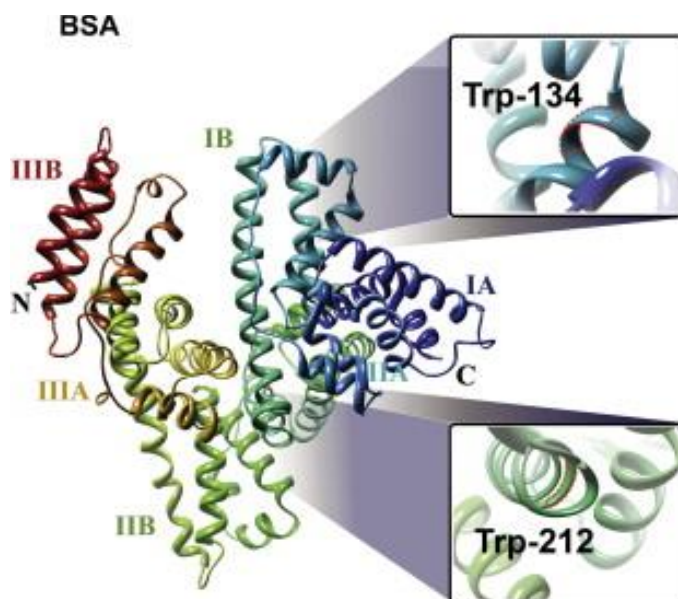
### 3.2 ALBUMINA

As albuminas séricas são as proteínas mais abundantes do plasma, com muitas funções fisiológicas e alta capacidade de ligação com várias substâncias. Por isso, atuam como transportadoras de diversos ligantes endógenos e exógenos, incluindo ácidos graxos, aminoácidos e nutrientes, sendo capaz de vincular também metais e produtos farmacêuticos a locais de ligação específicos (BOSE, 2016; DA SILVA et al. 2013; ROY et al. 2017; SINGLA; LUXAMI; PAUL, 2016). Elas são principais alvos moleculares para investigação de agentes cancerígenos, podendo fornecer ricas informações a respeito das propriedades biológicas dos fármacos, tais como distribuição, metabolismo e eficácia (RAHMAN et al. 2017).

A albumina do soro bovino (BSA) faz parte deste grupo de proteínas amplamente estudadas devido à sua estrutura terciária homóloga de 76% com a albumina do soro humano (HSA), além do baixo custo e boa disponibilidade. A BSA é constituída de três grandes domínios (I, II e III), similares em estrutura e classificados em A e B. Estes domínios são divididos em nove alças (L1-L9) por 17 ligações dissulfeto. As regiões onde ocorre o armazenamento dos compostos são frequentemente localizadas em cavidades hidrofóbicas (subdomínios IIA e IIIA), conhecidas como sítios I e II de Sudlow (Figura 5) (BELATIK et al. 2012; DA SILVA, et al. 2013; DA SILVA, et al. 2014; ROY et al. 2017; SURYAWANSHI et al. 2016).

Comparativamente, a BSA possui dois resíduos de triptofano (Trp) denominados Trp-134 e Trp-212, situados nos subdomínios IB e IIA, enquanto que a HSA contém apenas o resíduo Trp-214, no subdomínio IIA (DA SILVA et al. 2014). O resíduo Trp-134 está localizado na superfície da estrutura da BSA e o Trp-212 nos bolsos de ligação hidrofóbicos (ABDI et al. 2012; BELATIK et al. 2012).

**Figura 5** – Estrutura da albumina do soro bovino com seus respectivos subdomínios e resíduos de triptofano.



Fonte: ABDI et al. (2012, p. 21).

Habitualmente, a ligação entre medicamentos e proteínas acontece reversivelmente através de interações químicas como, por exemplo, ligações iônicas, interações de Van der Waal, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, com as hidroxilas, carboxilas ou outras regiões disponíveis nos aminoácidos que formam sítios de ligação (ISHTIKHAR; RABBANI; KHAN, 2014; SINGH; MEHTA, 2006).

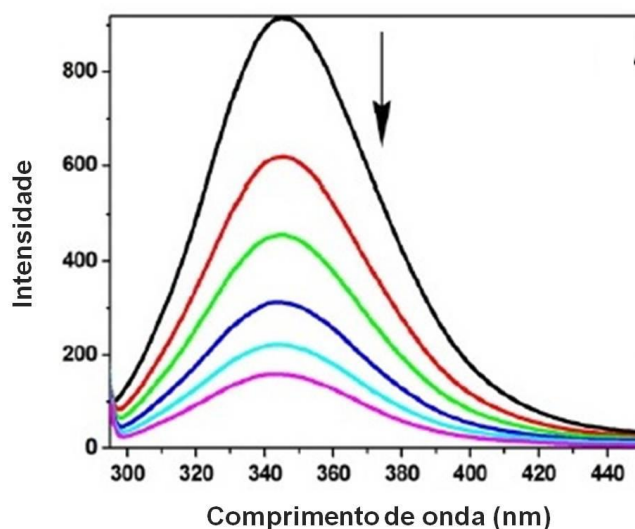
Estas interações podem ocasionar o aumento da solubilidade de fármacos no plasma e facilitar sua distribuição para os alvos biológicos, influenciando também na estabilidade e toxicidade durante a quimioterapia, e, conseqüentemente, desempenhar papel fundamental na eficácia farmacológica (BOSE, 2016; HEBIA et al. 2014; HU et al. 2005; SEDIGHIPOOR et al. 2017). Nesta perspectiva, avaliar a afinidade de um fármaco com a BSA, é um fator importante para obtenção de tratamentos mais eficazes e espera-se, com isso, que os diagnósticos e terapias passem a utilizar essas interações como mais uma nova alternativa para obtenção de resultados (HU et al. 2005; YAMASAKI et al. 2013).

Uma maneira de monitorar a eficácia dos fármacos no organismo e obter seus parâmetros físicos químicos é estudar essas proteínas através de técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência, pois, alterações no seu perfil espectral são capazes de informar certas mudanças estruturais e moleculares, quando em contato com as substâncias de estudo (MOREIRA et al. 2015; SINGLA; LUXAMI; PAUL, 2016). Essas alterações são bastante úteis para posterior análise de suas mudanças causadas pelo ligante, investigando-se o mecanismo de interação por meio dos efeitos de aumento ou diminuição da luz e desvios para a região do

vermelho e azul (MISHRA et al. 2014). Estudos através de docking molecular também são úteis para facilitar a análises destas interações (CHAVES, et al. 2015).

Na espectroscopia de fluorescência, é interessante notar a capacidade da proteína em emitir luz através de seus aminoácidos aromáticos. Os resíduos da BSA, quando excitados em 280 nm, exibe uma emissão de fluorescência intrínseca na faixa de 320 a 400 nm. A ligação de substâncias aos resíduos de triptofano, fenilalanina ou tirosina pode gerar alterações do sinal fluorescente e, conseqüentemente, melhor entendimento das mudanças estruturais (Figura 6) (ESWARAN et al. 2016; SINGLA; LUXAMI; PAUL, 2016). Esta supressão pode ser induzida através de transferências de energia, formação de complexos, rearranjos moleculares e colisões moleculares. Dentre a BSA e a HSA, a emissão dos resíduos Trp são as mais significativas por conta da natureza química do microambiente onde estão situados (MOREIRA et al. 2015).

**Figura 6** – Espectro de emissão da BSA apresentando diminuição da intensidade de fluorescência na presença de um extintor.



Fonte: Adaptado de Eswaran et al. (2016, p. 6).

Pode-se, ainda, mencionar os mecanismos de interação de fármacos e albumina através de duas formas: mecanismo estático e mecanismo dinâmico. No mecanismo de extinção estática, o ligante (fluoróforo) ao entrar em contato com a albumina se complexa a esta no estado fundamental, resultando em alterações significativas nas propriedades de absorção da proteína. A extinção dinâmica afeta somente o estado excitado dos fluoróforos quando colide com a proteína, sem alterar os espectros de absorção (ESWARAN et al. 2016; KALAIVANI et al. 2013; MISHRA, 2014; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, et al. 2011; PRABHAKARAN et al. 2013).

Estas informações são úteis e valiosas para, assim, encontrar a maneira como as diversas substâncias químicas podem interagir no meio biológico e causar efeitos terapêuticos.

### 3.2 QUÍMICA MEDICINAL

A química medicinal é considerada uma ciência multidisciplinar, envolvendo as mais diversas esferas, tais como descoberta, planejamento, identificação, preparação e interpretação dos diferentes modos de ação de substâncias biologicamente ativas (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Sabendo-se a necessidade da busca por novos fármacos, ela tem contribuído para a maior parte destas descobertas através dos planejamentos e modificações moleculares (VERÇOZA et al. 2009).

As estratégias de planejamento de fármacos são consideradas bastante importantes na descoberta de novos compostos, possibilitando originar e propor substâncias com menores efeitos indesejáveis, menor toxicidade, maior efeito farmacológico e que proporcionem menos rejeição dos usuários e maior sucesso nos tratamentos. Porém, a identificação de moléculas bioativas ainda é um dos maiores desafios (BARREIRO E BALZANI, 2009; LIMA, 2007).

Uma das estratégias bastante utilizada na química medicinal é a simplificação molecular, empregada com o intuito de realizar a redução de núcleos aromáticos e/ou outras regiões das moléculas de forma planejada (preservando as subunidades farmacofóricas). Possibilita, além da otimização das rotas sintéticas, o melhoramento da estrutura do composto, avaliando-o biologicamente após esta modificação (BARREIRO, 2002; LIMA, 2007; VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Esta simplificação foi empregada para obtenção do núcleo quinolina a partir do núcleo acridina, porção da molécula responsável pela interação com a dupla hélice do DNA, sendo um fator importante para a ação antitumoral (Figura 7).

**Figura 7** – Estratégia de simplificação molecular utilizando o núcleo acridina para obtenção do núcleo quinolina.



Fonte: Próprio autor.

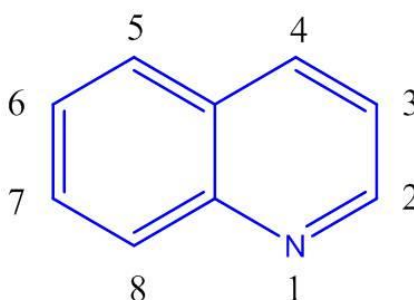
Com esta redução, ainda é possível verificar a ação terapêutica dos fármacos, mostrando que esta estratégia é de grande relevância, no âmbito químico e biológico, na obtenção de

inovações terapêuticas para as mais diversas doenças, entre elas, o câncer (AMARAL et al. 2017).

### 3.1.2 Núcleo Quinolínico

A quinolina é um composto orgânico heterocíclico, isolado por Runge pela primeira vez em 1834 (Figura 8) e também conhecida como benzopiridina ou benzazina. Com fórmula molecular  $C_9H_7N$ , é caracterizada por uma estrutura de dois anéis fundidos por *orto*-condensação do benzeno com a piridina, estando presente em diversos compostos naturais e substâncias terapêuticas (FERLIN et al. 2005; MARELLA et al. 2013).

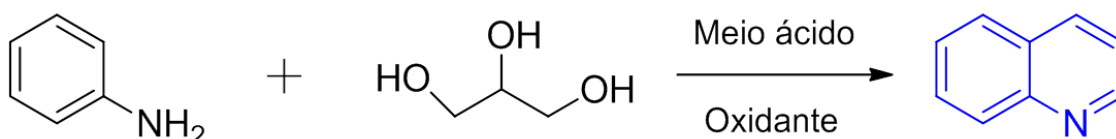
**Figura 8** – Estrutura do anel quinolínico.



Fonte: MARELLA et al. (2013).

Dentre as metodologias desenvolvidas para se obter o núcleo quinolínico, a síntese de Skraup é o processo de ciclização mais importante, no qual a anilina reage com o glicerol em meio ácido e, posteriormente, é ciclizada, oxidada e desidratada, formando o núcleo quinolínico (Figura 9). Outras metodologias como o método de Doebner-von Miller, reação de Combes e a síntese de Friedländer também são utilizadas para obtenção deste núcleo (AFFELDT, 2011; PINHEIRO et al. 2010).

**Figura 9** – Representação da síntese de Skraup para obtenção do núcleo quinolínico.



Fonte: Próprio autor.

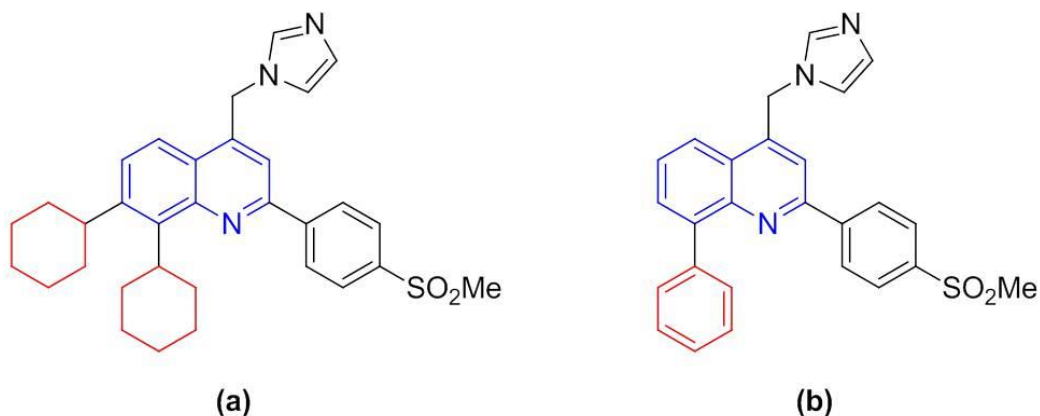
Este núcleo possui diferentes atividades terapêuticas, sendo considerado bastante importante no contexto da descoberta de fármacos devido às suas propriedades anticonvulsivante, antifúngica, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antiparasitária (PINHEIRO et al. 2010; MARELLA et al. 2013; PINZ et al. 2017). Os derivados quinolínicos são bastante utilizados na síntese de moléculas como compostos parentais, principalmente para a obtenção de fármacos com atividades antipalúdicas e antimicrobianas. Sugere-se que a presença de átomos e grupos eletronegativos nas posições meta e para do anel quinolínico, como o Cl, Br e NO<sub>2</sub>, diminuem a atividade antimicrobiana (JAIN et al. 2016).

Uma série de derivados trifluormetil quinolínicos, análogos à Mefloquina, foram estudados para demonstrar seu potencial farmacológico frente ao vírus ZIKA. As moléculas apresentaram inibição de mais de 75% da replicação do vírus e, quando comparadas com a Mefloquina, exibiram atividade farmacológica cinco vezes maior (BARBOSA-LIMA et al. 2017).

Outras atividades biológicas são descritas para os derivados deste núcleo como, por exemplo, hipotensora, anti HIV e atividades de inibição da COX-2. Seus análogos também foram estudados em relação à capacidade de reparação do DNA e de inibição da enzima topoisomerase, concluindo, assim, que substituições no anel quinolínico em posições adequadas promove o aumento do efeito farmacológico de uma molécula bioativa (DAVE; RAHATGAONKAR, 2011; GASPAROTTO et al. 2006; GHODSI et al. 2016).

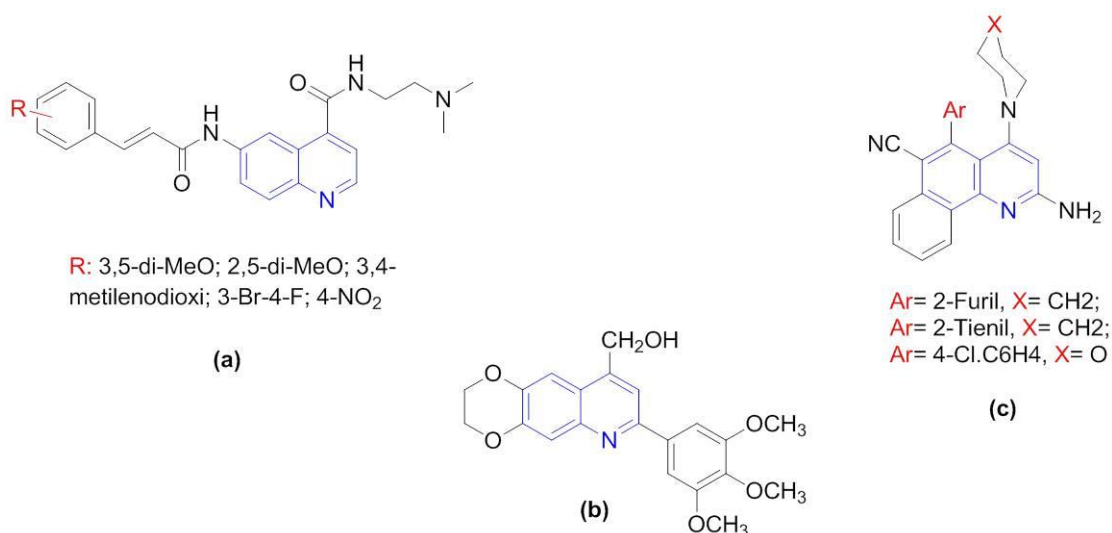
Outros estudos demonstram atividade citotóxica frente à linhagem de células de mama MCF-7 e T47D devido, possivelmente, ao aumento de suas propriedades lipofílicas após a substituição do anel quinolínico nas posições C-7 e C-8, atravessando a membrana celular de forma mais eficaz (Figura 10). Estes compostos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> <5 µM para a linhagem MCF-7 e <25 µM para a linhagem T47D (GHODSI et al. 2016).

**Figura 10** – Derivados quinolínicos com melhor atividade citotóxica nas linhagens de células de câncer de mama MCF-7 (a) e T47d (b).



Ainda, é descrito que outros derivados do anel quinolínico (Figura 11) apresentam inibição significativa da proliferação de linhagens celulares de câncer testadas *in vitro*, em concentrações pequenas e valores de IC<sub>50</sub> menores, resultados estes que apontam o potencial antitumoral dos derivados com a porção quinolina (KUO et al. 2016; YADAV et al. 2016; MALAYERI et al. 2017).

**Figura 11** – Derivados cinamamidas quinolínicos (a), aril dihidrodioxinos quinolínicos (b) e benzoquinolínicos (c) com potenciais atividades citotóxicas frente a linhagens celulares tumorais.



A atividade de ligação a proteínas plasmáticas, como a albumina, também é descrita para compostos sintéticos contendo o núcleo quinolínico. Thirunavukkarasu e colaboradores (2017) sintetizaram e avaliaram a capacidade de ligação de derivados quinolínicos com a proteína albumina, através de técnicas espectroscópicas, e demonstraram efetiva interação por meio das alterações nos espectros de absorção e fluorescência. Outros derivados também

apresentaram habilidade de se ligar à albumina, demonstrando a importância do núcleo quinolínico no processo de interação com esta proteína (SHAHABADI; MAGHSUDI; SHOHRE, 2012; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, 2012).

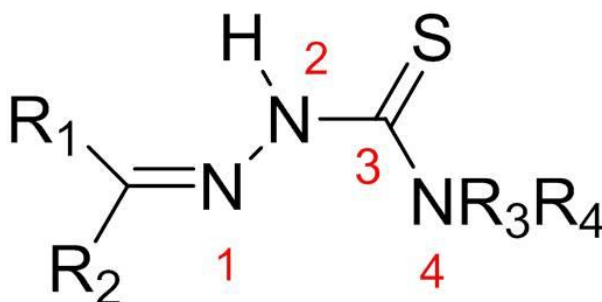
Observa-se, assim, que o anel quinolínico desempenha um papel importantíssimo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais devido à sua influência positiva nos resultados apresentados até hoje, além de sua analogia com o núcleo acridina, descrita por alta ação antitumoral por se ligar à molécula de DNA (ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA, et al. 2016). Ainda, destaca-se pelos seus diferentes mecanismos de ação, tais como inibição do crescimento de células (interrompendo o ciclo celular), indução da apoptose e inibição da angiogênese e migração celular (AFZAL et al. 2015), além de permitir a melhor capacidade de interação com proteínas plasmáticas, um bom avanço para o estudo das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos.

### 3.1.3 Derivados Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazona (Figura 12) é uma classe de compostos orgânicos que apresentam importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras (TENÓRIO et al. 2005; BERALDO, 2004; BLAU, 2013; OLIVEIRA et al. 2015). Podem ser obtidas através da condensação da tiossemicarbazida com outros reagentes como, por exemplo, aldeídos e cetonas, um modo direto de obtenção, bem como serem preparadas por meio indireto, reagindo a hidrazina ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ) com outros compostos (p. ex. isotiocianatos, ditiocarbamatos), seguido da condensação com o específico carbonilado (TENÓRIO et al. 2005).

São conhecidas por agir como inibidores de enzimas, se complexando a metais endógenos e interagindo com o DNA, inibindo sua síntese, da mesma forma que podem mimetizar a ação de certas enzimas (BERALDO, 2004).

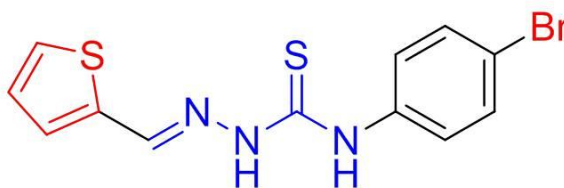
**Figura 12** – Estrutura genérica das tiossemicarbazonas. R1, R2, R3, R4 = H, grupos arila ou grupos alquila.



As aplicações realizadas com esta classe de compostos, na pesquisa para o tratamento do câncer, podem ser vistas nos trabalhos de Oliveira et al. (2015), onde derivados Tiofeno-Tiossemicarbazonas mostraram atividade citostática frente a várias linhagens celulares tumorais. Neste trabalho, sugere-se que a presença de anéis aromáticos em sua estrutura, bem como substituintes halogênicos, melhora a atividade antiproliferativa, provocando a externalização da Fosfatidilserina, um componente fosfolipídico geralmente presente na região interna da membrana celular, que sinaliza a morte celular.

O mesmo autor também destaca que um dos derivados tiossemicarbazonas sintetizados (Figura 13), apresentando substituição de um halogênio no anel aromático, causou a inibição do desenvolvimento de tumores sólidos de Ehrlich em doses menores por meio da administração oral, assim como baixa toxicidade.

**Figura 13** – Derivado tiofeno-tiossemicarbazona com melhor atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.



Outros derivados apresentaram capacidade de ligação com o DNA, como descrito por Markovic e colaboradores (2013), onde derivados antraquinonas tiossemicarbazonas exibiram atividade anticâncer, intercalando-se à dupla hélice. Além da habilidade de interagir com o DNA, outros compostos também apresentaram atividade citotóxica frente a células tumorais HCT-116 (ALI et al. 2014).

Este potencial antiproliferativo, acompanhado de ligação ao DNA, também pode ser observado nos trabalhos de Oliveira e colaboradores (2017) (Figura 14). Nos ensaios biológicos, para as diversas linhagens celulares de tumores (leucemia, glioma, mama, rim, pulmão, cólon e ovário), os valores de IC<sub>50</sub> dos derivados tiossemicarbazonas foram baixíssimos, bem como forte ligação ao DNA, indicando a importância desta porção na resposta biológica. Adicionalmente, este mesmo derivado exibiu capacidade de inibição da enzima topoisomerase II $\alpha$ , sendo considerado um forte candidato para a terapia anticâncer.

**Figura 14** – Derivado tiossemicarbazona com atividade antiproliferativa, ligante ao DNA e inibidor da enzima topoisomerase II $\alpha$ .



As tiossemicarbazonas também apresentam capacidade de se ligar à proteína albumina, como descrito por Yu et al. (2013), verificada por meio de técnicas espectroscópicas de fluorescência e modelagem molecular. A extinção fluorescente, observada após a inserção dos compostos, é vista como uma alteração dos resíduos de aminoácidos da proteína e, consequentemente, interação por meio da formação de complexo ligante-albumina.

Todos estes resultados demonstram o grande potencial dos derivados tiossemicarbazonas, influenciando positivamente na atividade antitumoral de fármacos que apresentam esta porção em sua estrutura.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 METODOLOGIA QUÍMICA

A seguir, serão descritos todos os reagentes e equipamentos utilizados para a síntese dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas.

#### 4.1.1 Materiais e equipamentos

Os reagentes utilizados para a síntese e análise dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas foram 4-flúor-benzil isotiocianato (CAS: 1544-68-9), 2-fenil-etil isotiocianato (CAS: 2257-09-2), 3-piridil isotiocianato (CAS: 17452-27-6), 4-cloro-benzil isotiocianato (CAS: 2131-55-7), 1-Naftil isotiocianato (CAS: 551-06-4), 4-nitro-benzil isotiocianato (CAS: 2131-61-5), 4-metil-benzil isotiocianato (CAS: 622-59-3), 4-etil-benzil isotiocianato (CAS: 18856-63-8), 4-bromo-benzil isotiocianato (CAS: 155863-32-4), 4-metoxi-benzil isotiocianato (CAS: 2284-20-0), 3-propeno isotiocianato (CAS: 57-06-7) benzil isotiocianato (CAS: 103-72-0), Solução de Hidrazina (CAS: 302-01-2) e 4-quinolina-carboxaldeído (CAS: 4363-93-3). Todos os reagentes fornecidos pela *Sigma Aldrich*. Os solventes álcool etílico, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), além do ácido acético glacial foram fornecidos pela Dinâmica.

Para análise dos compostos sintetizados, foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se placas cromatográficas Polygram Sil G/UV 254 (0,20 mm), reveladas sob luz ultravioleta em 254 nm. Para a determinação do ponto de fusão, o aparelho de ponto de fusão a seco (Modelo 431D - Fisatom, Brasil) foi usado.

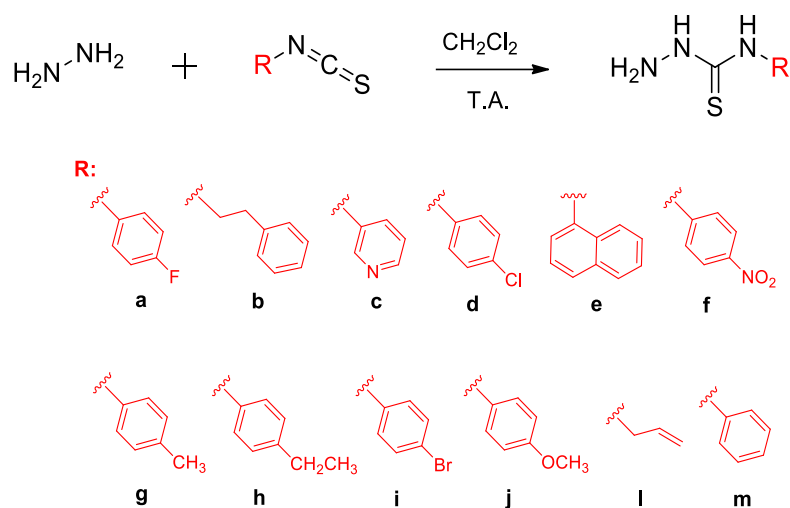
A caracterização e comprovação estrutural foi realizada através de análises de espectroscopia de Infravermelho (IV), registrados num espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, em UATR, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) realizados em Modelo Varian Plus Spectrofotometro (Varian, EUA) a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente, em solvente DMSO-*d*<sub>6</sub> e Espectrometria de massas (MS), realizada pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF.

#### 4.1.2 Procedimentos experimentais

##### 4.1.2.1 Síntese das tiossemicarbazidas

Para obtenção das tiossemicarbazidas substituídas (a-m), a metodologia aplicada por Gürsoy, Terzioglul, Ötük (1997) e Liesen et al. (2010) foi seguida, na qual envolveu a reação de adição nucleofílica entre 2 mols de solução de hidrazina e 1 mol de isotiocianatos substituídos, obtidos comercialmente (*Sigma Aldrich*) (Esquema 1). Diclorometano foi utilizado como solvente. Em todas as reações houve formação de precipitado e mudança de coloração logo após adição dos isotiocianato. Os produtos foram obtidos após agitação magnética à temperatura ambiente pelo período máximo de 60 minutos. As reações foram acompanhadas por CCD para verificar a formação do produto e sua finalização.

**Esquema 1** – Esquema reacional para obtenção das tiossemicarbazidas substituídas (a-m).



Fonte: Próprio autor.

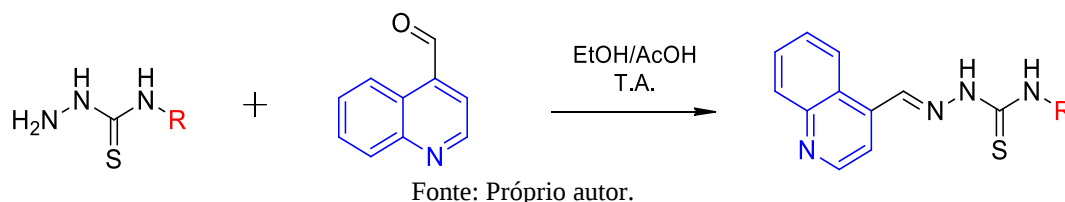
#### 4.1.2.2 Obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs)

A síntese dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas foi realizada de acordo com o esquema 2. O anel quinolínico foi utilizado como núcleo principal para inserção das tiossemicarbazidas (a-m). O reagente quinolínico foi primeiramente solubilizado com etanol, na presença de ácido acético glacial e deixado à temperatura ambiente e agitação por cerca de 10 minutos. Após isto, os compostos (a-m) foram adicionados ao sistema reacional para obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JF-85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 e 96).

A síntese foi processada, em proporções equimolares, à temperatura ambiente, sob agitação magnética durante aproximadamente 60 minutos. Foi observada mudança de coloração em todas as reações imediatamente após a inserção das tiossemicarbazidas. Para verificar a formação do produto e sua finalização, a reação foi acompanhada por CCD. Os produtos foram

filtrados e lavados sucessivamente com etanol para sua purificação. A caracterização dos derivados sintetizados foi verificada por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , DEPT, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , infravermelho e espectrometria de massas.

**Esquema 2** – Esquema reacional para obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas substituídos.



Síntese do *N*-(4-flúorfenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-85): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-flúorfenil)hidrazinacarbotoamida (0,3531g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-fenetil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-86): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-fenetilhidrazinacarbotoamida (0,372g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(piridin-3-il)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-87): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(piridin-3-il)hidrazinacarbotoamida (0,3206g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-clorofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-88): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-clorofenil)hidrazinacarbotoamida (0,385g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(naftalen-1-il)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-89): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoamida (0,414g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-nitrofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-90): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-nitrofenil)hidrazinacarbotioamida (0,4046g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(quinolin-4-ilmetileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-91): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotioamida (0,353g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-etilfenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-92): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-etilfenil)hidrazinacarbotioamida (0,3722g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-bromofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-93): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-bromofenil)hidrazinacarbotioamida (0,469g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-metoxifenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-94): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida (0,3760g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-alil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-95): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-(4-alilfenil)hidrazinacarbotioamida (0,250g), etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-fenil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-96): A mistura de 4-quinolina-carboxaldeído (0,3 g, 1,9087 mmol), *N*-fenilhidrazinacarbotioamida (0,3187g),

etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL) foram mantidos sob agitação por 60 minutos à temperatura ambiente.

## 4.2 ENSAIO DE INTERAÇÃO

### 4.2.1 Estudo da interação dos derivados LqIT/JFs e albumina/DNA

#### 4.2.1.1 Materiais e equipamentos

Foi utilizado solvente DMSO na preparação das soluções mãe e tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) na análise das interações com BSA e DNA (SURYAWANSHI et al. 2016). A BSA e o DNA foram obtidos da Sigma Aldrich e o aparelho empregado na análise de obtenção dos espectros de Ultravioleta-visível (UV-vis), emissão de fluorescência e dicroísmo circular foram o Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO, Espectrofluorímetro de JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão) e Espectropolarímetro JASCO (J-815 CD Spectrometer), respectivamente.

#### 4.2.1.2 Preparação das soluções de ctDNA e albumina

No preparo da solução contendo o ctDNA, foi utilizado tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) e DNA do timo de bovino (ctDNA), adquirido pela *Sigma Aldrich*. A solução de ctDNA em tampão Tris foi deixada durante 24 h, à temperatura de 20°C. Após este período, a solução foi sonicada durante 30 min e sua concentração determinada utilizando o coeficiente de extinção molar 6600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 260 nm (WOLF et al., 1987). A pureza do DNA foi determinada através da análise do valor da relação de absorbância em 260/280 nm.

A BSA também foi obtida comercialmente pela *Sigma Aldrich* e a sua solução foi preparada em tampão Tris HCl (0,1 M, pH 7,6) a uma concentração de 1 mM.

#### 4.2.1.3 Espectroscopia de absorção eletrônica

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM/mL (solução mãe) e as soluções de trabalho preparadas por diluição em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) nas seguintes concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µM. Em concentrações otimizadas (5-40 µM), os compostos foram expostos à albumina (20 µM). O sistema foi agitado e deixado à temperatura ambiente durante 10 minutos.

Os derivados, em concentração fixada (30  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ), também foram expostos à concentrações crescentes de ctDNA (0-100  $\mu\text{M}$ ), e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. As medições das soluções de BSA-compostos e ctDNA-compostos foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento do percurso de 1cm.

A constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ) foi obtida através da equação de McGee e Von Hippel (1974):

$$\begin{aligned} [JFs] / (\epsilon_a - \epsilon_f) &= [JFs] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \\ [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f) &= [DNA] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \end{aligned}$$

onde,  $E_a$ ,  $E_b$  e  $E_f$  são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da  $[JFs]/(E_a - E_f)$  versus  $[JFs]$  e  $[DNA]/(E_a - E_f)$  versus  $[DNA]$  foram utilizados para obtenção dos  $K_b$ s a partir da razão entre a inclinação e o intercepto. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

Alterações no espectro de absorção da BSA e DNA na presença dos compostos, como também os valores das constantes de ligação, podem fornecer informações relativas ao modo de interação.

#### 4.2.1.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência

As medições de fluorescência dos derivados s LqIT/JFs foram realizadas em solução contendo tampão Tris 0,1M, pH 7,6, em concentrações de 5-25  $\mu\text{M}$  na faixa de 220-600 nm, com bandas de excitação e de emissão de 5nm e 5nm e sensibilidade alta.

Na análise da interação dos LqIT/JFs com a albumina, os espectros de emissão foram registrados na região de 310-400 nm usando um comprimento de onda de excitação de 285nm, com bandas de excitação e de emissão de 2,5 nm, em concentrações crescentes dos derivados (5-50  $\mu\text{M}$ ) e concentração fixada de BSA. As titulações de fluorescência também foram realizadas por adição de quantidades crescentes de ctDNA (0-100  $\mu\text{M}$ ) na presença de concentração fixa dos derivados (10  $\mu\text{M}$ ).

Todas as medições foram realizadas a 25° C em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de caminho de 1 cm. 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):

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q]$$

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

#### 4.2.1.5 Espectroscopia de dicroísmo circular

Inicialmente, os derivados LqIT/JFs foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução mãe) e as solução de trabalho diluídas em tampão Tris HCl (0,1 M, pH 7,5). As soluções finais de ctDNA (100  $\mu$ M) e dos derivados LqIT/JFs (30  $\mu$ M) foram agitadas e deixadas à temperatura ambiente por 10 min. As medições foram realizadas na faixa de 230 a 400 nm, com velocidade de 100 nm/min e banda de feixe de luz de 1 nm usando uma cubeta de quartzo retangular.

### 4.3 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

#### 4.3.1 Análise das propriedades ADME *in silico* e docking molecular

A análise das interações ligante-receptor dos compostos foi realizada utilizando o Autodock 4.2.6 (MORRIS et al., 2009) com o algoritmo Genético Lamarckiano. O perfil ADME dos compostos foi investigado com o uso das plataformas online SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e pkCSM. (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

#### 4.3.2 Preparação da estrutura dos ligantes

As estruturas dos compostos em análise foram construídas no software Avogadro 1.2.0 e completamente otimizadas utilizando o método semiempírico PM6 (STEWART, 2007) implementado no MOPAC 2016. Após a otimização as estruturas foram salvas no formato pdb. Com o uso do AutoDockTools, os hidrogênios não polares foram misturados aos carbonos equivalentes, e as cargas de Gasteiger dos átomos foram calculadas. As ligações rotacionáveis dos ligantes foram definidas e as estruturas foram salvas no formato pdbqt para utilização nos estudos de docking.

### 4.3.3 Preparação das estruturas das topoisomerase e albumina do soro bovino (BSA)

A estrutura da topoisomerase contendo o inibidor etoposídeo co-cristalizado (código PDB: 5GWK) e a estrutura da albumina contendo o ligante naproxeno cocrystalizado (código PDB: 4OR0) (BUJACZ; ZIELINSKI; SEKULA, 2014; WANG et al., 2017) foram selecionadas como receptores. Com o uso do Discovery Studio Visualizer (“Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer”, 2016), as moléculas de água e os ligantes foram removidos. Então, com o uso do AutoDockTools, os hidrogênios não polares foram misturados aos respectivos átomos de carbono e os hidrogênios polares foram adicionados à estrutura da enzima e albumina. As cargas de Kollman foram adicionadas e a estrutura foi salva no formato pdbqt. Para a topoisomerase II $\alpha$  atribuiu-se a carga 0,8 aos átomos de Mg presentes no receptor.

### 4.3.4 Docking

#### 4.3.4.1 Topoisomerase II $\alpha$ na presença dos ligantes

Com o uso do AutoDockTools e AutoGrid 4.2.6, os parâmetros para geração do grid 3D foram gerados. Foram criados 70 x 70 x 70 pontos de grid com um espaçamento 0,0375nm. O grid foi centralizado na posição do ligante co-cristalizado presente na cadeia B da proteína.

O Algoritmo Genético Lamarckiano no AutoDock 4.2.6 foi aplicado na busca da melhor conformação e orientação especial dos ligantes, utilizando as configurações padrão de busca. Durante cada experimento de docking, 100 conformações foram obtidas. Ao final, as conformações foram agrupadas em clusters de RMSD (Root-Mean—Square Deviation) de 2 Å, e somente foram consideradas para análise conformações presentes em clusters com ao menos 10 conformações, sendo as de menores energias. A conformação de menor energia obtida para cada ligante foi analisada nos programas AutoDockTools e Discovery Studio Visualizer.

Para validar o procedimento de docking, o cálculo docking do ligante co-cristalizado Etoposídeo foi previamente realizado.

#### 4.3.4.2 BSA na presença dos ligantes

A proteína albumina apresenta mais de um sítio de ligação possível. Os principais sítios hidrofóbicos para compostos aromáticos e/ou heterocíclicos são o sítio I, localizado no

subdomínio IIA e o sítio 2, localizado no subdomínio IIIA (JAYABHARATHI; JAYAMOORTHY; THANIKACHALAM, 2012). Com o uso do AutoDockTools e AutoGrid 4.2.6, os parâmetros para geração do grid 3D foram gerados. Foram criados 126 x 126 x 126 pontos de grid com um espaçamento 0,0375nm. O primeiro grid foi centralizado na posição do ligante co-cristalizado presente no sítio I da cadeia A da proteína. O segundo, na posição do ligante co-cristalizado presente no sítio II da cadeia A da proteína.

O Algoritmo Genético Lamarckiano no AutoDock 4.2.6 foi aplicado na busca da melhor conformação e orientação especial dos ligantes, utilizando as configurações padrão de busca. Durante cada experimento de docking, 100 conformações foram obtidas e analisadas. Ao final, a conformação de menor energia obtida para cada ligante foi considerada e analisada nos programas AutoDockTools e Discovery Studio Visualizer.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

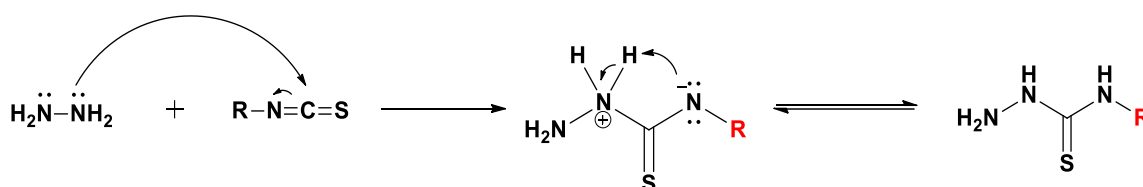
### 5.1 PARTE QUÍMICA

Todos os derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs) foram obtidos satisfatoriamente, utilizando somente como método de purificação a etapa de lavagem com água destilada dos produtos finais, mostrando assim, que a rota sintética empregada foi eficaz.

#### 5.1.1 Mecanismo reacional da síntese dos derivados tiossemicarbazidas

No esquema 3 é mostrada a reação de obtenção dos derivados tiossemicarbazidas. Esta síntese ocorreu a partir do ataque nucleofílico dos elétrons livres do nitrogênio da hidrazina ao carbono parcialmente positivo dos isotiocianatos de escolha. Após este ataque, a ligação *pi* foi desfeita, sucedendo-se a migração dos elétrons para o nitrogênio. O nitrogênio positivo é desprotonado a partir do nitrogênio carregado negativamente, ocorrendo assim, a formação da tiossemicarbazida com carga formal zero nos nitrogênios (TENÓRIO et al. 2005).

**Esquema 3** – Mecanismo reacional das tiossemicarbazidas substituídas.



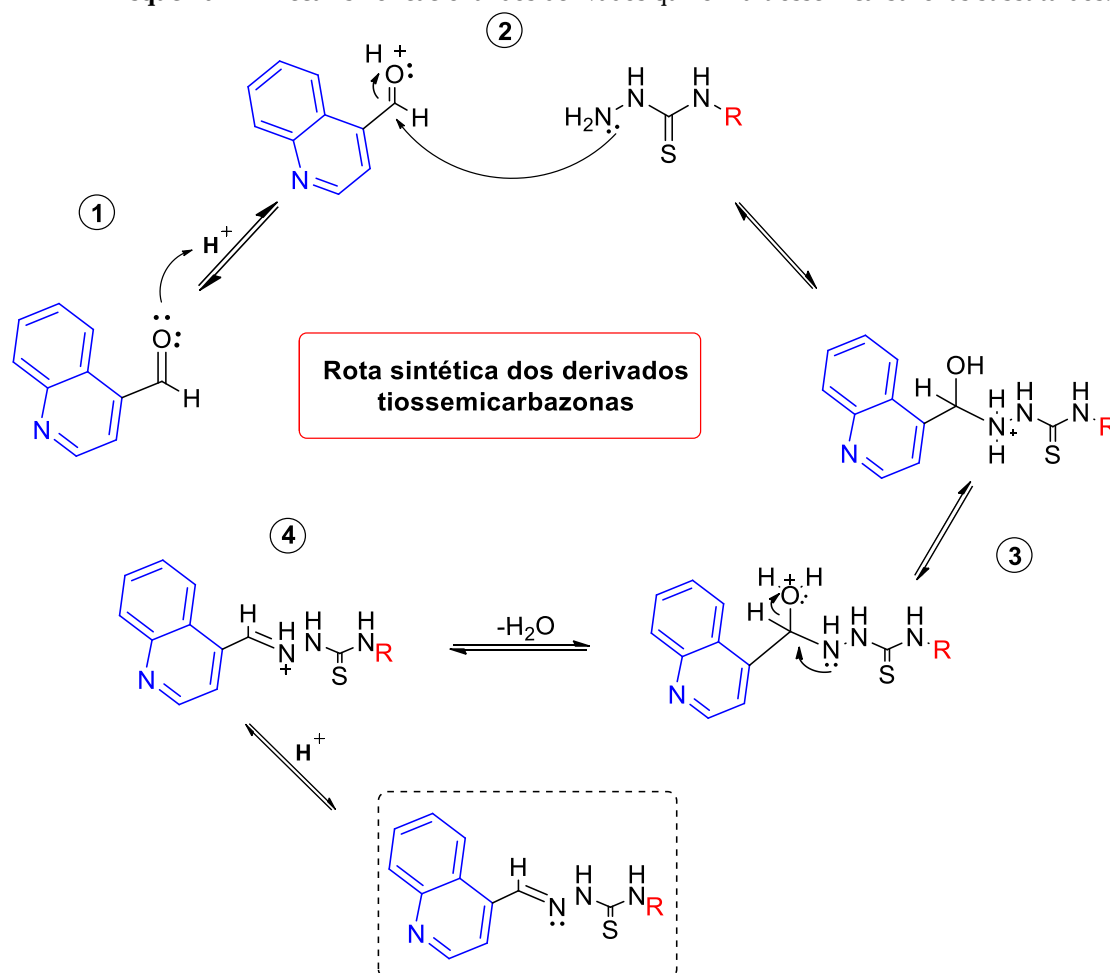
Fonte: Próprio autor.

Ao todo, foram sintetizadas 12 tiossemicarbazidas, com substituintes provenientes dos isotiocianatos utilizados.

#### 5.1.2 Mecanismo reacional da síntese dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs)

Para obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas, as tiossemicarbazidas obtidas na etapa anterior foram utilizadas como intermediárias e o reagente 4-quinolina-carboxaldeído também foi empregado (Esquema 4). O meio ácido reacional, devido à presença do ácido acético utilizado, levou à protonação do oxigênio do aldeído presente no núcleo quinolina (etapa 1), provocando uma carga parcial positiva no carbono a este ligado. Este processo conduz um ataque nucleofílico do nitrogênio da amina livre (tiossemicarbazida) ao carbono da carbonila (etapa 2), deslocando o par de elétrons da ligação *pi* para o oxigênio com carga positiva. Em seguida, o átomo de nitrogênio é desprotonado pelo oxigênio, liberando uma molécula de água (etapa 3), e formando uma ligação *pi* entre o carbono e o nitrogênio (etapa 4).

**Esquema 4** – Mecanismo reacional dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas substituídos.



Fonte: Próprio autor.

### 5.1.3 Análises espectroscópicas dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas (LqIT/JFs)

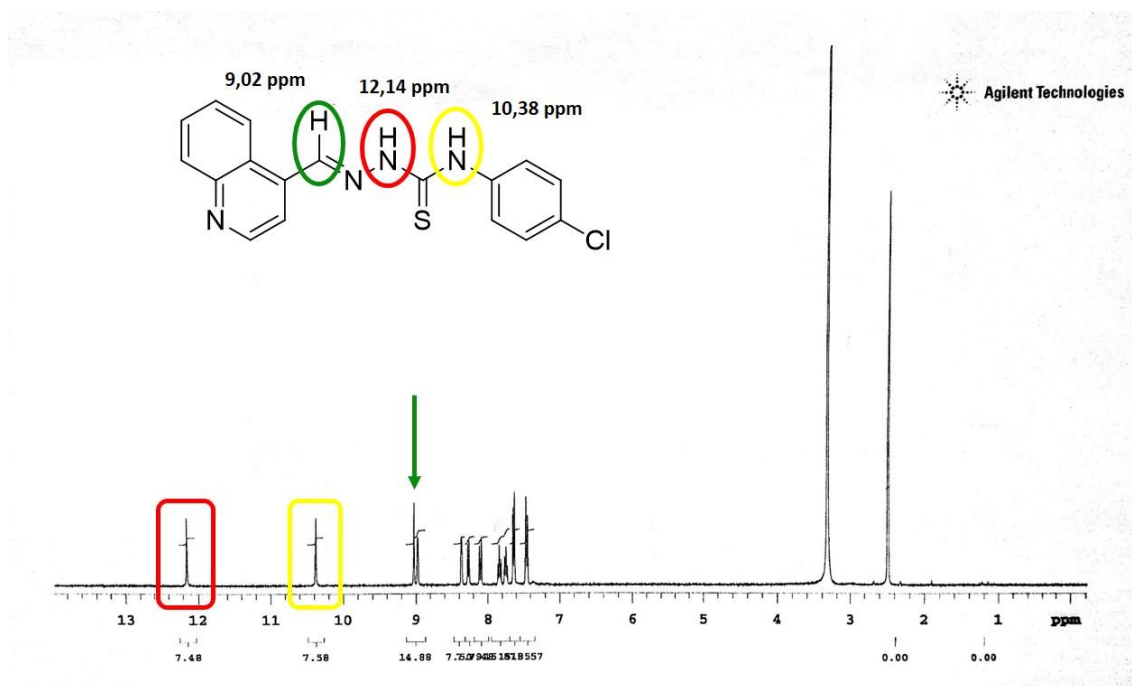
Neste tipo de reação, é possível obter uma mistura de isômeros *E/Z* por conta da dupla ligação da imina (C=N), observando sinais duplicados desta porção nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Porém, em todos os derivados sintetizados, foi encontrado somente um único sinal singlete do grupo imínico HC=N, deduzindo-se que uma única configuração é verificada nesses compostos, provavelmente sendo a isomeria *E* devido à preferência deste tipo de orientação pelas tiossemicarbazonas (CARDOSO et al. 2014; ESPÍNDOLA et al. 2015).

A caracterização estrutural dos derivados sintetizados sucedeu através de análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia do infravermelho (IV), além da espectrometria de massas (MS) para verificar a massa molecular dos compostos obtidos. Os deslocamentos químicos, nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão expressos em ppm e a multiplicidade dos sinais encontrados está representada por singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), quarteto (q) e multipeto (m). As constantes de acoplamento (*J*) estão expressas em Hertz (Hz).

Para melhor compreensão, o composto LqIT/JF-88 foi escolhido para ser discutida toda a sua caracterização, inclusive através de espectros bidimensionais como DEPT, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

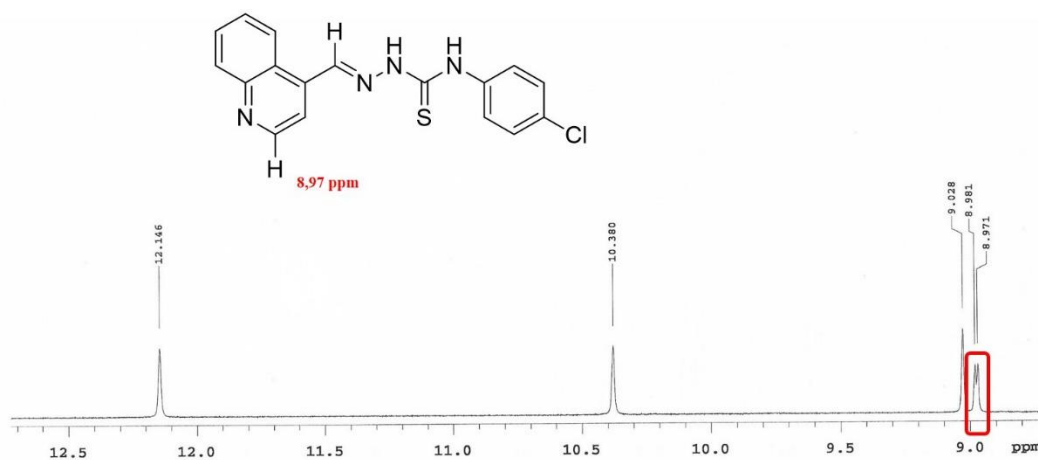
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 15), foi observado sinais referentes a todos os hidrogênios presentes no composto LqIT/JF-88, de modo especial, três singletos com deslocamentos químicos em  $\delta$  9,02 ppm (1H, H-C=N),  $\delta$  10,38 ppm (1H, NH) e  $\delta$  12,14 ppm (1H, NH), sendo sinais diagnósticos que comprovam a formação da porção tiossemicarbazona (sinalizados em vermelho).

**Figura 15** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto LqIT/J-88 com evidência de seus sinais diagnósticos.

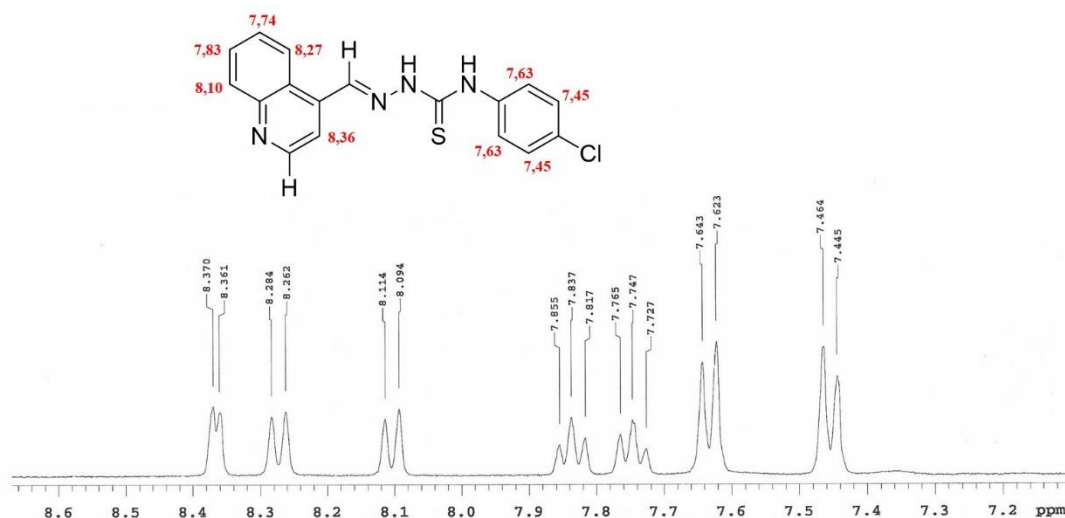


Para os hidrogênios da porção quinolina, é evidente a presença de sinais dubletos e duplo dubletos devido aos acoplamentos entre os hidrogênios do mesmo anel, situados entre  $\delta$  7,74 ppm e  $\delta$  8,97 ppm (Figuras 16 e 17). Dois sinais dubletos também são observados para os hidrogênios do anel fenil, cada um integrando para dois hidrogênios, em  $\delta$  7,45 ppm e  $\delta$  7,63 ppm, sendo esta simetria devido à substituição na posição *para* deste anel (Figura 17).

**Figura 16** – Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  do composto LqIT/JF-88.



**Figura 17** – Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto LqIT/JF-88 com atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios do anel quinolina e fenil.

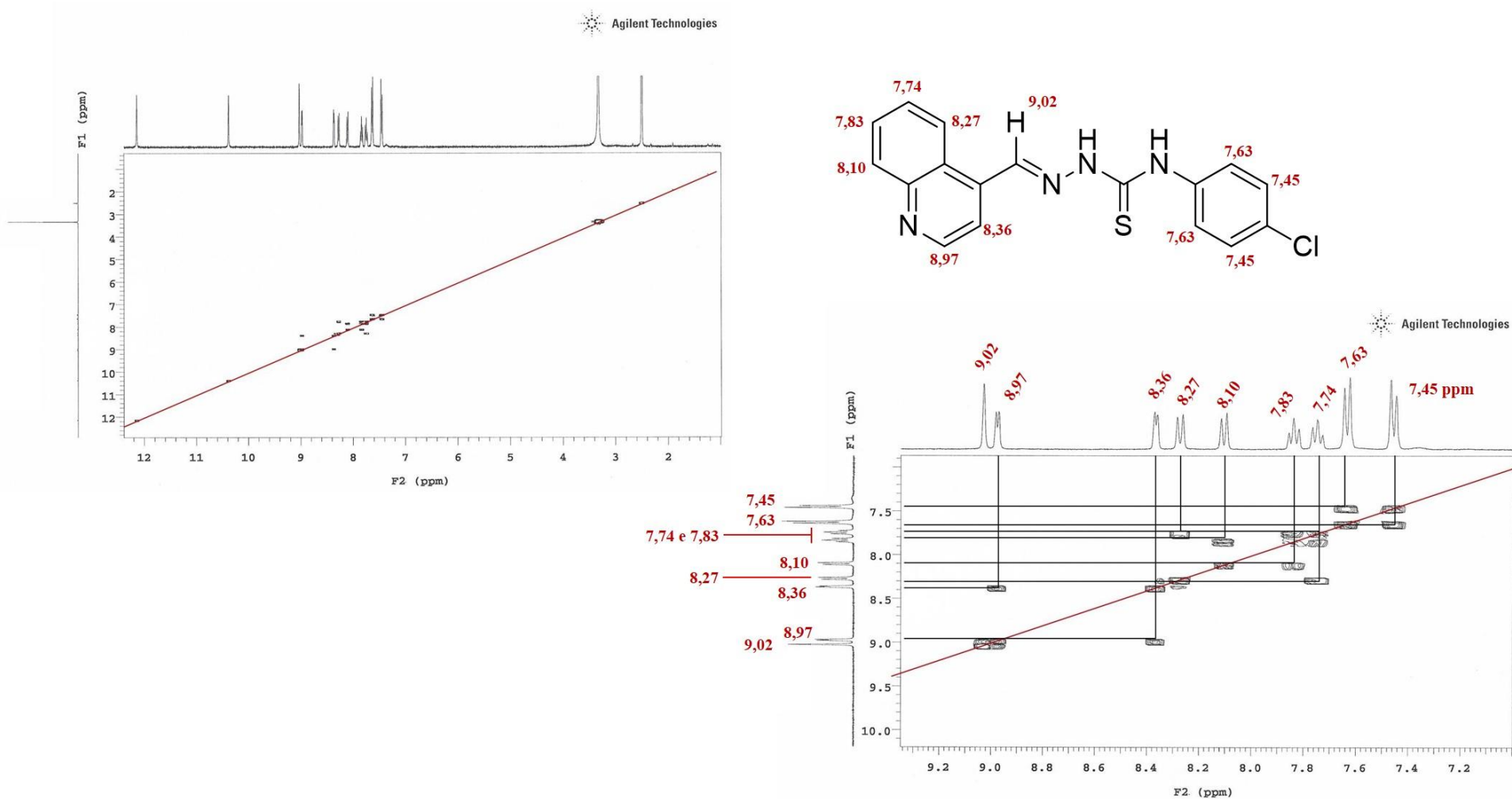


Para confirmar, de fato, todos os acoplamentos existentes entre os hidrogênios do derivado LqIT/JF-88, também foi analisado os espectros de COSY e HSQC.

O espectro de COSY permite-nos estabelecer as correlações entre os hidrogênios das moléculas analisadas que estão acoplado numa distância de 2-3 ligações (KAISER, 2000). Neste sentido, foi possível determinar que os hidrogênios do anel fenil acoplam entre si, possuindo correlação entre o sinal em  $\delta$  7,45 e 7,63 ppm (Figura 18). Em relação aos hidrogênios do anel quinolina, o sinal em  $\delta$  7,74 ppm possui duas correlações com os hidrogênios em  $\delta$  7,83 e 8,27 ppm, verificando-se também que os sinais em  $\delta$  7,83 e 8,27 ppm possuem correlação com o sinal em  $\delta$  7,74 ppm. O hidrogênio apresentado em  $\delta$  7,83 também acopla com o hidrogênio em  $\delta$  8,10 ppm, o mesmo acontece de forma contrária. Por último, os hidrogênios em  $\delta$  8,36 e 8,97 ppm se correlacionam entre si, também mostrando acoplamento (Figura 18).

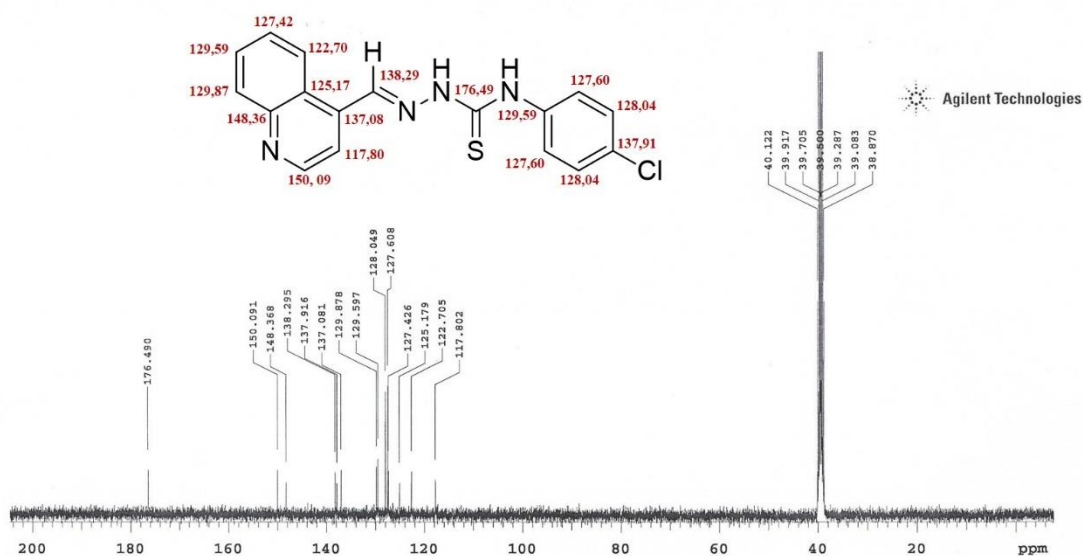
Os hidrogênios que apresentaram o sinal singlete não possuem acoplamentos com outros hidrogênios, por isso, não é possível visualizar nenhuma correlação.

**Figura 18** – Espectro de COSY mostrando as correlações entre os hidrogênios do derivado LqIT-JF-88.

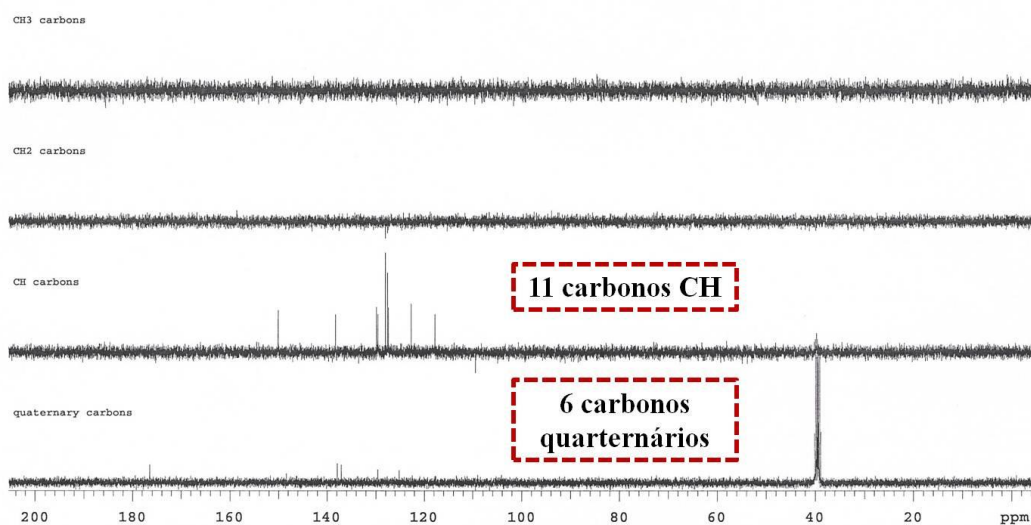


Também é possível comprovar estruturalmente por meio da análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT. Na figura 19, é possível constatar a presença de 17 carbonos a partir de  $\delta$  177,80 ppm na estrutura do composto LqIT/JF-88. Destes, dois sinais em  $\delta$  138,29 ppm e  $\delta$  176,49 ppm referentes aos carbonos  $\text{HC}=\text{N}$  e  $\text{C}=\text{S}$ , respectivamente, evidenciam a formação da porção tiossemicarbazona. Os demais sinais encontrados pertencem à carbonos quaternários e primários dos anéis quinolina e fenil, confirmados pelo espectro de DEPT (Figura 20).

**Figura 19** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado LqIT/JF-88.

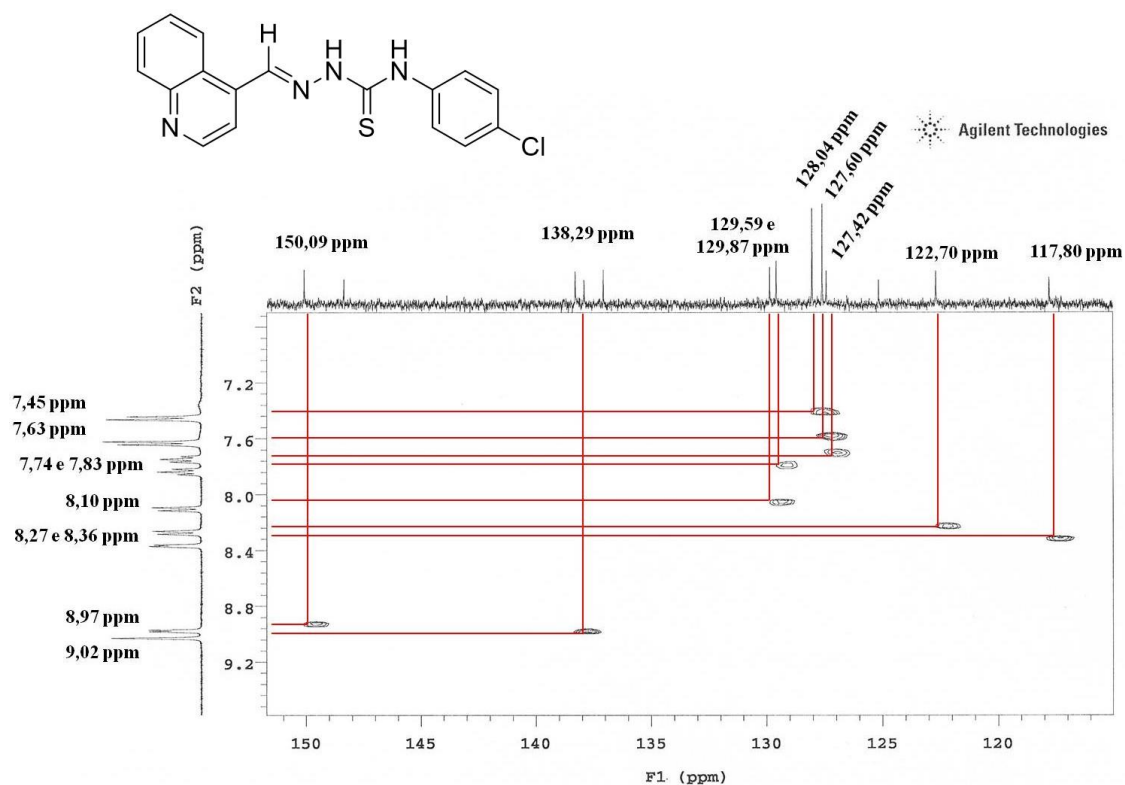


**Figura 20** – Espectro de DEPT do derivado LqIT/JF-88.



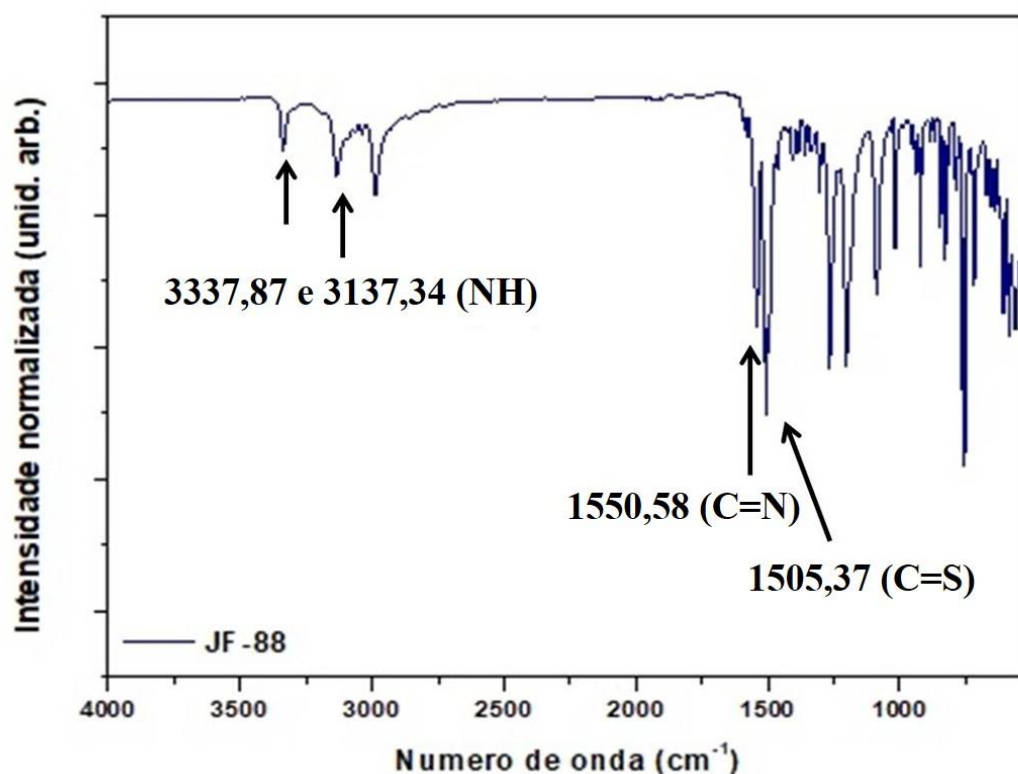
A atribuição de todos os carbonos com seus respectivos hidrogênios foi realizada através da análise dos espectros de HSQC, onde foi possível verificar ligações entre carbonos e hidrogênios  $^1J$  (KAISER, 2000). Os carbonos presentes no anel quinolina em  $\delta$  117,80, 122,70, 127,42, 129,59, 129,87 e 150,09 ppm estão diretamente ligados aos hidrogênios apresentados nos sinais em  $\delta$  8,36, 8,27, 7,74, 7,83, 8,10 e 8,97 ppm, respectivamente. Já os carbonos que estão no anel fenil em  $\delta$  127,60 e 128,04 ppm acoplam em  $^1J$  com os hidrogênios  $\delta$  7,63 e 7,45 ppm, respectivamente. Dessa maneira, o carbono na porção HC=N, em  $\delta$  138,29 ppm está exatamente ligado ao hidrogênio com sinal em  $\delta$  9,02 ppm (Figura 21).

**Figura 21** – Espectro de HSQC do composto LqIT/JF-88 evidenciando as correlações entre carbono-hidrogênio  $^1J$ .



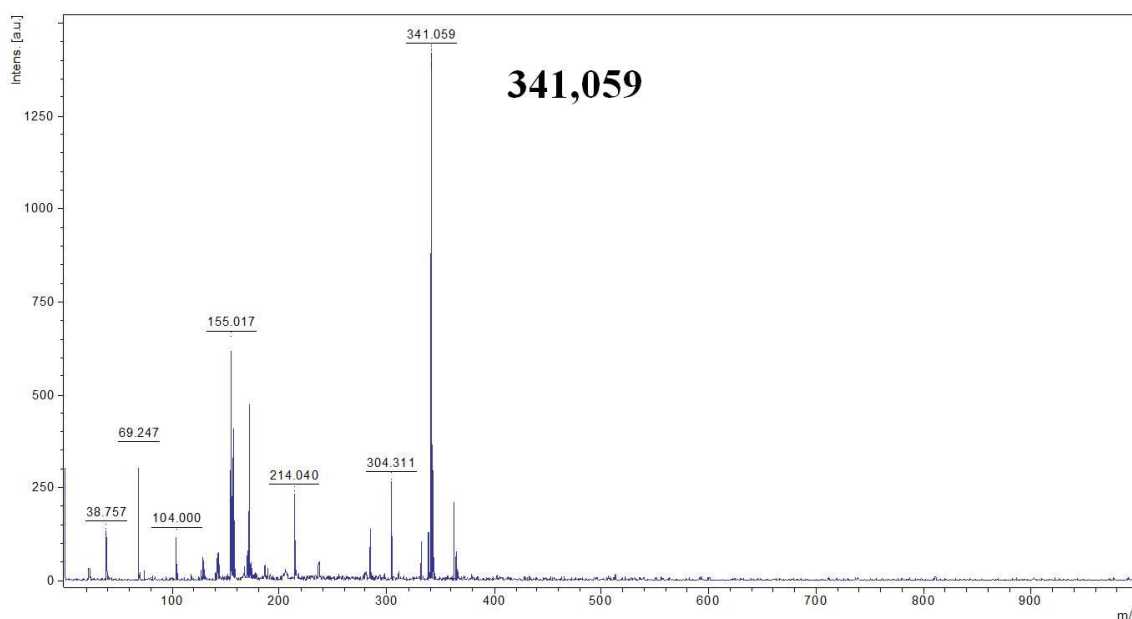
Complementando a caracterização, análises por meio de espectros de infravermelho foram realizadas, encontrando-se bandas de absorção características dos grupos funcionais presentes nos compostos analisados. No espectro de IV do derivado LqIT/JF-88 (Figura 22), foram observadas bandas de absorção referentes aos grupos NH em 3337,87 e 3137,34  $\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se, ainda, a existência de bandas em 1550,58 e 1505,37  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas, respectivamente, aos grupos C=N e C=S.

**Figura 22** – Espectro de infravermelho (IV) do derivado LqIT/JF-88.



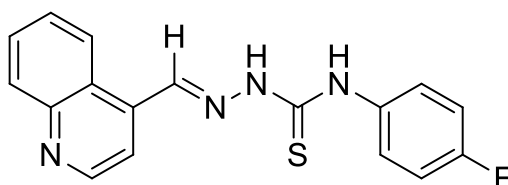
Para finalizar a elucidação estrutural do derivado LqIT/JF-88, foi ainda utilizada a espectrometria de massas para encontrar sua massa molecular. O software ChemDraw Ultra 12.0 foi empregado inicialmente a fim de encontrar a massa molecular teórica, sendo gerado um valor de 341,0583 g/mol. Este resultado foi confirmado após o composto ser submetido a uma análise através da técnica de ionização de amostras (espectrômetro MALDI-TOF). Foram evidenciados picos referentes aos íons moleculares do derivado analisado numa razão massa/carga ( $m/z$ ), porém, o principal pico encontrado foi no valor de 341,059 g/mol, demonstrando que o composto LqIT/JF-88 foi efetivamente obtido como inicialmente planejado (Figura 23).

**Figura 23** – Espectro de massas do composto LqIT/JF-88 com seu respectivo pico do íon molecular.



#### 5.1.4 Dados espectroscópicos, espectrométricos e físico químicos dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas

*N*-(4-flúorfenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoioamida (LqIT/JF-85)



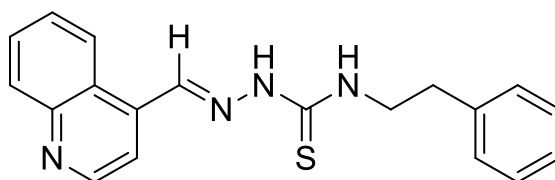
**C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>4</sub>S**. **Rendimento:** 84,31%. **Faixa de fusão:** 186-187°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,47 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 7.23 (t, *J* = 8.8Hz, 2H, CH phenyl), 7.58 (dd, *J* = 5,2/4,8 Hz, 2H, CH fenil), 7.73 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 7.82 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,27 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,36 (d, *J* = 4 Hz, 1H, CH quinolina) 8,97 (d, *J* = 4 Hz, 1H, CH quinolina), 9,02 (s, 1H, HC=N), 10,35 (s, 1H, NH), 12,10 ppm (s, 1H,NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 117,71 (CH quinolina), 122,67 (CH quinolina), 125,17 (Cq quinolina), 127,37 (CH quinolina), 128,20 (fenil), 129,53 (CH quinolina),

129,85 (CH quinolina), 135,25 (fenil), 137,12 (Cq quinolina), 138,01 (HC=N), 148,36 (Cq quinolina), 150,05 (CH quinolina), 158,58 (fenil), 160,99 (fenil), 176,82 ppm (C=S).  
**MS [M + 1]:** calculado: 325,0879; encontrado: 325,0907.

*N*-fenetil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoioamida (LqIT/JF-86)



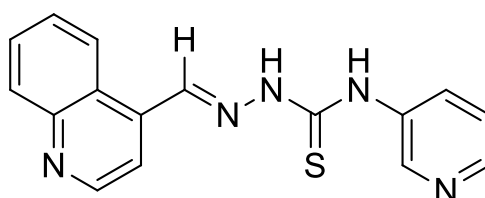
**C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>S.** **Rendimento:** 77,57%. **Faixa de fusão:** 192-194°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 2,95 (t, *J* = 8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,23 (t, *J* = 7 Hz, 1H, CH fenil), 7,31 (m, 4H, CH fenil), 7,72 (t, 7,6 Hz, 1H, CH quinolina), 7,82 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,09 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,13 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,24 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,79 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, NH), 11,79 ppm (s, 1H, NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 34,65 (CH<sub>2</sub>), 45,16 (CH<sub>2</sub>), 117,50 (CH quinolina), 122,81 (CH quinolina), 125,03 (Cq quinolina), 126,18 (CH fenil), 127,35 (CH quinolina), 128,43 (CH fenil), 128,57 (CH fenil), 129,55 (CH quinolina), 129,82 (CH quinolina), 137,21 (HC=N), 137,36 (Cq quinolina), 139,12 (Cq fenil), 148,36 (Cq quinolina), 150,03 (CH quinolina), 177,23 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 335,1286; encontrado: 335,130.

*N*-(piridin-3-il)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoioamida (LqIT/JF-87)



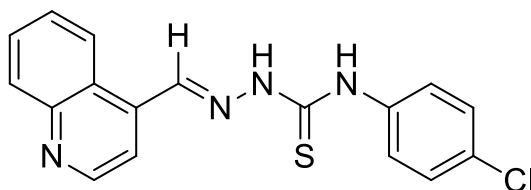
**C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>S.** **Rendimento:** 80,92%. **Faixa de fusão:** 216-218°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,55 (Clorofórmio 100%).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 7,44 (dd,  $J$  = 4,8/8,0 Hz, 1H, CH fenil), 7,74 (d,  $J$  = 7,6/8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 7,83 (dd,  $J$  = 7,2/8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,01 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, CH fenil), 8,11 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,31 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,34 (d,  $J$  = 3,6, 1H, CH quinolina), 8,41 (d,  $J$  = 4,4 Hz, 1H, CH fenil), 8,70 (s, 1H), 8,97 (d,  $J$  = 4,8, 1H, CH quinolina), 9,02 (s, 1H, HC=N), 10,54 (s, 1H, NH), 12,20 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 117,96 (CH quinolina), 122,92 (CH quinolina), 123,18 (CH fenil), 125,29 (Cq quinolina), 127,60 (CH quinolina), 129,78 (CH quinolina), 129,92 (CH quinolina), 133,79 (CH fenil), 135,88 (Cq fenil), 137,23 (Cq quinolina), 138,78 (HC=N), 146,44 (CH fenil), 147,40 (CH fenil), 148,44 (Cq quinolina), 150,20 (CH quinolina), 177,28 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 308,0925; encontrado: 308,094.

*N*-(4-clorofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-88)



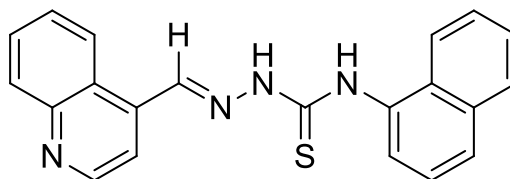
**C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>S. Rendimento:** 67,85%. **Faixa de fusão:** 194-196°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,48 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 7,45 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 2H, CH fenil), 7,63 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 2H, CH fenil), 7,74 (dd,  $J$  = 7,2/8 Hz, 1H, CH quinolina), 7,83 (dd,  $J$  = 7,2/8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,10 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,27 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,36 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,97 (d,  $J$  = 4 Hz, 1H, CH quinolina), 9,02 (s, 1H, HC=N), 10,38 (s, 1H, NH), 12,14 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 117,80 (CH quinolina), 122,70 (CH quinolina), 125,17 (Cq quinolina), 127,42 (CH quinolina), 127,60 (CH fenil), 128,04 (CH fenil), 129,59 (Cq fenil), 129,59 (CH quinolina), 129,87 (CH quinolina), 137,08 (Cq quinolina), 137,91 (Cq fenil), 138,29 (HC=N), 148,36 (Cq quinolina), 150,09 (CH quinolina), 176,49 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 341,0583; encontrado: 341,059.

*N*-(naftalen-1-il)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-89)



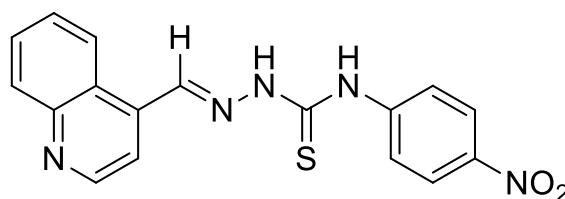
**C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S.** **Rendimento:** 73,49%. **Faixa de fusão:** 200-202°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,56 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 7,56 (m, 4H, CH naftil), 7,75 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 7,84 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 7,90 (m, 2H, CH naftil), 8,00 (m, 1H, CH naftil), 8,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,32 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,43 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,95 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, CH quinolina), 9,08 (s, 1H, HC=N) 10,66 (s, 1H, NH), 12,18 ppm (s, 1H, NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 117,76 (CH quinolina), 122,74 (CH quinolina), 123,30 (naftil), 125,20 (Cq quinolina), 125,43 (CH naftil), 126,06 (CH naftil), 126,14 (CH naftil), 126,40 (CH naftil), 127,07 (CH naftil), 127,36 (CH quinolina), 128,01 (CH naftil), 129,52 (CH quinolina), 129,87 (CH quinolina), 130,45 (Cq naftil), 133,70 (Cq naftil), 135,54 (Cq naftil), 137,26 (Cq quinolina), 137,79 (HC=N), 148,39 (Cq quinolina), 150,09 (CH quinolina), 178,22 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 357,1129; encontrado: 357,112.

*N*-(4-nitrofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-90)



**C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.** **Rendimento:** 82,21%. **Faixa de fusão:** 225-227°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,42 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

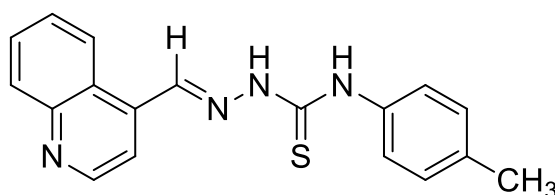
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 7,74 (t, *J* = 7,2/8 Hz, 1H, CH quinolina), 7,83 (t, *J* = 7,2/8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,07 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH fenil), 8,11 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,27 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH fenil), 8,28 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH

quinolina), 8,34 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H, CH quinolina), 9,0 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H, CH quinolina), 9,05 (s, 1H, HC=N), 10,65 (s, 1H, NH), 12,40 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 118,03$  (CH quinolina), 122,75 (CH quinolina), 123,77 (fenil), 124,68 (fenil), 125,16 (Cq quinolina), 127,49 (CH quinolina), 129,62 (CH quinolina), 129,89 (CH quinolina), 136,87 (Cq quinolina), 139,32 (HC=N), 143,68 (fenil), 145,20 (fenil), 148,36 (Cq quinolina), 150,11 (CH quinolina), 175,92 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 352,0824; encontrado 352,083.

2-(quinolin-4-ilmetileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-91)



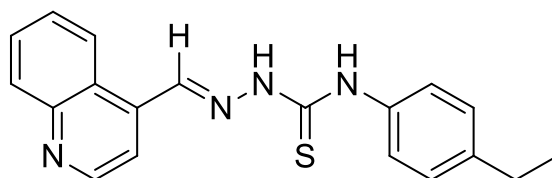
**C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S. Rendimento:** 78,41%. **Faixa de fusão:** 197-199°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,51 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 2,32$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,19 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, CH fenil), 7,44 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, CH fenil), 7,74 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, CH quinolina), 7,83 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H, CH quinolina), 8,09 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, CH quinolina), 8,26 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H, CH quinolina), 8,39 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H, CH quinolina), 8,96 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H, CH quinolina), 9,01 (s, 1H, HC=N), 10,28 (s, 1H, NH), 12,02 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 20,58$  (CH<sub>3</sub>), 117,71 (CH quinolina), 122,67 (CH quinolina), 125,17 (Cq quinolina), 125,92 (CH fenil), 127,36 (CH quinolina), 128,59 (CH fenil), 129,53 (CH quinolina), 134,76 (Cq fenil), 136,36 (Cq fenil), 137,18 (Cq quinolina), 137,71 (HC=N), 148,37 (Cq quinolina), 150,09 (CH quinolina), 176,50 (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 321,1129; encontrado: 321,113.

*N*-(4-etilfenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-92)



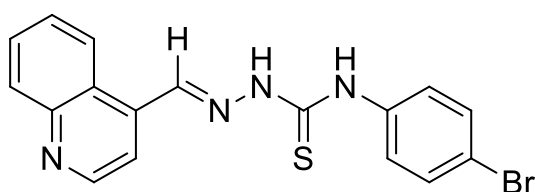
**C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>S.** **Rendimento:** 69,99%. **Faixa de fusão:** 200-202°C. **Fator de retenção (Rf):** 0,59 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 1,2 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,63 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,23 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH fenil), 7,47 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH fenil), 7,73 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH quinolina), 7,82 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH quinolina), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,27 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,37 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,96 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, CH quinolina), 9,02 (s, 1H, HC=N), 10,28 (s, 1H, NH), 12,04 ppm (s, 1H, NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 15,65 (CH<sub>3</sub>), 27,71 (CH<sub>2</sub>), 117,72 (CH quinolina), 122,67 (CH quinolina), 125,17 (Cq quinolina), 125,95 (CH fenil), 127,36 (CH quinolina), 127,40 (CH fenil), 129,52 (CH quinolina), 129,86 (CH quinolina), 136,54 (Cq fenil), 137,18 (Cq quinolina), 137,73 (HC=N), 141,14 (Cq fenil), 148,36 (Cq quinolina), 150,06 (CH quinolina), 176,44 ppm (C=S).

**MS [M + 1]: calculado:** 335,1286; encontrado: 335,131.

*N*-(4-bromofenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-93)



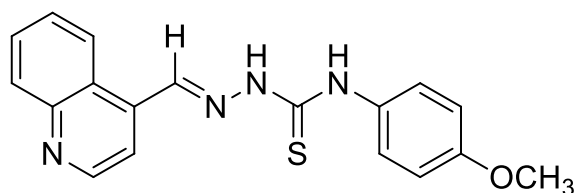
**C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>4</sub>S.** **Rendimento:** 91,02%. **Faixa de fusão:** 209-211°C. **Fator de retenção (Rf):** 0,45 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 7,58 (s, 4H, CH fenil), 7,74 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, CH quinolina), 7,81 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,11 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,26 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 8,35 (s, 1H, CH quinolina), 8,97 (s, 1H, CH quinolina), 9,03 (s, 1H, HC=N), 10,37 (s, 1H, NH), 12,15 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 117,78 (fenil), 117,83 (CH quinolina), 122,68 (CH quinolina), 125,96 (Cq quinolina), 127,39 (CH quinolina), 127,88 (fenil), 129,55 (Cq quinolina), 129,86 (CH quinolina), 130,95 (fenil), 137,05 (Cq quinolina), 138,30 (HC=N), 138,33 (fenil), 148,36 (Cq quinolina), 150,06 (CH quinolina), 176,38 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 385,0078; encontrado: 385,013.

*N*-(4-metoxifenil)-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-94)



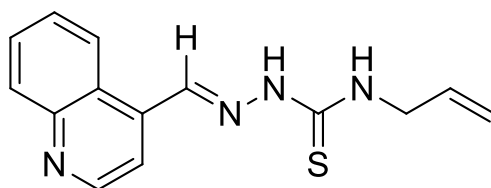
**C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OS. Rendimento:** 79,68%. **Faixa de fusão:** 203-205°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,40 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 3,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,95 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H, CH fenil), 7,43 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, CH fenil), 7,73 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 1H, CH quinolina), 7,82 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 1H, CH quinolina), 8,10 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,27 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,37 (d,  $J$  = 4,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,96 (d,  $J$  = 4,8 Hz, 1H, CH quinolina), 9,01 (s, 1H, HC=N), 10,25 (s, 1H, NH), 12,00 ppm (s, 1H, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 55,23 (CH<sub>3</sub>), 113,35 (fenil), 117,68 (CH quinolina), 122,68 (CH quinolina), 125,18 (Cq quinolina), 127,35 (CH quinolina), 127,62 (fenil), 129,53 (CH quinolina), 129,86 (CH quinolina), 131,79 (fenil), 137,22 (Cq quinolina), 137,60 (HC=N), 148,36 (Cq quinolina), 150,06 (CH quinolina), 157,11 (fenil), 176,78 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 337,1078; encontrado: 337,108.

*N*-alil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida (LqIT/JF-95)



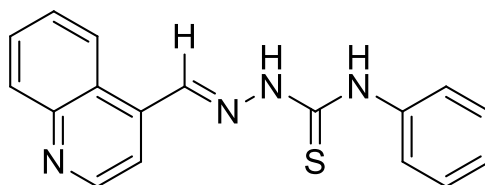
**C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>S. Rendimento:** 78,50%. **Faixa de fusão:** 199-200°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,54 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 4,27 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,12 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=C), 5,20 (d, *J* = 17,6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>=C), 5,93 (m, 1H, HC=C), 7,71 (t, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 7,81 (t, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,08 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,24 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,24 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinolina), 8,93 (s, 2H, HC=N/NH), 8,95 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, CH quinolina), 11,80 ppm (s, 1H, NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 45,91 (CH<sub>2</sub>), 115,62 (CH<sub>2</sub>), 117,44 (CH quinolina), 122,69 (CH quinolina), 125,08 (Cq quinolina), 127,29 (CH quinolina), 129,50 (CH quinolina), 129,82 (CH quinolina), 134,75 (HC=C), 137,18 (Cq quinolina), 137,33 (CH HC=N), 148,35 (Cq quinolina), 150,01 (CH quinolina), 177,49 ppm (Cq C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 271,0973; encontrado: 271,115.

*N*-fenil-2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (LqIT/JF-96)



**C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>S. Rendimento:** 65,70%. **Faixa de fusão:** 200-201°C. **Fator de retenção (R<sub>f</sub>):** 0,41 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 7,24 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH fenil), 7,40 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH fenil), 7,59 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH fenil), 7,74 (T, *J* = 7,2/8,0 Hz, 1H, CH quinolina), 7,83 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,10 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H CH quinolina), 8,28 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH quinolina), 8,37 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, CH quinolina), 8,97 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, CH quinolina), 9,02 (s, 1H, HC=N), 10,33 (s, 1H, NH), 12,06 ppm (s, 1H, NH).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 117,74 (CH quinolina), 122,67 (CH quinolina), 125,14 (Cq quinolina), 125,52 (CH fenil), 125,88 (CH fenil), 127,33 (CH quinolina), 128,08 (CH fenil), 129,49 (CH quinolina), 129,83 (CH quinolina), 137,11 (Cq quinolina), 137,92 (HC=N), 138,89 (Cq fenil), 148,34 (Cq quinolina), 150,04 (CH quinolina), 176,44 ppm (C=S).

**MS [M + 1]:** calculado: 307,0973; encontrado: 307,0950.

## 5.2 ENSAIO DE INTERAÇÃO

Nos tópicos seguintes serão apresentados os resultados dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas com o ctDNA e a proteína albumina por meio das espectroscopias de absorção, fluorescência e DC.

### 5.2.1 Estudos de ligação com o ctDNA

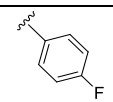
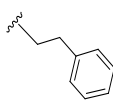
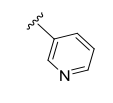
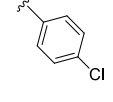
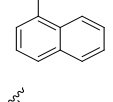
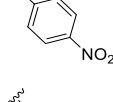
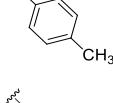
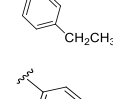
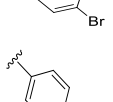
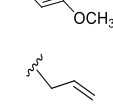
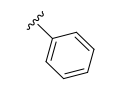
#### 5.2.1.1 Espectroscopia de absorção eletrônica

Na espectroscopia de absorção foi observado que todos os derivados LqIT/JFs livres apresentaram absorção na faixa entre 300 e 450 nm. Este resultado corrobora com os já obtidos na literatura, onde derivados que contém o núcleo quinolina possuem este perfil espectral (HALDER; DEY; ROY, 2015; KUMAR et al. 2015).

Na análise destes compostos, com quantidades crescentes do ctDNA (0-100  $\mu$ M), foi observada absorção intensa na mesma região que os derivados LqIT/JFs livres (entre 300 e 420 nm). Porém, mudanças nas propriedades espectroscópicas dos derivados após a interação com o ctDNA foram observadas, tais como efeitos hipercrômicos ou hipocrômicos com desvios para a região do vermelho ou do azul (efeitos batocrômico ou hipsocrômico, respectivamente). Estes resultados podem significar interações com a dupla hélice do ctDNA (OZLUER; KARA, 2014).

Os comprimentos de onda de máxima absorção e outros dados espectroscópicos estão presentes na tabela 1.

**Tabela 1** – Dados espectroscópicos de absorção UV-vis dos derivados LqIT/JFs na presença e ausência do ctDNA.

| Composto                                                                            |              | $\lambda_{\text{max}}$<br>livre<br>(nm) | $\lambda_{\text{max}}$<br>ligado<br>(nm) | $\Delta\lambda$<br>(nm) | Hipercr.<br>(%) <sup>a</sup> | Hipocr.<br>(%) <sup>b</sup> | Kb M <sup>-1</sup>     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------|
|    | <b>JF-85</b> | 342                                     | 342                                      | 0                       | 13,79                        | –                           | 2,37 x 10 <sup>5</sup> |
|    | <b>JF-86</b> | 345                                     | 345                                      | 0                       | –                            | 49,39                       | 8,30 x 10 <sup>3</sup> |
|    | <b>JF-87</b> | 343                                     | 343                                      | 0                       | –                            | 20,27                       | 1,96 x 10 <sup>5</sup> |
|    | <b>JF-88</b> | 344                                     | 343                                      | 1                       | –                            | 7,27                        | 5,58 x 10 <sup>4</sup> |
|    | <b>JF-89</b> | 349                                     | 349                                      | 0                       | 12,18                        | –                           | 1,44 x 10 <sup>5</sup> |
|   | <b>JF-90</b> | 349                                     | 348                                      | 1                       | –                            | 9,48                        | 4,24 x 10 <sup>5</sup> |
|  | <b>JF-91</b> | 349                                     | 350                                      | 1                       | 19,16                        | –                           | 3,56 x 10 <sup>5</sup> |
|  | <b>JF-92</b> | 352                                     | 365                                      | 13                      | 38,69                        | –                           | 1,62 x 10 <sup>6</sup> |
|  | <b>JF-93</b> | 352                                     | 347                                      | 5                       | –                            | 6,23                        | 7,44 x 10 <sup>4</sup> |
|  | <b>JF-94</b> | 344                                     | 343                                      | 1                       | 58,33                        | –                           | 1,33 x 10 <sup>5</sup> |
|  | <b>JF-95</b> | 340                                     | 341                                      | 1                       | 10,01                        | –                           | 3,98 x 10 <sup>4</sup> |
|  | <b>JF-96</b> | 344                                     | 344                                      | 0                       | –                            | 450,72                      | 3,50 x 10 <sup>4</sup> |

<sup>a</sup>Hipercromismo resultante da formação de complexo entre os derivados LqIT/JFs e 100 µM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

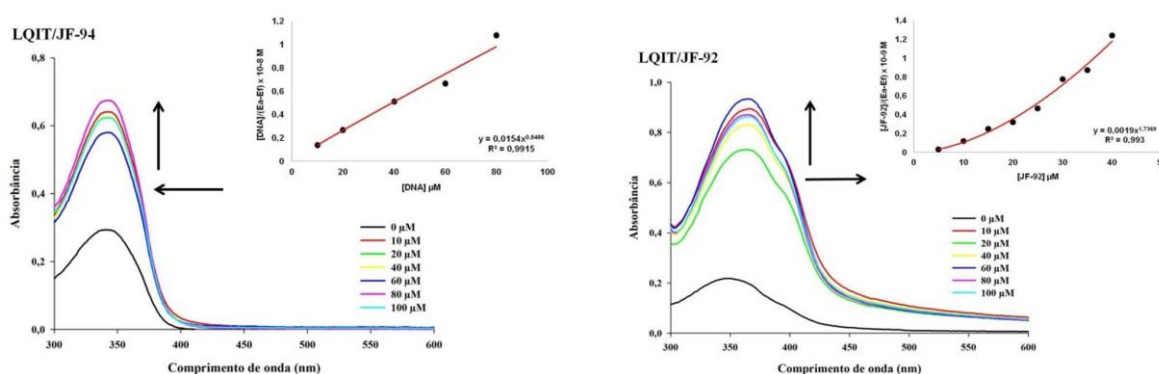
<sup>b</sup>Hipocromismo resultante da formação de complexo entre os derivados LqIT/JFs e 100 µM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

A interação entre o ctDNA e os derivados LqIT/JF's 85, 89, 91, 92, 94 e 95 foi evidenciada por meio de um efeito hipercrômico (aumento da absorção de luz dos compostos) com concentração crescente do ctDNA em solução, devido à modificação da estrutura da dupla hélice, resultando em maior exposição dos elétrons dos compostos e redução do empilhamento dos mesmos. Isto pode indicar, assim, modos de ligação parcial ou não intercalativo como, por exemplo, ligações nos sulcos (ARSHAD et al. 2017; GUP; GOKÇE; DILEK, 2015). O maior efeito hipercrômico foi para o LqIT/JF-94 (*p*-metóxi) (Figura 24), com 58,33%, demonstrando que o forte efeito doador de elétrons do grupamento metoxi é importante na interação da molécula com o DNA (MOHAMADI et al. 2017).

Outra evidência da interação composto-DNA é a mudança dos máximos de absorção para a região do azul no composto LqIT/JF-94 (*p*-metóxi) ( $\Delta\lambda = 1$  nm) e variação para o vermelho nos derivados LqIT/JF-91 (*p*-metil), LqIT/JF-92 (*p*-etil), e LqIT/JF-95 (alil). A maior mudança batocrômica foi visualizada para o LqIT/JF-92 (*p*-etil) ( $\Delta\lambda = 13$  nm) (Figura 24), provavelmente devido à conjugação das ligações, provocando absorção de luz em comprimentos de onda maiores (AGARWAL; JANGIR; MEHROTRA, 2013; MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

**Figura 24** – Espectros de absorção do LqIT/JF-94 e LqIT/JF-92 na presença de quantidades crescentes de ctDNA.

[DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu$ M. As setas ( $\uparrow$ ), ( $\leftarrow$ ) e ( $\rightarrow$ ) são referentes aos efeitos hipercrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de [DNA]/(E<sub>a</sub> - E<sub>f</sub>) em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Fonte: Próprio autor.

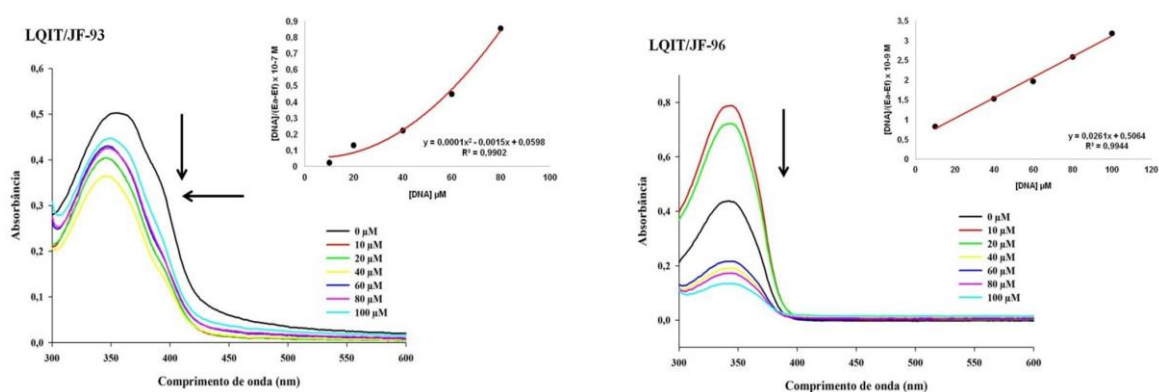
Na presença do ctDNA, os compostos LqIT/JFs 86, 87, 88, 90, 93 e 96 mostraram efeitos hipsocrômicos (diminuição da absorção de luz), podendo ser atribuída à intercalação ao ctDNA envolvendo uma interação de empilhamento de elétrons  $\pi$  entre o cromóforo aromático (anéis aromáticos presentes nas estruturas dos ligantes) e os pares

de bases do DNA (AGARWAL; JANGIR; MEHROTRA, 2013; LIU et al. 2015; NARVA et al. 2016; OZLUER; KARA, 2014).

O maior efeito hipocrômico foi oriundo do LqIT/JF-96 (não substituído) (Figura 25), podendo ser atribuído à estabilização dos elétrons do anel aromático. Este fenômeno ocorre devido ao fenil não substituído formar um complexo mais estável com o DNA. Foi observado também ligeiros desvios hipsocrômicos para os derivados LqIT/JF-88 (*p*-cloro), LqIT/JF-90 (*p*-nitro) com maior desvio para o LqIT/JF-93 (*p*-bromo) ( $\Delta\lambda = 5$  nm) (Figura 25).

**Figura 25** – Espectros de absorção dos derivados LqIT/JF-93 e LqIT/JF-96, na presença de quantidades crescentes do ctDNA.

[DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu$ M. As setas ( $\downarrow$ ) e ( $\leftarrow$ ) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e hipsocrômico dos derivados. Inserção: correspondente ao gráfico de  $[DNA]/(E_a - E_f)$  em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Fonte: Próprio autor.

A constante de ligação intrínseca composto-ctDNA ( $K_b$ ) foi calculada com o intuito de quantificar a força de ligação dos derivados com o ctDNA, a partir das alterações nas absorbâncias com o aumento das concentrações de ctDNA (MCGHEE e VON HIPEEL, 1974). As constantes de ligação dos derivados estudados apresentaram-se entre  $10^3$  e  $10^6$  onde, maiores valores das magnitudes significam uma melhor afinidade de ligação com o DNA. A ordem crescente dos valores de  $K_b$  para os derivados LqIT/JFs é  $86 < 96 < 95 < 88 < 93 < 94 < 89 < 87 < 85 < 91 < 90 < 92$ , supondo que a *para*-substituição do anel aromático favorece a atividade de ligação, possibilitando interações fracas, mas que em conjunto contribuem para a ligação composto-DNA.

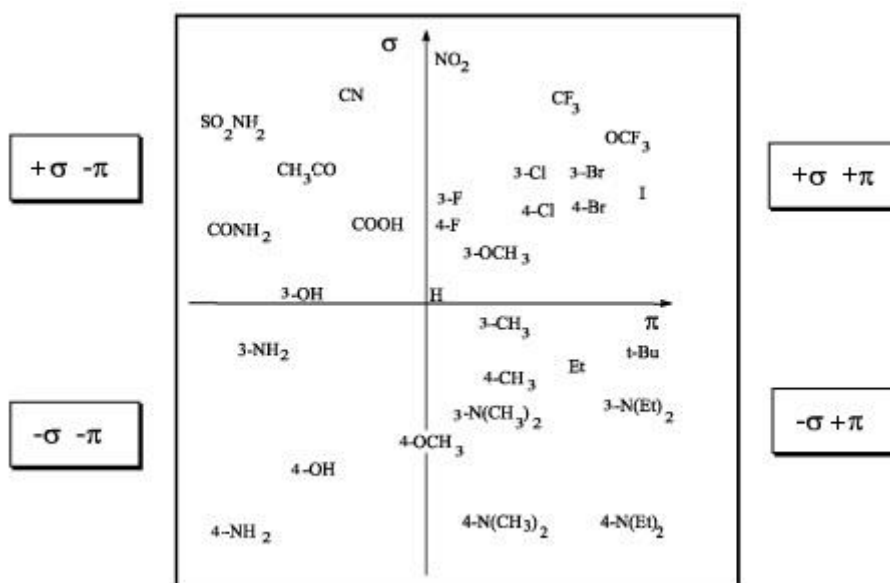
Constatamos a importância dos substituintes através da análise do LqIT/JF-96 (não substituído), pois este derivado apresentou o segundo menor valor da constante de ligação por possuir nenhuma substituição. Porém, cada radical exerce papel diferente na

força de ligação dos compostos com o DNA devido aos diversos níveis de contribuição eletrônica. O derivado que apresentou maior valor da constante de ligação foi o LqIT/JF-92 (*p*-etil), corroborando com os resultados obtidos por Janovec e colaboradores (2011).

Ao contrário do LqIT/JF-92, o LqIT/JF-86 apresentou o menor valor de  $K_b$  mostrando que, mesmo possuindo mesmas propriedades eletrônicas e lipofílicas, a ligação direta do anel aromático à função tio amida, conforme observamos no derivado LqIT/JF-92, é importante para a melhor afinidade de ligação com o DNA. A menor contante também pode ser explicada devido à presença de um grupamento espaçador entre a tio amida e o anel fenil no eletrônicos LqIT/JF-86, podendo causar uma maior rotação nesta substituição e diferentes conformações que dificultam o processo de interação.

O Diagrama de Craig (Figura 26) pode ser aplicado nestes estudos devido à sua análise intercorrelacionada dos parâmetros físico químicos dos fármacos utilizando descritores eletrônicos ( $\sigma$ ) e lipofílicos ( $\pi$ ) (TAVARES, 2004). Foi possível verificar que substituintes na posição *para* com perfis eletrônicos menores influenciam de forma positiva nas interações com o DNA.

**Figura 26** – Diagrama de Craig com intercorrelações eletrônicas e lipofílicas em *para*-substituição aromática.



A variação na absorção de luz, observada em todos os compostos, não está relacionada com as forças de ligação com o DNA, visto que derivados que apresentaram maiores efeitos hipocrômicos e hiperocrômicos (LqIT/JF-96 e LqIT/JF-94,

respectivamente) não exibiram altos valores de  $K_b$ , devido aos efeitos eletrônicos e lipofílicos neutros ( $^0\sigma$   $^0\pi$ ).

Foi possível observar também, através desses resultados preliminares, a interferência dos efeitos eletrônicos dos substituintes presentes nos compostos avaliados nos modos de ligação ao DNA. Isso pode ser constatado através dos resultados apresentados, onde grupos que promoveram efeitos hipercrômicos como o LqIT/JF-92 (*p*-etil) ( $-\sigma$   $+\pi$ : eletrônico negativo e lipofílico positivo) e hipocrômicos como, por exemplo, o LqIT/JF-90 (*p*-nitro) ( $+\sigma$   $+\pi$ : eletrônico e lipofílico positivos) podem se ligar ao DNA através de ligações ao sulco e intercalação, respectivamente.

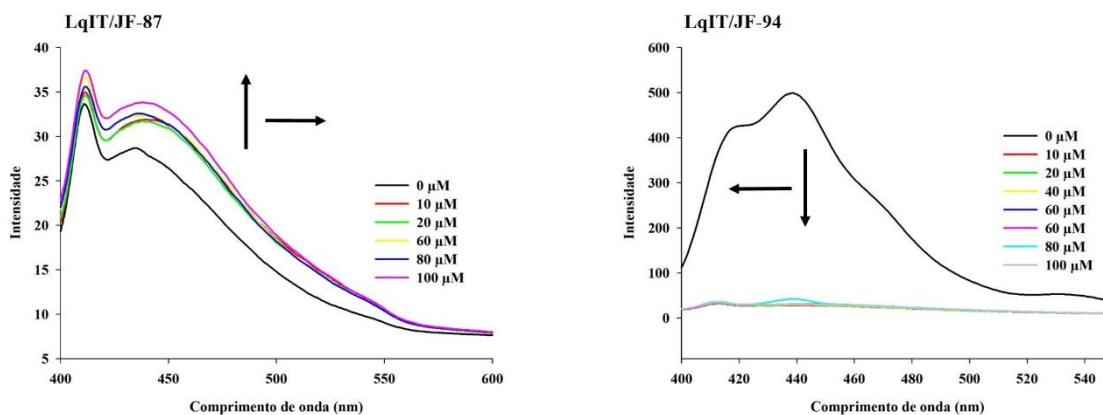
#### 5.2.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Estudos de fluorescência dos derivados LqIT/JFs também foram realizados para analisar as propriedades de ligação com o ctDNA. Todos os compostos na ausência do DNA mostraram emitir fluorescência na faixa de 400 a 550 nm, com dois picos de emissão, em concentração única de 10  $\mu$ M (Tabela 2). Na análise do complexo JFs-DNA, a emissão de fluorescência ocorreu na mesma faixa de comprimento de onda, sendo possível observar que, na maioria dos compostos analisados, houve o desaparecimento de um dos picos de emissão. Os demais dados espectroscópicos podem ser vistos na tabela 2.

Dos 12 compostos avaliados, somente o LqIT/JF-87 (3-piridil) exibiu aumento da intensidade de luz, após o contato com o DNA, podendo ser devido à diminuição da flexibilidade conformacional do composto no complexo DNA-ligante (Figura 27) (FAULHABER et al. 2011) e foi o derivado que menos sofreu efeito de supressão. Isto pode ser explicado devido à presença do N no anel fenil com pares de elétrons livres, influenciando, assim, no hipercromismo. Os 11 compostos restantes apresentaram supressão da fluorescência na presença de quantidades crescentes do ctDNA. Esta diminuição também é um indicativo de interação entre os derivados e o DNA (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007). O composto que apresentou maior efeito hipocrômico foi o LqIT/JF-94 (*p*-metoxi) (conforme visto também na espectroscopia de absorção) com diminuição de 11,64 vezes (Figura 27).

**Figura 27** – Espectros de fluorescência dos derivados LqIT/JF-87 e 94.

[DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ . As setas ( $\uparrow$ ), ( $\downarrow$ ), ( $\leftarrow$ ) e ( $\rightarrow$ ) são referentes aos efeitos hipercrômico, hipocrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

A ordem crescente dos efeitos hipocrômicos para os derivados é: 89<88<91<85<96<92<86<93<95<90<94, mostrando que as menores propriedades lipofílicas de cada composto podem influenciar no maior hipocromismo. Após a formação do complexo ligante-ctDNA, houve mudanças dos máximos de emissão de todos os compostos, tanto para a região do azul como para a região do vermelho no espectro.

Apesar dos compostos apresentarem diferentes graus de hipocromismo, a semelhança de seus perfis de fluorescência na presença do ctDNA pode sugerir que o modo de interação entre estes ligantes e o DNA é semelhante. Verificaremos estes resultados nos estudos de DC discutidos a seguir.

**Tabela 2** – Dados espectroscópicos de emissão dos derivados LqIT/JFs na presença e ausência do ctDNA.

| <b>Composto</b> | <b><math>\lambda^{\max}</math> livre<br/>(nm)</b> | <b><math>\lambda^{\max}</math> ligado<br/>(nm)</b> | <b><math>\lambda^{\text{Exc}}</math><br/>(nm)</b> | <b><math>\lambda^{\text{Emi}}</math><br/>(nm)</b> | <b>Bandas (nm)<br/>Exc_Emi</b> | <b>Hipercr.<sup>a</sup></b> | <b>Hipocr.<sup>b</sup></b> | <b>Ksv M<sup>-1</sup></b> |
|-----------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>JF-85</b>    | 406_428                                           | 421                                                | 362                                               | 436                                               | 5                              | –                           | 3,44x                      | –                         |
| <b>JF-86</b>    | 417_438                                           | 415_440                                            | 363                                               | 436                                               | 5                              | –                           | 5,53x                      | –                         |
| <b>JF-87</b>    | 411_434                                           | 411_440                                            | 360                                               | 435                                               | 5                              | 0,89x                       | –                          | –                         |
| <b>JF-88</b>    | 427_448                                           | 415                                                | 363                                               | 437                                               | 5                              | –                           | 1,88x                      | –                         |
| <b>JF-89</b>    | 416_438                                           | 415                                                | 363                                               | 437                                               | 5                              | –                           | 1,67                       | –                         |
| <b>JF-90</b>    | 419_439                                           | 414                                                | 362                                               | 438                                               | 5                              | –                           | 7,69x                      | –                         |
| <b>JF-91</b>    | 417_439                                           | 413                                                | 362                                               | 439                                               | 5                              | –                           | 2,77x                      | –                         |
| <b>JF-92</b>    | 420_439                                           | 413                                                | 362                                               | 439                                               | 5                              | –                           | 4,65x                      | –                         |
| <b>JF-93</b>    | 410_429                                           | 409                                                | 359                                               | 439                                               | 5                              | –                           | 6,06x                      | –                         |
| <b>JF-94</b>    | 418_438                                           | 412                                                | 362                                               | 438                                               | 5                              | –                           | 11,64x                     | –                         |
| <b>JF-95</b>    | 419_439                                           | 426                                                | 372                                               | 438                                               | 5                              | –                           | 6,64x                      | –                         |
| <b>JF-96</b>    | 417_438                                           | 414                                                | 362                                               | 436                                               | 5                              | –                           | 3,72x                      | –                         |

<sup>a</sup>Hipercromismo resultante da formação de complexo entre 10  $\mu\text{M}$  dos derivados LqIT/JFs e 100  $\mu\text{M}$  de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

<sup>b</sup>Hipocromismo resultante da formação de complexo entre 10  $\mu\text{M}$  dos derivados LqIT/JFs e 100  $\mu\text{M}$  de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

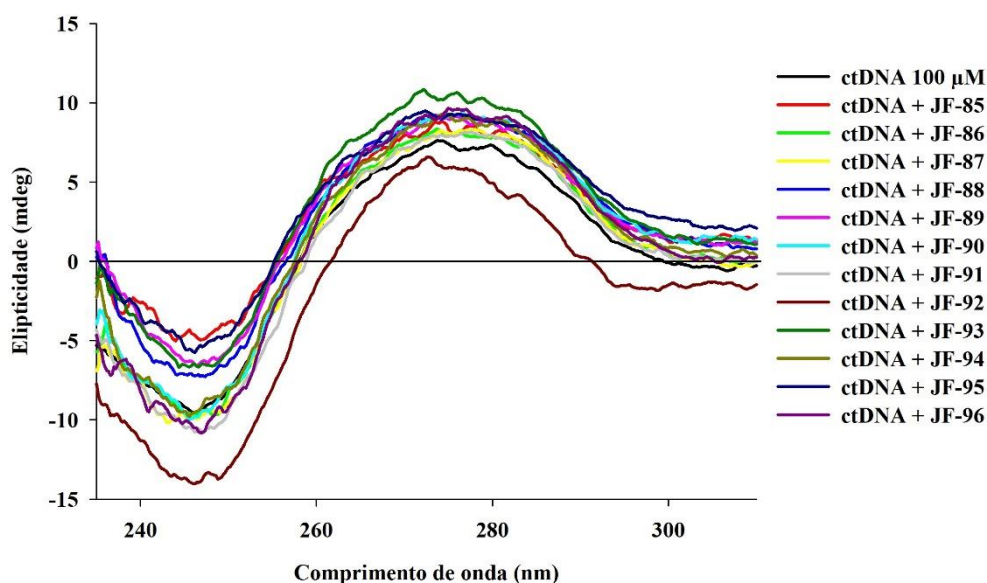
### 5.2.1.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

O DC foi utilizado para averiguar mudanças na estrutura secundária do ctDNA na presença dos derivados LqIT/JFs. Estas alterações são capazes de informar os modos de interação entre DNA e os ligantes (KARAMI et al. 2017; LAFAYETTE et al. 2013). De acordo com a figura 28, a presença de bandas positivas e negativas em 274 e 245 nm, respectivamente, do ctDNA (preto) caracteriza sua conformação B direita (KARAMI et al. 2017; SHANKARAIAH et al. 2016).

Após a incubação de todos os compostos nas mesmas concentrações, foram observadas alterações espectrais que confirmam o evento de ligação com o ctDNA (Figura 28) (GAÁL et al. 2016).

**Figura 28** – Espectro de DC do ctDNA na ausência e presença dos derivados LqIT/JFs.

[DNA] = 100  $\mu$ M. [LqIT/JFs] = 30  $\mu$ M.



Fonte: Próprio autor.

A alteração espectral do ctDNA mais pronunciada ocorreu na presença do derivado LqIT/JF-92, ocasionando na diminuição das bandas positivas e negativas. O decréscimo da banda negativa, à 245 nm, está relacionado à diminuição da elipticidade e, consequentemente, ao desenrolamento da dupla hélice do DNA, enquanto a redução da banda positiva está associada ao enfraquecimento do empilhamento de bases e transição para uma estrutura mais desnaturada, podendo resultar uma interação por intercalação

(LAFAYETTE et al. 2013; SHAHABADI; MOGHADAM, 2012). Não foram observados desvios batocrômico ou hipsocrômico, indicando a não mudança significativa na conformação B do ctDNA (LANG et al. 2013).

O aumento das bandas positivas e negativas do ctDNA foi ocasionado na presença dos derivados LqIT/JF-85, 88, 89, 93 e 95. Porém, para os compostos 86, 87, 90, 91, 94 e 96 foram detectadas ligeiras reduções das bandas negativas e aumento das bandas positivas. Ambas as alterações sugerem modos de ligação nos sulcos e/ou por intercalação, levando-se em consideração que ambos os processos de ligação podem ser vistos como um continuum (LAFAYETTE et al. 2013).

### 5.2.2 Estudo de ligação com a albumina do soro bovino

A albumina sérica é a proteína mais abundante no plasma e está envolvida no transporte de quantidades imensas de ligandos, tais como, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, íons metálicos e fármacos, tudo através da corrente sanguínea. Ela é bastante estudada devido à sua grande homologia estrutural com a albumina do soro humano (EWARAN et al. 2016; KALAIVANI et al. 2013).

Ligações de substâncias/fármacos a esta proteína pode ocasionar no aprimoramento de suas propriedades biológicas ou, até mesmo, propiciar caminhos para seu transporte (PRABHAKARAN et al. 2013). Neste contexto, o estudo de ligações a esta proteína, através da espectroscopia de absorção e fluorescência, é bastante útil para analisar as mudanças estruturais causadas pelo ligante, como também detectar e elucidar o modo de interação (MISHRA et al. 2014).

#### 5.2.2.1 Espectroscopia de absorção eletrônica

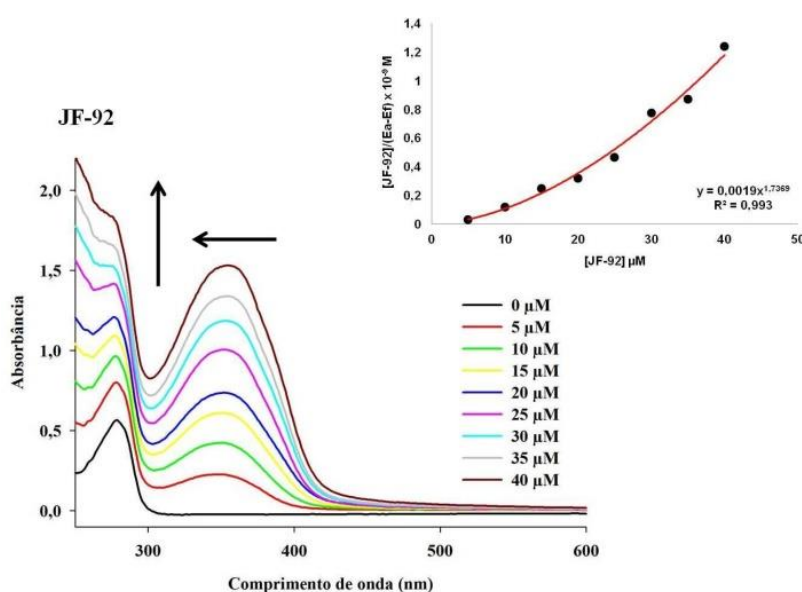
Na presença de quantidades crescentes (0-40  $\mu$ M) de todos os compostos LqIT/JFs, a BSA apresentou aumento de sua absorção na região de 278 nm (Tabela 3). Este fenômeno indica a efetiva interação dos compostos e a BSA (EWARAN et al. 2016; MISHRA et al. 2014; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, et al. 2011). Dentre todos os derivados, o LqIT/JF-92 (*p*-etil) exerceu maior efeito hipercrômico (62,01%) e foi o único composto que promoveu um  $\Delta\lambda$  de 1 nm para a região do azul (Figura 29). Este deslocamento deve-se, principalmente, ao fato de que o sítio ativo na proteína está

exposto em um ambiente hidrofóbico (provavelmente próximo ao resíduo Trp-212), revelando a formação de um complexo BSA-JFs no estado fundamental (BELATIK et al. 2012; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, et al. 2011).

Podemos inferir também que esta interação é de natureza não covalente e provavelmente ocorre através do empilhamento de elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos dos derivados LqIT/JFs e dos resíduos de aminoácidos na cavidade de ligação da BSA (SINGLA; LUXAMI; PAUL, 2016).

**Figura 29** – Espectro de absorção da albumina do soro bovino na presença de quantidades crescentes do composto LqIT/JF-92.

[LqIT/JF-92] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{M}$ . As setas ( $\uparrow$ ) e ( $\leftarrow$ ) referem-se aos efeitos hipercrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de [LqIT/JF-92]/(Ea - Ef) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Fonte: Próprio autor.

A ordem crescente da constante de ligação para os derivados ligados à albumina é:  $94 < 96 < 87 < 85 < 90 < 86 < 88 = 89 < 93 < 91 < 92 < 95$ . Estes resultados demonstram que a contribuição lipofílica dos grupos substituintes influencia positivamente na melhor afinidade de ligação com a proteína.

#### 5.2.2.2 Espectroscopia de fluorescência

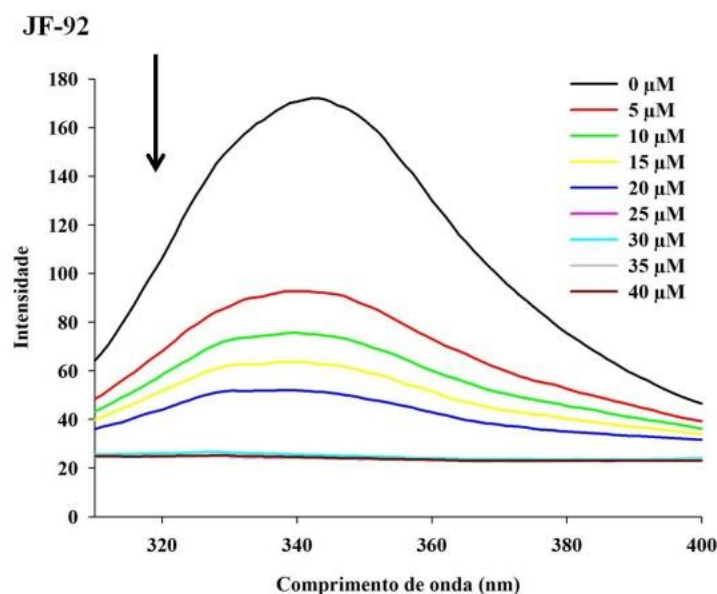
A espectroscopia de fluorescência da proteína albumina pode fornecer informações úteis a respeito de sua estrutura e dinâmica e é frequentemente utilizada nos estudos de interações entre as moléculas (MANIKANDAN et al. 2014).

A albumina exibe fluorescência (quando excitada em  $\sim 280$  nm) devido aos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina existentes na estrutura e sua extinção fluorescente sugere a formação de um complexo com esta, correspondente às alterações no microambiente destes resíduos durante o processo de ligação (MISHRA et al. 2014; SILVA et al. 2013). As mudanças nestes espectros de emissão são geralmente provocadas por transições conformacionais da proteína, associações de subunidades, ligações ao substrato ou desnaturação (MANIKANDAN et al. 2014; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, et al. 2011).

Neste estudo, foi observada a supressão fluorescente da BSA na presença de todos os derivados LqIT/JFs (Tabela 3) e todos eles promoveram desvios do pico máximo de emissão para a região do azul (efeito hipsocrômico). O desvio mais aparente foi para o derivado LqIT/JF-92 (*p*-etil), com  $\Delta\lambda = 4$  nm, como também maior hipocromismo (Figura 30) (Tabela 3).

**Figura 30** – Espectro de emissão da albumina do soro bovino na presença de quantidades crescentes do composto LqIT/JF-92.

[LqIT/JF-92] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu$ M.



Fonte: Próprio autor.

Esta extinção fluorescente pode ocorrer por mecanismos diferentes, podendo ser estático ou dinâmico (MISHRA et al. 2014; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, et al. 2011). O modo dinâmico é considerado quando o fluoróforo e o extintor colidem durante a transição do estado excitado, mas não causa nenhuma perturbação deste

fluoróforo (como também nenhuma alteração nos espectros de absorção). Já o mecanismo estático, diz respeito à formação de complexos entre o ligante e o fluoróforo no estado fundamental, provocando alterações nos espectros de absorção destes fluoróforos (MISHRA et al. 2014; RAHMAN et al. 2017).

O hipercromismo ocorrido na BSA, na espectroscopia de absorção, juntamente com o hipocromismo visualizado na espectroscopia de fluorescência, atribui-se às possíveis mudanças na estrutura secundária da proteína e indica que o tipo de interação dos derivados LqIT/JFs é através do mecanismo estático (KALAIARASE et al. 2016; MURALISANKAN et al. 2016).

O comportamento de supressão fluorescente foi analisado através da constante de supressão de fluorescência ( $K_{sv}$ ), a qual é determinada por regressão linear do gráfico da intensidade de emissão relativa ( $I_0/I$ ) versus a concentração dos derivados ( $Q$ ) (LAKOWICZ, 2006). O composto que apresentou maior valor desta constante foi o LqIT/JF-92 ( $16,05 \times 10^4$ ) (Tabela 3).

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

**Tabela 3** – Dados de absorção e emissão da albumina do soro bovino na presença dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas.

| ABSORÇÃO     |                                         |                                          |                         |                                      |                        | FLUORESCÊNCIA                           |                                          |                         |                       |                        |                                     |                         |
|--------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Composto     | $\lambda_{\text{max}}$<br>livre<br>(nm) | $\lambda_{\text{max}}$<br>ligado<br>(nm) | $\Delta\lambda$<br>(nm) | Hipercromicidade <sup>a</sup><br>(%) | Kb M <sup>-1</sup>     | $\lambda_{\text{max}}$<br>livre<br>(nm) | $\lambda_{\text{max}}$<br>ligado<br>(nm) | $\Delta\lambda$<br>(nm) | $\lambda$ exc<br>(nm) | Bandas (nm)<br>Exc_Emi | Hipocromicidade <sup>b</sup><br>(%) | Ksv M <sup>-1</sup>     |
| <b>JF-85</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 38,74                                | 8,40 x 10 <sup>4</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 237,42                              | 5,90 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-86</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 62,54                                | 1,08 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 157,14                              | -                       |
| <b>JF-87</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 52,95                                | 8,03 x 10 <sup>4</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 493,41                              | 3,99 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-88</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 53,34                                | 1,13 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 68,97                               | 6,07 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-89</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 53,34                                | 1,13 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 226,14                              | 6,36 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-90</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 43,48                                | 1,03 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 340                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 132,77                              | 3,82 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-91</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 58,04                                | 1,39 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 340                                      | 3                       | 285                   | 2,5                    | 287,44                              | 8,85 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-92</b> | 278                                     | 277                                      | 1                       | 69,01                                | 1,43 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 339                                      | 4                       | 285                   | 2,5                    | 601,57                              | 16,05 x 10 <sup>4</sup> |
| <b>JF-93</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 56,43                                | 1,17 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 508,17                              | 11,20 x 10 <sup>4</sup> |
| <b>JF-94</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 42,61                                | 5,44 x 10 <sup>4</sup> | 343                                     | 342                                      | 1                       | 285                   | 2,5                    | 320,04                              | 9,24 x 10 <sup>4</sup>  |
| <b>JF-95</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 52,42                                | 1,44 x 10 <sup>5</sup> | 343                                     | 341                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 371,21                              | 10,39 x 10 <sup>4</sup> |
| <b>JF-96</b> | 278                                     | 278                                      | 0                       | 52,75                                | 7,29 x 10 <sup>4</sup> | 343                                     | 342                                      | 2                       | 285                   | 2,5                    | 33,65                               | 11,19 x 10 <sup>4</sup> |

<sup>a</sup>Hipercromismo resultante da formação de complexo entre a albumina e 40  $\mu\text{M}$  dos derivados LqIT/JFs em comparação com a albumina livre.

<sup>b</sup>Hipocromismo resultante da formação de complexo entre a albumina e 40  $\mu\text{M}$  dos derivados LqIT/JFs em comparação com a albumina livre.

A ordem crescente do Ksv para os derivados LqIT/JFs é: 90 < 87 < 85 < 88 < 89 < 91 < 94 < 95 < 96 < 93 < 92. Muitos derivados que apresentaram os maiores valores de Ksv mostraram também maior hipocromismo ao interagir com a BSA, com exceção do LqIT/JF-96 (contendo o radical fenil sem substituição), o qual causou menor efeito hipocrômico.

Este resultado pode ser atribuído ao perfil eletrônico dos radicais, verificando que, quanto maior a contribuição eletrônica, através dos efeitos mesoméricos e indutivos positivos, maiores os valores de Ksv, como pode ser observado para os derivados LqIT/JF-92 e LqIT/JF-93. Substituintes que possuem lipofilicidade positiva ( $\pi^+$ ), conforme verificado no Diagrama de Craig (Figura 26), influenciam no aumento dessa constante. Isto pode ser constatado pela menor disponibilidade de pares de elétrons livres, pois, radicais que promovem esse aumento da lipofilicidade ajudam a melhorar a interação dos derivados com a proteína albumina, visto que os principais sítios de ligação/interação de muitas substâncias químicas localizam-se em cavidades hidrofóbicas.

### 5.3 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

#### 5.3.1 Propriedades ADME dos ligantes

A compreensão das propriedades farmacocinéticas – ADME (A: absorção; D: distribuição; M: metabolismo; E: excreção) dos fármacos são fundamentais na etapa de descoberta de novos medicamentos, principalmente quando são estudadas nos estágios iniciais de desenvolvimento, podendo determinar a biodisponibilidade (SZUMILAK; LEWGOWD; STANCZAK, 2016).

Este conjunto de processos são rotineiramente estudados pelos químicos medicinais e, com o crescente uso de métodos *in silico*, a previsão dos possíveis efeitos tóxicos, bem como a sobrevivência em sistemas biológicos destas novas entidades químicas estão facilitando a identificação dos fármacos com melhor biodisponibilidade e eficácia, levando à redução das falhas causadas pela farmacocinética e à otimização de propriedades inaceitáveis (BOCCI et al. 2017; SZUMILAK; LEWGOWD; STANCZAK, 2016).

Estas propriedades farmacocinéticas dos derivados LqIT/JFs foram obtidas nas plataformas SwissADME e pkCSM e estão apresentadas na tabela 4 abaixo.

**Tabela 4** – Dados farmacocinéticos *in silico* calculados na plataforma SwissADME ou pkCSM.

| <b>LqIT/<br/>JFs</b> | <b>LogP<sup>a</sup></b> | <b>LogS<sup>b</sup></b> | <b>TPSA<sup>c</sup><br/>(Å<sup>2</sup>)</b> | <b>Perm. Caco-2<sup>d</sup></b> | <b>Abs.<br/>Int.<sup>e</sup></b> | <b>VDss<sup>f</sup></b> |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <b>JF-85</b>         | 2,84                    | -4,92                   | 81,40                                       | 1,346                           | 90,593                           | 0,187                   |
| <b>JF-86</b>         | 2,65                    | -5,23                   | 81,40                                       | 1,352                           | 92,456                           | 0,371                   |
| <b>JF-87</b>         | 1,38                    | -3,98                   | 94,29                                       | 1,341                           | 93,282                           | 0,367                   |
| <b>JF-88</b>         | 2,95                    | -5,47                   | 81,40                                       | 1,456                           | 88,861                           | 0,234                   |
| <b>JF-89</b>         | 3,19                    | -6,12                   | 81,40                                       | 1,237                           | 90,586                           | -0,094                  |
| <b>JF-90</b>         | 1,49                    | -5,61                   | 127,22                                      | 0,736                           | 89,937                           | -0,003                  |
| <b>JF-91</b>         | 2,69                    | -5,19                   | 81,40                                       | 1,355                           | 91,095                           | 0,249                   |
| <b>JF-92</b>         | 2,92                    | -5,64                   | 81,40                                       | 1,367                           | 91,064                           | 0,379                   |
| <b>JF-93</b>         | 3,07                    | -5,54                   | 81,40                                       | 1,076                           | 88,794                           | 0,253                   |
| <b>JF-94</b>         | 2,13                    | -4,98                   | 90,63                                       | 1,329                           | 92,087                           | 0,324                   |
| <b>JF-95</b>         | 1,58                    | -3,87                   | 81,40                                       | 1,341                           | 92,961                           | 0,179                   |
| <b>JF-96</b>         | 2,45                    | -4,82                   | 81,40                                       | 1,359                           | 91,018                           | 0,178                   |

<sup>a</sup>SwissADME log do coeficiente de partição octanol-água; <sup>b</sup>SwissADME log de solubilidade aquosa; Cálculo do SwissADME da Área de Superfície Polar Topológica (TPSA); predição de <sup>d</sup>pkCSM da permeabilidade das células Caco-2 como estimativa de absorção na mucosa intestinal humana; predição de <sup>e</sup>pkCSM da proporção de absorção de composto pelo intestino delgado humano; previsão <sup>f</sup>pkCSM do log do volume de distribuição em estado estacionário (VDss); predição de <sup>g</sup>pkCSM do log de liberação total do fármaco.

Para um fármaco ter uma biodisponibilidade oral, recomenda-se o enquadramento de suas propriedades físico químicas em alguns parâmetros clássicos como, por exemplo, os descritos por Lipinski e colaboradores (2012). Os parâmetros são: Massa molar  $\leq 500$  g/mol; LogP  $\leq 5$  (MLogP  $\leq 4,15$ ); aceptores de ligações de hidrogênios (LH)  $\leq 10$ ; doadores de LH  $\leq 5$ . Outros tipos de descritores, são os estabelecidos por Veber (2002), onde o n° de ligações rotacionáveis deve ser  $\leq 10$  e a área de superfície polar topológica (TPSA)  $\leq 140$ . Diante destas informações, observa-se que todos os compostos se ajustaram em todos os parâmetros descritos acima.

Em relação à solubilidade em água (LogS) e de acordo com os parâmetros de solubilidade (insolúvel  $< -10$   $<$  mal solúvel  $< -6$   $<$  moderadamente solúvel  $< -4$   $<$  solúvel  $< -2$   $<$  muito solúvel  $< 0$   $<$  altamente solúvel), foi observado que os derivados apresentaram valores entre -3,98 e -5,93, considerados como sendo moderadamente solúveis em água, com exceção do LqIT/JF-89, que exibiu o valor de -6,12, significando pouca solubilidade (LAMBERTUCCI et al. 2018). O menor valor do LogS e maior valor do LogP do LqIT/JF-89 pode ser entendido devido à presença do grupamento naftaleno que, por possuir dois anéis aromáticos fundidos, ocasiona na maior hidrofobicidade da molécula como um todo.

Nos demais descritores (Permeabilidade em Caco-2, absorção intestinal, e VDss), os derivados apresentaram boa permeabilidade intestinal por exibir valores acima de 0,90 e

facilidade de absorção através do intestino delgado humano. O LqIT/JF-90 foi o único composto que exibiu o valor de permeabilidade menor que o estabelecido (0,736) devido à presença do grupamento nitro, uma espécie carregada que dificulta o processo de absorção passiva da molécula. Em relação à VDss, altos valores indicam maior distribuição dos compostos nos tecidos do que no plasma (baixo:  $< 0,15$ ; alto:  $> 0,45$ ) (LAMBERTUCCI et al. 2018). Neste caso, os valores de VDss da maioria dos derivados mostram uma distribuição intermediária nos tecidos. Menores distribuições foram detectadas para o LqIT/JF-89 e 90, podendo ser explicada pelo baixo perfil de hidrossolubilidade do LqIT/JF-89, e da maior capacidade de ionização do LqIT/JF-90.

Levando-se em consideração estas informações, foi verificado que a maioria dos derivados em estudo atendem às regras preconizadas para uma boa biodisponibilidade oral e para a continuidade de estudos mais avançados.

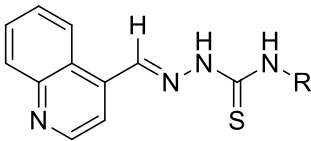
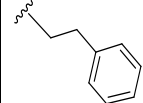
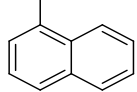
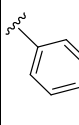
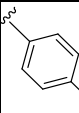
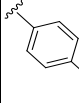
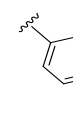
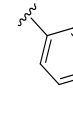
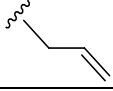
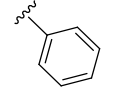
### **5.3.2 Docking da enzima topoisomerase II $\alpha$ com os derivados LqIT/JFs**

O docking é uma ferramenta de modelagem molecular que permite um estudo teórico baseado na predição das conformação e/ou geometria de determinadas moléculas (ligantes) no receptor de uma biomacromolécula alvo, como o DNA, proteínas e enzimas (GUIDO, 2010). É bastante útil no desenho de novos protótipos a fármacos pois simula, computacionalmente, as possíveis interações ligante-receptor a nível molecular, podendo demonstrar o potencial citotóxico e terapêutico das substâncias avaliadas.

Este estudo nos permitiu avaliar, com mais detalhes, os modos de interação dos derivados LqIT/JFs com o DNA + topoisomerase, utilizado-se como base a estrutura da biomacromolécula com o ligante cocristalizado etoposídeo, um conhecido inibidor da topoisomerase que estabiliza um complexo de DNA, levando à quebra da fita dupla e consequente morte celular (BALDWIN; OSHEROFF, 2005; ZABKA et al. 2015). Os derivados em estudo foram analisados na mesma posição do ligante etoposídeo, definindo-se, assim, a melhor conformação e interação com cada composto.

Os dados da energia de ligação de cada ligante estudando, bem como os tipos de interações entre eles e o complexo DNA-topoisomerase, estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Série de ligantes LqIT/JFs para o complexo DNA-topoisomerase II $\alpha$  por docking molecular.

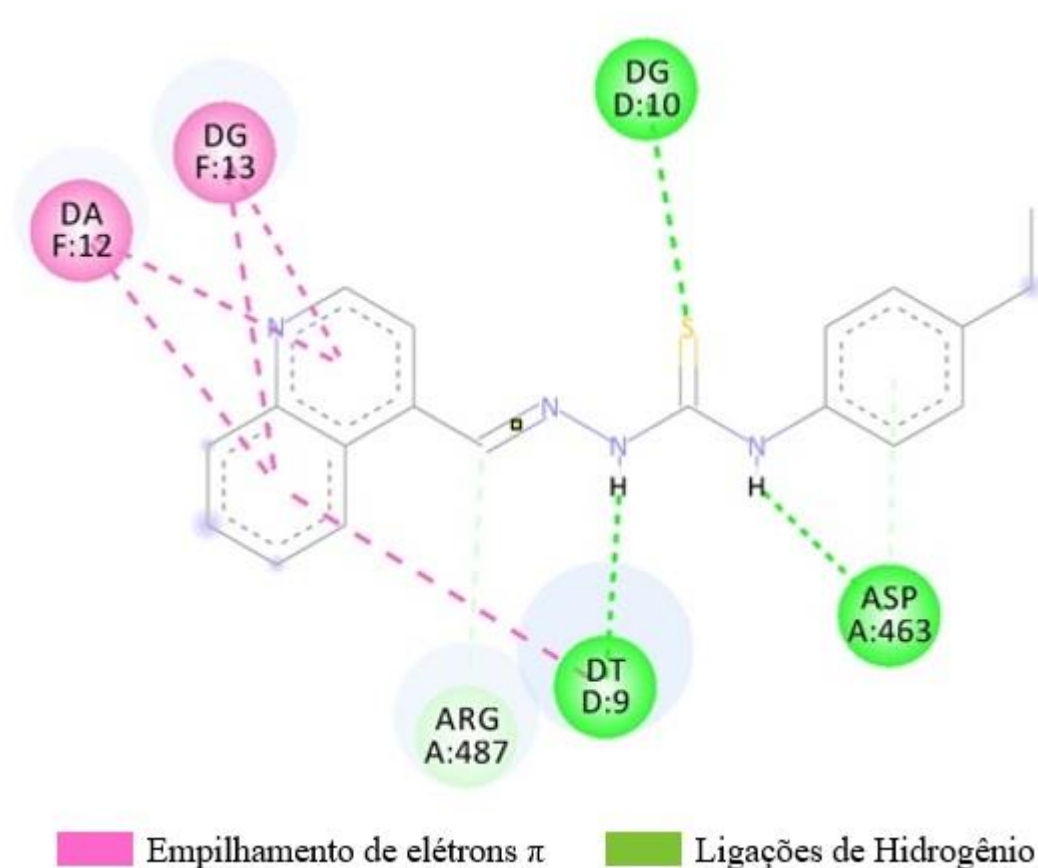
|  |                                                                                     |                           |                                                                                       |                                                                                      |                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Ligantes                                                                          | R                                                                                   | Energia de ligação (kcal) | Interação fármaco-receptor                                                            |                                                                                      |                                                                  |
|                                                                                   |                                                                                     |                           | Ligação de hidrogênio                                                                 | $\pi$ -alquila                                                                       | Empilhamento $\pi$ - $\pi$                                       |
| JF-85                                                                             |    | -8,06                     | G <sup>13</sup> – F                                                                   | ARG <sup>487</sup>                                                                   | T <sup>9</sup> – D<br>A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F |
| JF-86                                                                             |    | -8,42                     | -                                                                                     | ARG <sup>487</sup>                                                                   | T <sup>9</sup> – D<br>C <sup>8</sup> – C                         |
| JF-87                                                                             |    | -8,35                     | C <sup>8</sup> – C<br>T <sup>9</sup> – D                                              | MET <sup>762</sup><br>ARG <sup>487</sup>                                             | -                                                                |
| JF-88                                                                             |   | -8,83                     | ASP <sup>463</sup>                                                                    | MET <sup>762</sup><br>MET <sup>766</sup><br>G <sup>7</sup> – C                       | C <sup>8</sup> – C                                               |
| JF-89                                                                             |  | -9,78                     | G <sup>13</sup> – F<br>T <sup>9</sup> – D                                             | ARG <sup>487</sup>                                                                   | A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F<br>T <sup>9</sup> – D |
| JF-90                                                                             |  | -9,69                     | T <sup>9</sup> – D<br>A <sup>12</sup> – F<br>ASP <sup>463</sup><br>ARG <sup>487</sup> | ARG <sup>487</sup>                                                                   | G <sup>13</sup> – F<br>A <sup>12</sup> – F<br>T <sup>9</sup> – D |
| JF-91                                                                             |  | -8,83                     | G <sup>10</sup> – D<br>T <sup>9</sup> – D<br>ASP <sup>463</sup>                       | -                                                                                    | A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F                       |
| JF-92                                                                             |  | -8,78                     | G <sup>10</sup> – D<br>T <sup>9</sup> – D<br>ASP <sup>463</sup>                       | -                                                                                    | A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F                       |
| JF-93                                                                             |  | -9,04                     | T <sup>9</sup> – D                                                                    | G <sup>7</sup> – C<br>MET <sup>762</sup><br>MET <sup>766</sup><br>ARG <sup>487</sup> | -                                                                |
| JF-94                                                                             |  | -8,87                     | T <sup>9</sup> – D<br>G <sup>13</sup> – F<br>ARG <sup>487</sup>                       | ARG <sup>487</sup>                                                                   | A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F<br>T <sup>9</sup> – D |
| JF-95                                                                             |  | -7,06                     | T <sup>9</sup> – D                                                                    | ARG <sup>487</sup>                                                                   | -                                                                |
| JF-96                                                                             |  | -8,48                     | G <sup>10</sup> – D<br>T <sup>9</sup> – D<br>ASP <sup>463</sup>                       | ARG <sup>487</sup>                                                                   | A <sup>12</sup> – F<br>G <sup>13</sup> – F<br>T <sup>9</sup> – D |

A<sup>12</sup>; C<sup>8</sup>; G<sup>x</sup>; T<sup>9</sup> = Bases nitrogenadas Adenina, Citosina, Guanina e Timina.C<sup>x</sup>; D<sup>x</sup>; F = Fragmentos das fitas do DNA.ARG<sup>x</sup>; ASP<sup>x</sup>; MET<sup>x</sup>; TYR<sup>x</sup> = Resíduos de aminoácidos – Enzima topoisomerase II $\alpha$ .

A partir destes resultados, é possível afirmar que todos os compostos interagem não só com a dupla fita de DNA, mas também com determinados resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da topoisomerase, entre eles, a ARG<sup>487</sup>, ASP<sup>463</sup>, MET<sup>762</sup> e MET<sup>766</sup>. As energias de ligações variaram entre -7,06 e 9,78 kcal.

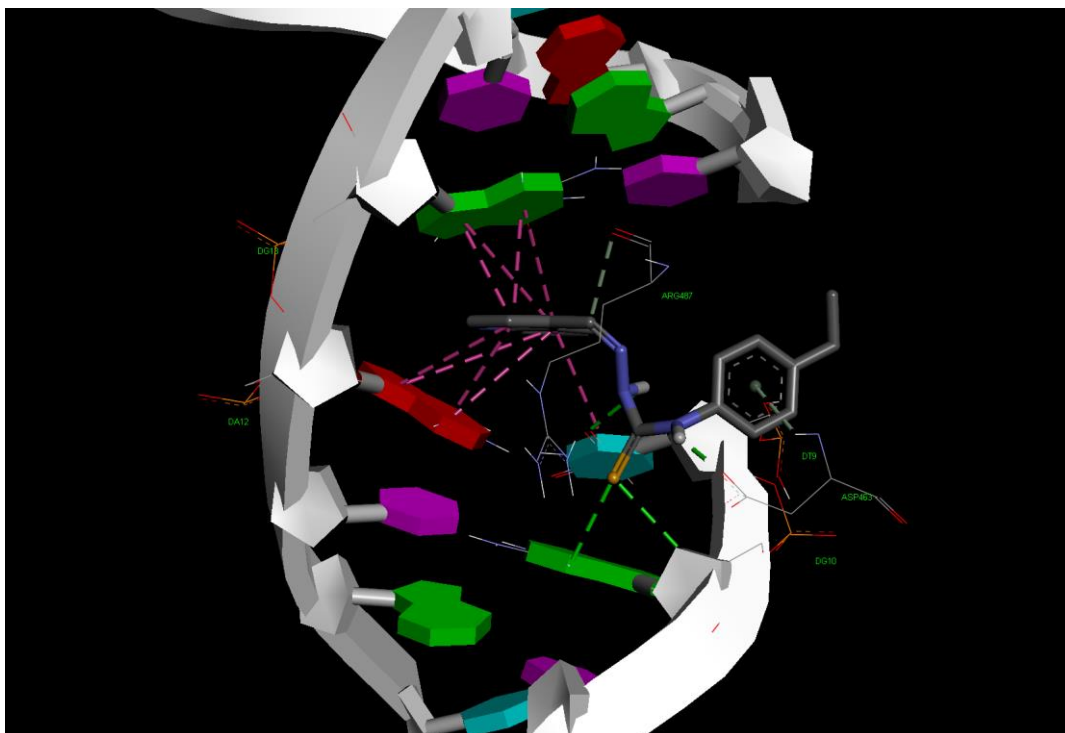
Ao analisar as estruturas obtidas no docking, uma característica importante da interação ligante-receptor foi a presença do empilhamento dos elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos dos ligantes e do DNA, conforme descrito na tabela 5. O empilhamento de elétrons  $\pi$  é uma interação crucial para a interação entre o ligante contendo anéis aromáticos e o DNA no processo de intercalação (GILAD; SENDEROWITZ, 2014). Dentre eles, o derivado LqIT/JF-92, que apresentou maior constante de ligação nos estudos experimentais, mostrou este tipo de interação com as bases A<sup>12</sup> e G<sup>13</sup> no fragmento F do DNA na análise do docking (Figura 31). Além disso, foram detectadas ligações de hidrogênio dos grupos NH e S do JF-92 com as bases G<sup>10</sup>, T<sup>9</sup> e com o resíduo ASP<sup>463</sup>.

**Figura 31** – Estrutura do derivado LqIT/JF-92 com os respectivos modos de interação com o DNA e a topoisomerase.



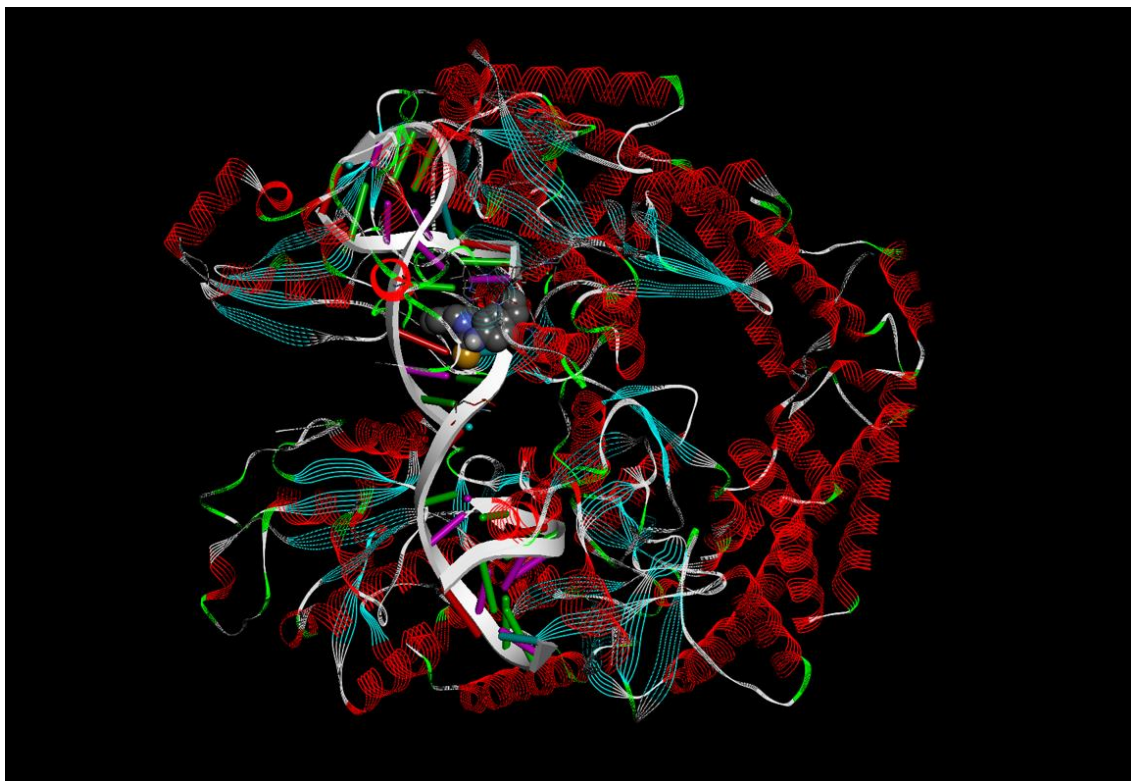
Na figura 32 é possível notar a disposição do ligante LqIT/JF-92 ao se ligar com o DNA e a enzima topoisomerase II $\alpha$ , onde observa-se que o JF-92 é capaz de intercalar entre as bases do DNA através do empilhamento dos elétrons  $\pi$  da quinolina com o os resíduos A<sup>12-F</sup> e G<sup>13-F</sup> do DNA

**Figura 32** – Estrutura do LqIT/JF-92-DNA + Topo com os respectivos tipos de interações.



O modelo de docking molecular do complexo LqIT/JF-92-DNA + Topo II $\alpha$  pode ser visualizado na figura 33, sendo possível observar melhor a disposição dentro do sistema.

**Figura 33** – Representação do complexo de ligação entre LqIT/JF-92 e DNA + Topoisomerase.



A obtenção destes resultados foi bastante importante para a melhor caracterização dos tipos de interação entre os derivados LqIT/JFs e o DNA + enzima topoisomerase II $\alpha$ , sendo possível estabelecer os modos de ligações, confirmando os obtidos experimentalmente, bem como oferecer apoio para posteriores análises com estes ligantes.

### 5.3.3 Docking da proteína albumina com os derivados LqIT/JFs

Considera-se como fator relevante a ligação de fármacos a proteínas séricas como, por exemplo, a albumina, e o estudo de docking molecular pode ajudar na compreensão desta interação, predizendo perfis farmacocinéticos (ADME) (CHAVES et al. 2015).

Neste estudo foi utilizada a albumina (BSA) contendo ligante co-cristalizado naproxeno, um anti-inflamatório não esteroideal que se liga à albumina do soro bovino por atrações eletrostáticas (BANERJEE; SINGH; KISHORE, 2006), para encontrar as possíveis orientações e interações dos derivados com a BSA, sendo explorados os dois subdomínios de ligação IIA e IIIA bem como regiões adjacentes a esses sítios. Todos estes dados são encontrados na tabela 6.

Tabela 6 – Série de ligantes para a BSA por docking molecular.

| Ligantes | Energia de ligação (kcal/mol) | Ligação de hidrogênio                                                                | Interações hidrofóbicas                                                                                                                                                  |                                                                |                                         | Subdomínio de ligação |
|----------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|
|          |                               |                                                                                      | $\pi$ -alquila / alquila                                                                                                                                                 | $\pi$ - sigma                                                  | Empilhamento $\pi$ - $\pi$              |                       |
| JF-85    | -9,21                         | Arg <sup>194</sup><br>Ser <sup>343</sup><br>Arg <sup>484</sup><br>Asp <sup>450</sup> | Arg <sup>194</sup> ; Val <sup>392</sup><br>Arg <sup>483</sup> ; Leu <sup>456</sup><br>Val <sup>481</sup>                                                                 | -                                                              | -                                       | Entre o IIA e o IIIA  |
| JF-86    | -9,03                         | Ala <sup>209</sup>                                                                   | Ala <sup>209</sup> ; Lis <sup>350</sup><br>Val <sup>481</sup> ; Leu <sup>480</sup><br>Leu <sup>197</sup> ; Arg <sup>198</sup>                                            | Val <sup>342</sup><br>Leu <sup>197</sup>                       | -                                       | IIA                   |
| JF-87    | -9,42                         | Ser <sup>393</sup><br>Asp <sup>450</sup>                                             | Arg <sup>483</sup> ; Arg <sup>484</sup><br>Leu <sup>480</sup> ; Val <sup>342</sup>                                                                                       | -                                                              | -                                       | Entre o IIA e o IIIA  |
| JF-88    | -8,64                         | Ser <sup>343</sup>                                                                   | Arg <sup>198</sup> ; Arg <sup>194</sup><br>Val <sup>342</sup> ; Leu <sup>197</sup><br>Leu <sup>346</sup> ; Ala <sup>209</sup><br>Val <sup>481</sup> ; Ala <sup>212</sup> | Leu <sup>197</sup><br>Leu <sup>346</sup><br>Leu <sup>480</sup> | -                                       | IIA                   |
| JF-89    | -9,90                         | Ser <sup>393</sup>                                                                   | Ala <sup>209</sup> ; Ala <sup>212</sup><br>Val <sup>481</sup> ; Val <sup>342</sup><br>Leu <sup>480</sup> ; Leu <sup>346</sup><br>Arg <sup>198</sup>                      | Leu <sup>346</sup><br>Leu <sup>480</sup><br>Leu <sup>197</sup> | Trp <sup>213</sup>                      | IIA                   |
| JF-90    | -11,51                        | Ala <sup>209</sup><br>Ser <sup>201</sup><br>Val <sup>481</sup>                       | Leu <sup>480</sup> ; Leu <sup>346</sup><br>Ala <sup>209</sup> ; Arg <sup>198</sup><br>Val <sup>342</sup> ; Val <sup>481</sup>                                            | Leu <sup>197</sup>                                             | Trp <sup>213</sup> ; Phe <sup>205</sup> | IIA                   |
| JF-91    | -8,88                         | Ser <sup>343</sup><br>Asp <sup>450</sup>                                             | Arg <sup>483</sup> ; Arg <sup>484</sup><br>Trp <sup>213</sup> ; Leu <sup>480</sup><br>Arg <sup>194</sup> ; Leu <sup>197</sup><br>Val <sup>481</sup> ; Arg <sup>198</sup> | Leu <sup>197</sup>                                             | Trp <sup>213</sup>                      | Entre o IIA e o IIIA  |
| JF-92    | -9,28                         | Ser <sup>343</sup><br>Asp <sup>450</sup>                                             | Arg <sup>483</sup> ; Arg <sup>484</sup><br>Arg <sup>194</sup> ; Trp <sup>213</sup><br>Val <sup>342</sup> ; Leu <sup>456</sup>                                            | Leu <sup>197</sup>                                             | -                                       | Entre o IIA e o IIIA  |
| JF-93    | -8,87                         | -                                                                                    | Trp <sup>213</sup> ; Arg <sup>198</sup><br>Arg <sup>194</sup> ; Arg <sup>483</sup><br>Arg <sup>484</sup> ; Leu <sup>456</sup><br>Leu <sup>197</sup>                      | Leu <sup>197</sup><br>Arg <sup>483</sup>                       | -                                       | Entre o IIA e o IIIA  |
| JF-94    | -9,44                         | Ala <sup>209</sup><br>Ser <sup>201</sup>                                             | Leu <sup>480</sup> ; Val <sup>481</sup><br>Ala <sup>209</sup> ; Arg <sup>194</sup><br>Arg <sup>198</sup> ; Val <sup>342</sup>                                            | Phe <sup>205</sup><br>Leu <sup>197</sup>                       | Trp <sup>213</sup> ; Phe <sup>205</sup> | IIA                   |
| JF-95    | -7,58                         | Arg <sup>484</sup><br>Ser <sup>343</sup><br>Asp <sup>450</sup>                       | Leu <sup>480</sup> ; Arg <sup>483</sup><br>Leu <sup>456</sup> ; Val <sup>481</sup>                                                                                       | -                                                              | -                                       | Entre o IIA e o IIIA  |

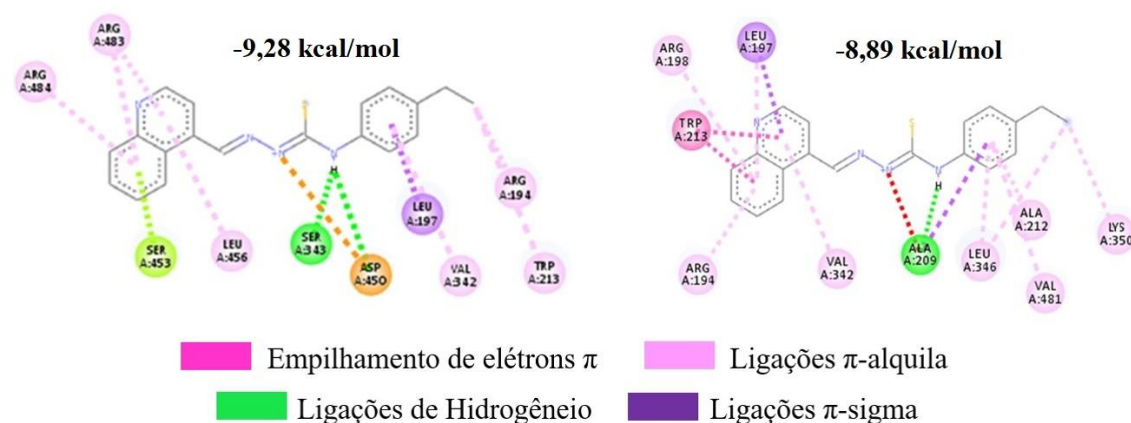
|              |       |                                                                |                                                                                                          |                                          |                    |                         |
|--------------|-------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| <b>JF-96</b> | -9,20 | Arg <sup>484</sup><br>Ser <sup>343</sup><br>Asp <sup>450</sup> | Leu <sup>480</sup> ; Leu <sup>197</sup><br>Arg <sup>194</sup> ; Val <sup>481</sup><br>Arg <sup>483</sup> | Leu <sup>197</sup><br>Leu <sup>454</sup> | Trp <sup>213</sup> | Entre o IIA<br>e o IIIA |
|--------------|-------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|-------------------------|

De acordo com os dados da tabela 6, todos os derivados realizam interações com a proteína albumina, seja por ligações de Hidrogênio ou por interações hidrofóbicas (ligações  $\pi$ -alquila,  $\pi$ -alquila/alquila e empilhamento de elétrons  $\pi$ ). Os valores das energias de ligações foram entre -7,58 e -11,51.

A partir dos estudos de absorção e fluorescência, supõem-se que os derivados se encontram em cavidades hidrofóbicas próximas a um resíduo de Triptofano (Trp) já que a interação levou ao aumento da absorção de luz e supressão fluorescente deste aminoácido. O derivado que apresentou maior constante de ligação e supressão foi o LqIT/JF-92 ( $1,43 \times 10^5$  e  $16,05 \times 10^4$ , respectivamente).

Nos estudos de docking com o LqIT/JF-92 e albumina foram calculadas 200 conformações e, dentre estas, foram escolhidas duas, conforme mostra a figura 34. É possível observar a interação direta entre o LqIT/JF-92 e o aminoácido Trp na conformação de maior energia (-8,89 kcal/mol), realizando-se interações de empilhamento dos elétrons  $\pi$  do anel quinolina com os elétrons  $\pi$  do anel indólico do Trp<sup>213</sup>, o que pode justificar os resultados obtidos através do ensaio experimental.

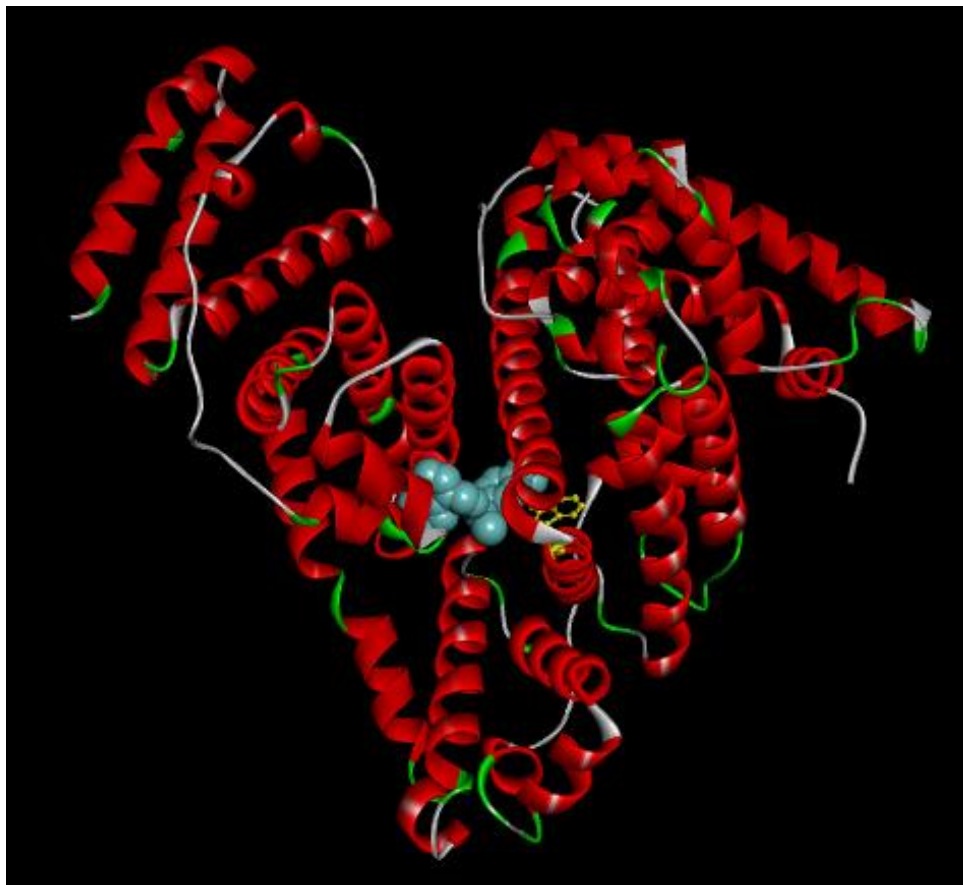
**Figura 34** – Estruturas do derivado LqIT/JF-92 em diferentes regiões da albumina com suas respectivas interações.



É possível notar também outros tipos de interações como, por exemplo, ligações de hidrogênio com os resíduos Ser<sup>343</sup> e Asp<sup>450</sup> e ligações  $\pi$ -alquila com os resíduos Arg<sup>483</sup>, 484, 194; Trp<sup>213</sup>, Val<sup>342</sup> e Leu<sup>456</sup>. As ligações  $\pi$ -sigma podem ser visualizadas com a Leu<sup>197</sup>.

Na figura 35 visualizamos o complexo da conformação de menor energia do LqIT/JF-92 com a proteína albumina e verificamos que ele se acomoda entre os sítios IIA e IIIA da proteína, estando próximo ao resíduo de triptofano (destacado em amarelo).

**Figura 35** – Estrutura da BSA em complexo com o ligante LqIT/JF-92 (em azul) (Trp<sup>213</sup> indicado em amarelo).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

12 novos derivados da série 2-(quinolin-4-ilmetileno)hidrazinacarbotioamidas foram sintetizados de forma satisfatória através da rota sintética empregada e suas estruturas químicas foram devidamente elucidadas.

Foi possível verificar, no estudo da ligação entre os derivados e o ctDNA, a existência de modos de interação variados, mudando de acordo com os perfis eletrônicos e lipofílicos dos grupos substituintes. Podemos sugerir, ainda, que o composto LqIT/JF-92 liga-se ao DNA por meio da intercalação fazendo também interações no sulco devido às alterações bastante evidentes nos estudos de absorção, fluorescência e dicroísmo circular.

Para a BSA, também houve afinidade de ligação das moléculas analisadas, inclusive do LqIT/JF-92, observando-se que as propriedades lipofílicas dos substituintes influenciam de forma positiva, na maior capacidade de interação.

Estes resultados indicam a potencial atividade de moléculas contendo o núcleo quinolina e a porção tiossemicarbazona, devendo ser exploradas com outros estudos adicionais para corroborar os resultados e determinar seu mecanismo de ação, já que são consideradas moléculas promissoras para a ação antitumoral.

## 6.1 PERSPECTIVAS

- Verificar a atividade antitumoral dos derivados, analisando suas propriedades antiproliferativas *in vitro* com linhagens de células tumorais bem como seu potencial citotóxico em células não transformadas;
- Analisar em qual etapa do ciclo celular os derivados atuam, bem como o tipo de morte celular;
- Realizar estudos de viscosidade com o DNA para verificar, de fato, o modo de interação entre os ligantes e esta biomacromolécula;
- Proceder com testes utilizando a enzima topoisomerase com o intuito de verificar o potencial inibidor dos compostos.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMOEZ, A. et al. Screening and identification of molecular targets for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 387, p. 3-9, 2017.
- ABDI, K. et al. Interaction of 5-Fluorouracil and its derivatives with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 107, p. 20-26, 2012.
- AFFELDT, R. F. **Síntese e Estudo Fotofísico de Novos Heterociclos Nitrogenados contendo Fluoróforos Benzazólicos**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- AFZAL, O. et al. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 871-910, 2015.
- AGARWAL, S.; JANGIR, D. K.; MEHROTRA, R. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 177-182, 2013.
- AKHTAR, J. et al. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 143-189, 2016.
- ALAM, M. F. et al. In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug Citral. **International Journal of Biological Macromolecules**, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.098>, 2018.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 4506-4521, 2014.
- ALI, A. Q. et al. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: *In vitro* anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 125, p. 440-448, 2014.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 13023-13042, 2015.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538-1556, 2017.

AMARAL, A. T. et al. A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 694-700, 2017.

ANITHA, P. et al. 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.

ARSHAD, N. et al. Synthesis, characterization of amide substituted dexibuprofen derivatives and their spectral, voltammetric and docking investigations for DNA binding interactions. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 169, p. 134-147, 2017.

BALDWIN, E. L.; OSHEROFF, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. **Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents**, v. 5, n. 4, p.363-72, 2005.

BANERJEE, T.; SINGH, S. K.; KISHORE, N. Binding of Naproxen and Amitriptyline to Bovine Serum Albumin: Biophysical Aspects. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 47, p. 24147-24156, 2006.

BARBOSA-LIMA, G. et al. 2,8-bis(trifluoromethyl)quinoline analogs show improved anti-Zika vírus activity, compared to mefloquine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 334-340, 2017.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1172-1180, 2002.

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

BASAK, S.; CHATTOPADHYAY, K. Studies of protein folding and dynamics using single molecule fluorescence spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 23, p. 11139-11149, Mai 2014.

BELATIK, A. et al. Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 114-123, 2012.

BERALDO, H. Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications. **Química Nova**, v. 27, n. 3, São Paulo, 2004.

BLAU, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new arylthiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 142-151, 2013.

BI, S. et al. 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.

BIST, G. et al. Dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-chlorophenylpyridines: Topoisomerase I and II $\alpha$  dual inhibitors with DNA non-intercalative catalytic activity, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 69-84, 2017.

BOCCI, G. et al. ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties. **Scientific Reports**, doi: 10.1038/s41598-017-06692-0, 2017.

BOSE, A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 220-226, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Taxas de mortalidade por câncer**. Disponível em: < <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=19465>> Acesso em: 15 abr. 2018.

CAMPOS, L. T. Fibroblastos e Câncer. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 118-124, 2010.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48-59, 2014.

CHARAK, S. et al. Spectroscopic and molecular docking studies on chlorambucil interaction with DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 406-411, 2012.

CHAVES, O. A. et al. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 19526-19539, 2015.

DA SILVA, J. G. et al. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper (II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 415-426, 2013.

DA SILVA, R. E. et al. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1633-1638, 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports** v. 7, p. 42717, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep42717>>.

DAVE, S. S.; RAHATGAONKAR, A. M. Syntheses and anti-microbial evaluation of new quinoline scaffold derived pyrimidine derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, n. 9, p. S451-S456, 2011.

Dassault Systèmes *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. San Diego: Dassault Systèmes, 2016.

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

EL-SONBATI, A. Z. et al. Molecular docking, DNA binding, thermal studies and antimicrobial activities of Schiff base complexes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 218, p. 434-456, 2016.

ESPÍNDOLA, J. W. et al. Synthesis and structure e activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818-835, 2015.

ESWARAN, R. et al. Synthesis, crystal structure, DNA and protein binding studies of novel binuclear Pd(II) complex of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde-4(N,N)-dimethylthiosemicarbazone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 1-8, 2016.

FAULHABER K. et al. 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.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S25-S54, 2015.

FERLIN, M. G. et al. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activity of 2-Phenylpyrroloquinolin-4-ones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, n. 9, p. 3417-3427, 2005.

FERREIRA, E. S. et al. Introdução às espectroscopias de absorção e fluorescência: aplicações farmacêuticas. **Caderno de Física da UEFS**, v. 12, n. 02, p. 41-55, 2014.

GAÁL, A. et al. Comparative *in vitro* investigation of anticancer copper chelating agents. **Microchemical Journal**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.007>, 2016.

GAO, C. et al. 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.

GASPAROTTO, V. et al. Synthesis and Biological Activity of 7-Phenyl-6,9-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-f]quinolin-9-ones: A New Class of Antimitotic Agents Devoid of Aromatase Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p.1910-1915, 2006.

GHODSI, R. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-(Imidazolylmethyl)-2-(4-methylsulfonyl phenyl)-Quinoline Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors and *in vitro* Anti-breast Cancer Agents. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 169-177, 2016.

GIRI, G. C. et al. New cyclic tetranuclear copper (II) complexes containing quadrilateral cores: Synthesis, structure, spectroscopy and their interactions with DNA in aqueous solution. **Journal of Molecular Structure**, v. 1142, p. 175-184, 2017.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUP, R.; GOKÇE, C.; DILEK, N. Synthesis, structural characterization and DNA interaction of zinc complex from 2,6-diacetylpyridine dihydrazone and {4-[(2E)-2-(hydroxyimino)acetyl]phenoxy} acetic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 42-50, 2015.

GÜRSOY, A.; TERZIOGLUL, N.; ÖTÜK, G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 753-757, 1997.

HALDER, S.; DEY, S.; ROY, P. A quinoline based Schiff-base compound as pH sensor. RSC advances, doi: DOI: 10.1039/C5RA07538F, 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HARIBABU, J. et al. Synthesis, DNA/protein binding, molecular docking, DNA cleavage and *in vitro* anticancer activity of nickel(II) bis(thiosemicarbazone) complexes. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 46031-46049, 2015.

HEBIA, C. et al. Trypsin inhibitor complexes with human and bovine serum albumins: TEM and spectroscopic analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 254-259, 2014.

HU, Y.-J. et al. Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 738, p. 143-147, 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de novos casos de câncer no Brasil em 2018**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)> Acesso em: 30 jul. 2017.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Quimioterapia**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=101](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101)> Acesso em 15 abr. 2018.

ISHTIKHAR, M.; RABBANI, G.; KHAN, R. H. Interaction of 5-fluoro-5\_-deoxyuridine with human serum albumin under physiological and non-physiological condition: A biophysical investigation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 469-477, 2014.

ITO, J. A. Técnicas espectroscópicas em biofísica. **Caderno de Física da UEFS**, v. 03, n. 01, p. 21-29, 2004.

JAIN, S. et al. Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.10.009>, 2016.

JANGIR, D. K. et al. FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA, **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 105, p. 143-148, 2011.

JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 114, p. 38-43, 2012.

JANNESARI, Z. et al. Experimental and molecular modeling studies on the interaction of the Ru (II)-piroxicam with DNA and BSA. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 577-590, 2013.

JANOVEC, L. et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1790-1801, 2011.

JAYABHARATHI, J.; JAYAMOORTHY, K.; THANIKACHALAM, V. Docking investigation and binding interaction of benzimidazole derivative with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 27-32, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.08.018>>.

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.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, 2000.

KALAIARASE, G. et al. DNA (CT), protein (BSA) binding studies, anti-oxidant and cytotoxicity studies of new binuclear Ni (II) complexes containing 4(N)-substituted thiosemicarbazones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 453, p. 547-558, 2016.

KALAIIVANI, P. et al. Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium (II) complexes containing triphenylarsine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 405, p. 415-426, 2013.

KARAMI, K. et al. Synthesis and characterization of two new trans palladium (II) complexes containing benzylamine ligand: DNA/BSA interactions, molecular docking and *in vitro* cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.02.027>, 2017.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 4, Abr 2015.

KUMAR, R. et al. Synthesis and electroluminescence properties of tris-[5-chloro-8-hydroxyquinoline] aluminum Al(5-Clq)<sub>3</sub>. **Journal of semiconductors**, v. 36, n. 6, doi: 10.1088/1674-4926/36/6/064001, 2015.

KUMAR, R. et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S956-S963, 2017.

KUO, H-H. et al. Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, 2016.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.012, 2017.

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

LAMBERTUCCI, C. et al. New potent and selective A<sub>1</sub> adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, doi: doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.067, 2018.

LANG, X. et al. Novel synthetic 9-benzyloxyacridine analogue as both tyrosine kinase and topoisomerase I inhibitor. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 677-680, 2013.

LEI, H.; WANG, X.; WU, C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations, **Journal Molecular Graphics Modell**, v. 38, p. 279-289, 2012.

LIESEN, A. P. et al. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3685-3691, 2010.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17, doi: doi:10.1016/j.addr.2012.09.019, 2012.

LIU, M-L. et al. Synthesis and structure of a new mononuclear copper(II) complex with 2,2'-bipyridine and picrate: molecular docking, DNA-binding, and *in vitro* anticancer activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 630-648, 2014.

LIU, T. T. et al. Application of capillary electrophoresis-frontal analysis for comparative evaluation of the binding interaction of captopril with human serum albumin in the absence and presence of hydrochlorothiazide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 31-35, 2015.

MA, D. L et al. Molecular modeling of drug-DNA interactions: virtual screening to structure-based design. **Biochimie**, v. 93, p. 1252-1266, 2011.

MALAYERI, S. O. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 7-(aryl)-2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-g]quinoline derivatives as potential Hsp90 inhibitors and anticancer agents. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.050, 2017.

MANIKANDAN, R. et al. Synthesis, characterization and crystal structure of cobalt (III) complexes containing 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: DNA/protein interaction, radical scavenging and cytotoxic activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 205-216, 2014.

MARELLA, A. et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2013.

MARKOVIC, V. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 228-238, 2013.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as Cores, **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508-1534, 2015. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v7n4a27.pdf>>. Acesso em: 24 out 2017.

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. **Journal of Molecular Biology**, 86, p. 469-489, 1974.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml;jsessionId=3617D8294552FE105334669985026E47#panelResultado>> Acesso em jan 2018.

MISHRA, M. et al. Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N'-(phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 452-464, 2014.

MOHAMADI, M. et al. *In vitro* and *in silico* studies of the interaction of threetetrazoloquinazoline derivatives with DNA and BSA and their cytotoxicity activities against MCF-7, HT-29 and DPSC cell lines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 85-95, 2017.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MURALISANKAR, M. Synthesis and crystal structure of new monometallic and bimetallic copper (II) complexes with N-substituted isatin thiosemicarbazone ligands: Effects of the complexes on DNA/protein-binding property, DNA cleavage study and *in vitro* anticancer activity. **Polyhedron**, v. 118, p. 103-117, 2016.

NARVA, S. et al. Synthesis and biological evaluation of pyrrolo[2,3-b]pyridine analogues as antiproliferative agents and their interaction with calf thymus DNA. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 220-231, 2016.

NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1725-1746, 2009.

NICOLUSSI, A. C. et al. Relaxamento com imagem guiada e presença de depressão em pacientes com câncer durante quimioterapia. **Cogitare Enfermagem**, v. 21, n. 4, p. 01-10, 2016.

OLIVEIRA, J. F. et al. 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, J. F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305-314, 2017.

OZKAY, Y. et al. Synthesis of 2-substituted-N-[4-(1-methyl-4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl)phenyl]acetamide derivatives and evaluation of their anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3320-3328, 18 Apr, 2010.

OZLUER, C.; KARA, H. E. S. *In vitro* DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 36-42, 2014.

PALANIMUTHU, D.; SAMUELSON, A. G. Dinuclear zinc bis (thiosemicarbazone) complexes: Synthesis, *in vitro* anticancer activity, cellular uptake and DNA interaction study, **Inorganica Chimica Acta**, v. 408, p. 152-161, 2013.

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.

PIETRAS, K.; ÖSTMAN A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 1324-1331, 2010.

PINHEIRO, A. C. et al. A Importância do Núcleo Quinolínico e seus Derivados no Desenvolvimento de Fármacos. **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, 2010.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072 , 2015.

PLSIKOVA, J. et al. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 283-295, 2012.

PRABHAKARAN, R. et al. Synthesis, DNA/protein binding and *in vitro* cytotoxic studies of new palladium metallothiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6742-6752, 2013.

PINZ, M. P. et al. 7-Chloro-4-phenylsulfonyl quinoline, a new antinociceptive and antiinflammatory molecule: Structural improvement of a quinoline derivate with pharmacological activity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 72-77, 2017.

RAHMAN, K. N. A. et al. Copper, nickel and zinc complexes of 3-acetyl coumarin thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of cytotoxicity and DNA/protein binding properties. **Polyhedron**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.06.044>, 2017.

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(20 - hydroxybenzoyl)hydrazone and its Cu(II) complexes: A structure activity relationship study. **Inorganica Chimica Acta**, v. 385, p. 81-93, 2012.

RESCIFINA, A. C. et al. 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.

ROESE, F. M.; FONTANA, E. M.; PEREIRA, K. C. B. Análise da adesão à terapia antineoplásica oral de pacientes atendidos na farmácia de quimioterapia de um hospital público de Mato Grosso do Sul. **Revista ENIAC Pesquisa**, v. 7, n. 1, 2017.

ROY, S. et al. Binding interaction of phosphorus heterocycles with bovine serum albumin: A biochemical study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 19-26, 2017.

SCHRÖDER, J. et al. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazin e nitriles as inhibitors of Leishmania mexicana cysteine protease CPB. **Plos one**, v. 8, n. 10, 2013.

SEDIGHIPOOR, M. et al. Synthesis and electronic structure of novel Schiff bases Ni/Cu (II) complexes: Evaluation of DNA/serum protein binding by spectroscopic studies. **Polyhedron**, v. 129, p. 1-8, 2017.

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

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M.; SHOHRE, S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1836-1841, 2012.

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

SHANKARAIHAH, N. et al. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo-b-carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p. 42–50, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 5-29, 2015.

SILVA, J. G. et al. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper (II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 415-426, 2013.

SINGH, S. S.; MEHTA, J. Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. **Journal Chromatography B**, v. 834, p. 108-116, 2006.

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

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173-1213, out. 2007.

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

SUBASTRI, A. et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of troxerutin with DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 122-129, 2015.

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 56-63, 2016.

SZUMILAK, M.; LEWGOWD, W.; STANCZAK, A. *In silico* ADME studies of polyamine conjugates as potential anticancer drugs. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 73, n. 5, p. 1191-1200, 2016.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TEMERK, Y. et al. Interactions of an anticancer drug Formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions, **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 149, p. 27-36, 2015.

TENÓRIO, R. P. et al. Thiosemicarbazones: preparation methods, synthetic applications and biological importance. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030, 2005.

THAMILARASAN, V. et al. Synthesis, interactions, molecular structure, biological properties and molecular docking studies on Mn, Co, Zn complexes containing acetylacetone and pyridine ligands with DNA duplex. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 160, p. 110-120, 2016.

THIRUNAVUKKARASU, T. et al. Synthesis, DNA/protein binding, molecular docking and *in vitro* anticancer activity of quinoline based palladium (II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 17, doi: doi.org/10.1016/j.ica.2017.09.033, 2017.

UJACZ, A.; ZIELINSKI, K.; SEKULA, B. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics** v. 82, n. 9, p. 2199-2208, 2014.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2012.

VERÇOZA, G. L. et al. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formil piridina tiossemicarbazonas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1405-1410, 2009.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, Y. R. et al. Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 18, p. 10861-10871, 2017.

YADAV, D. K. et al. New arylated benzo[h]quinolines induce anticancer activity by oxidative stress-mediated DNA damage. **Scientific Reports**, 6:38128, 2016, doi: 10.1038/srep38128. Acesso em: 24 mar. 2017.

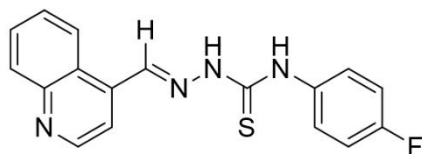
YAMASAKI, K. et al. Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5435-5443, 2013.

YU, W. et al. Synthesis of biological active thiosemicarbazone and characterization of the interaction with human serum albumin. **Journal of Luminescence**, v. 134, p. 491-497, 2013.

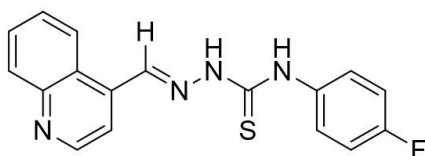
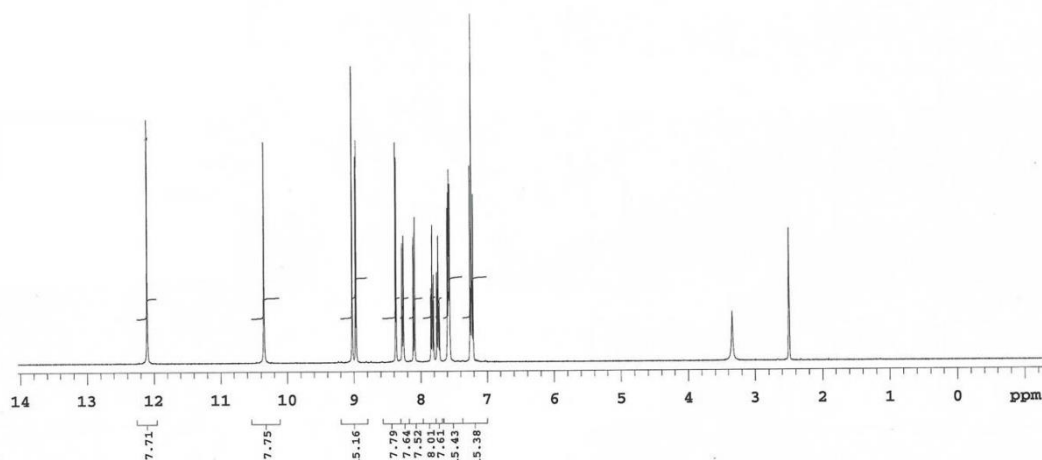
ZABKA, A. et al. The effects of anti-DNA topoisomerase II drugs, etoposide and ellipticine, are modified in root meristem cells of *Allium cepa* by MG132, an inhibitor of 26S proteasomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 72-82, 2015.

ZHU, J. et al. 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**, v. 124, p. 78-83, 2014.

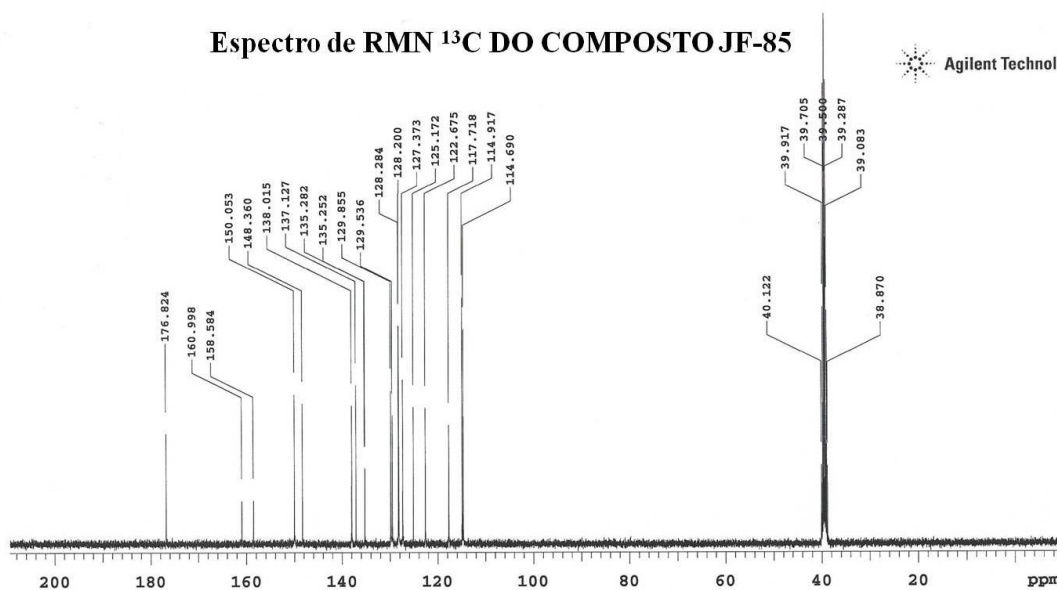
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN  $^1\text{H}$  E RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ,  
INFRAVERMELHO E MASSAS DOS DERIVADOS LqIT/JFs

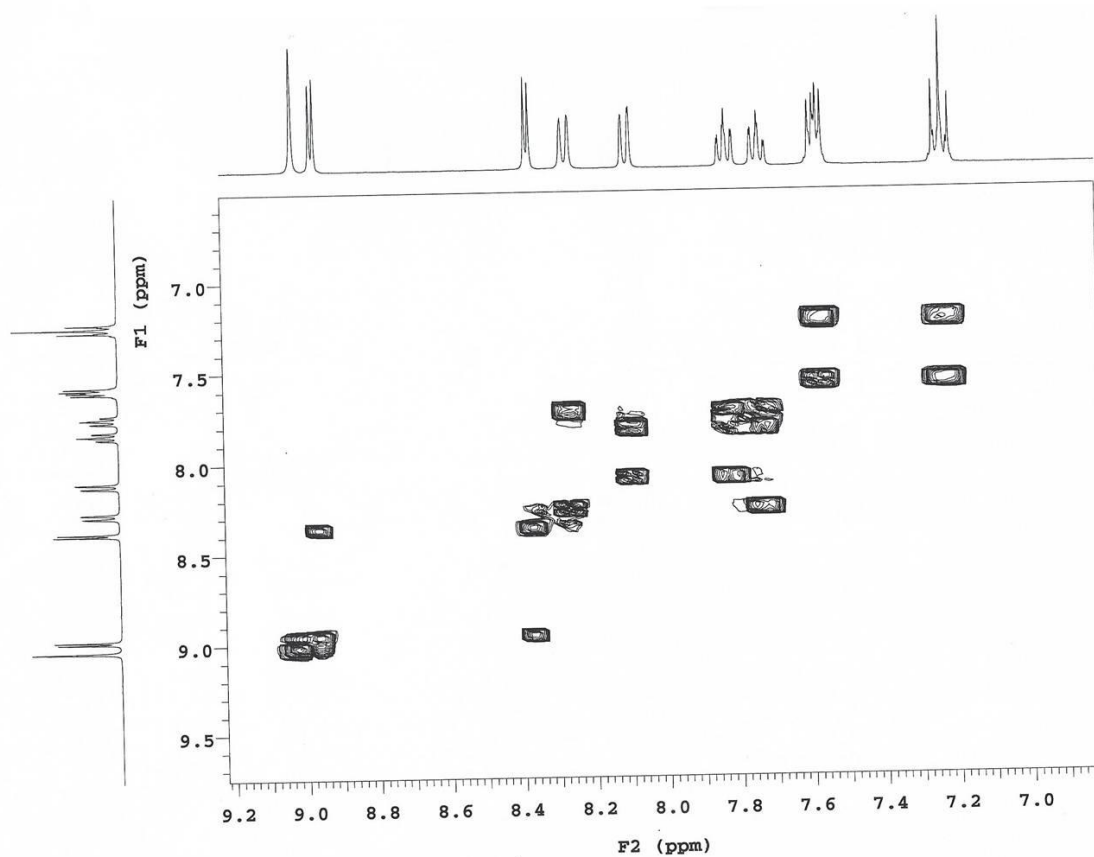


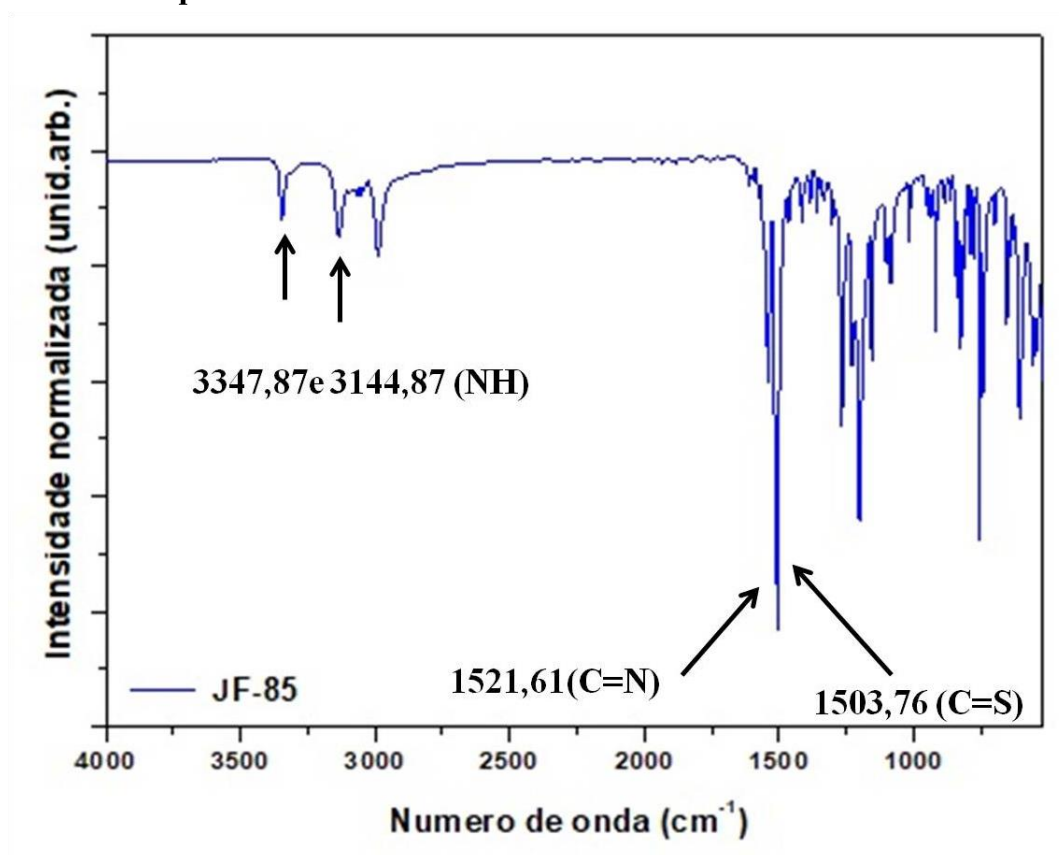
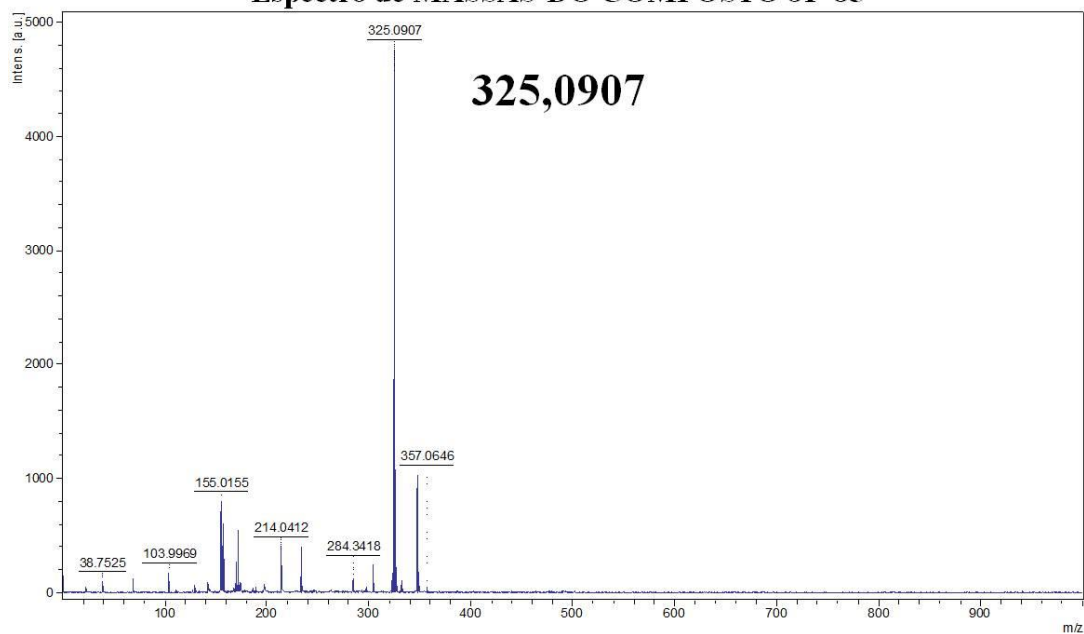
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-85

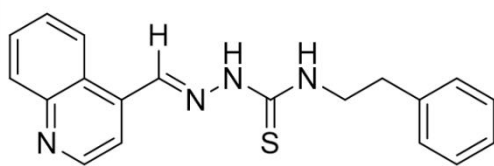


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-85

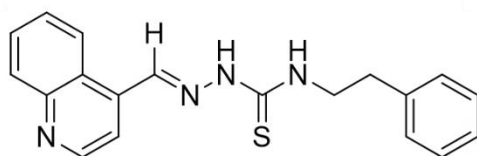
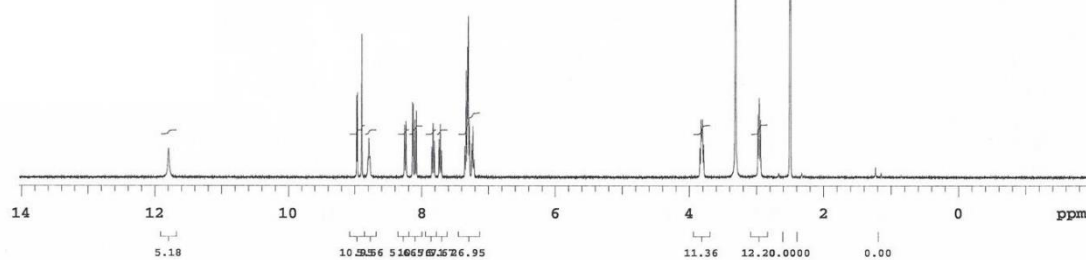


**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ DO COMPOSTO JF-85**

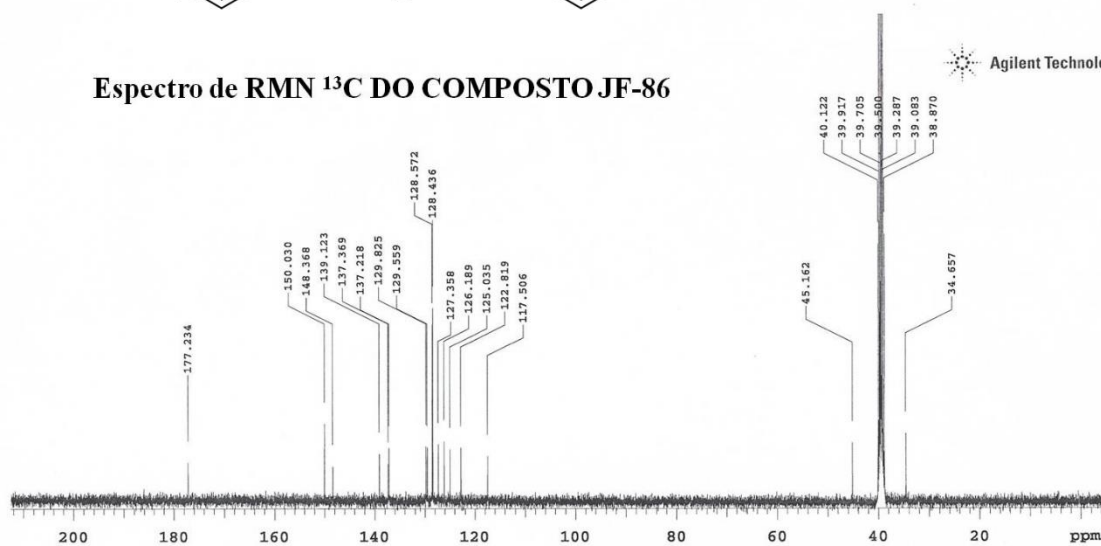
**Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-85****Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-85**

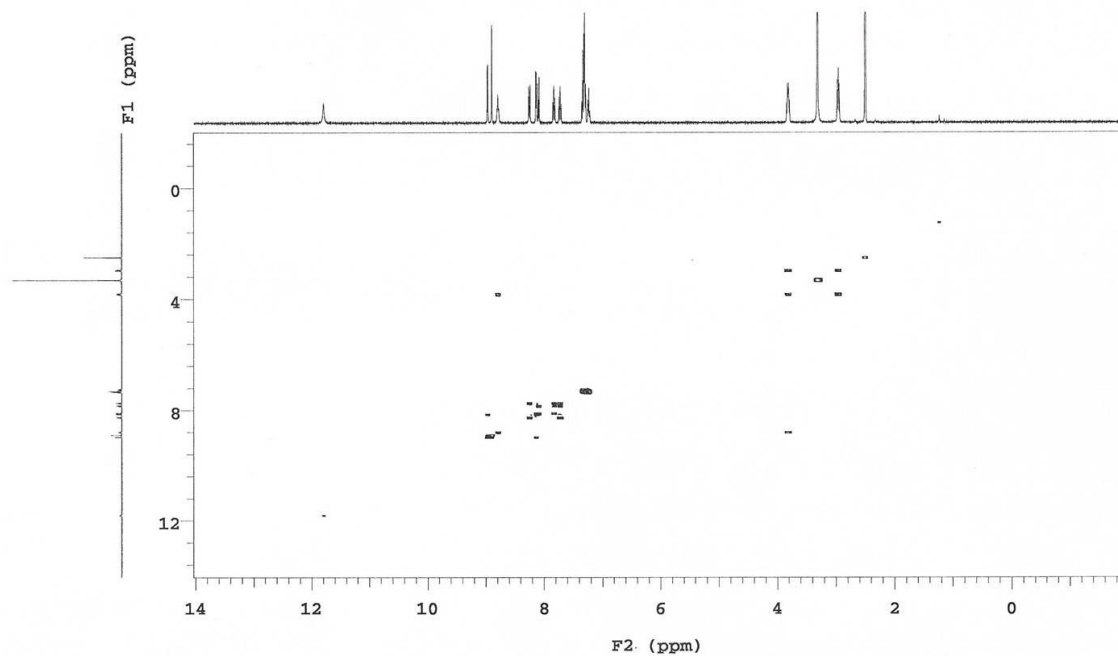
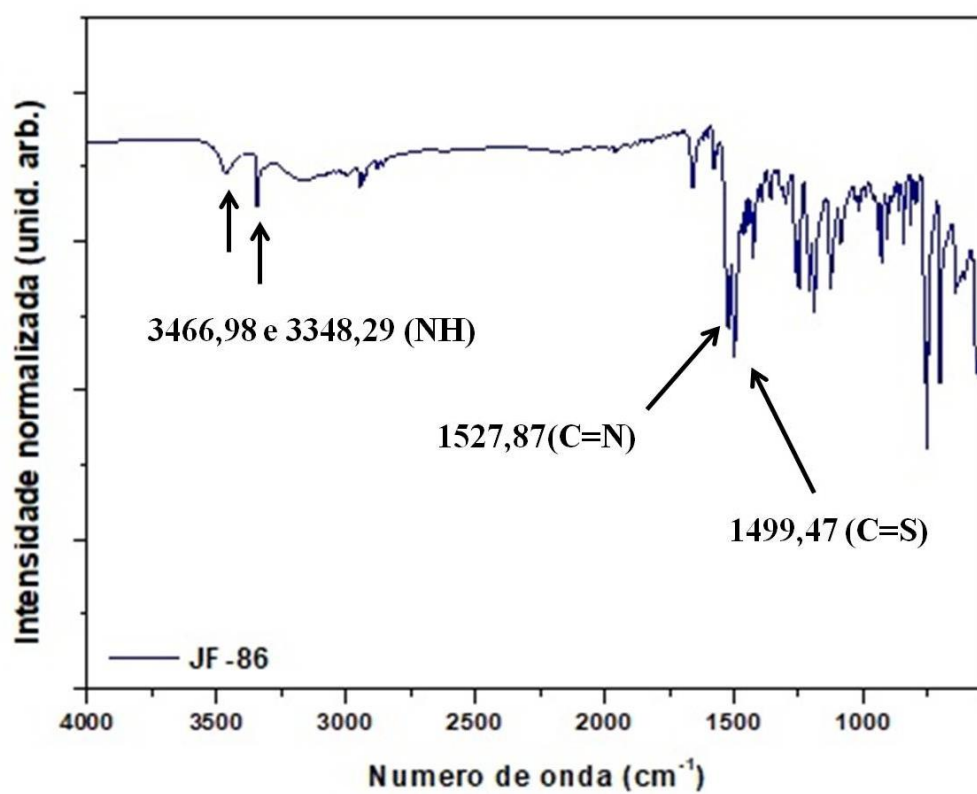


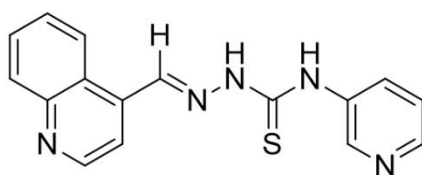
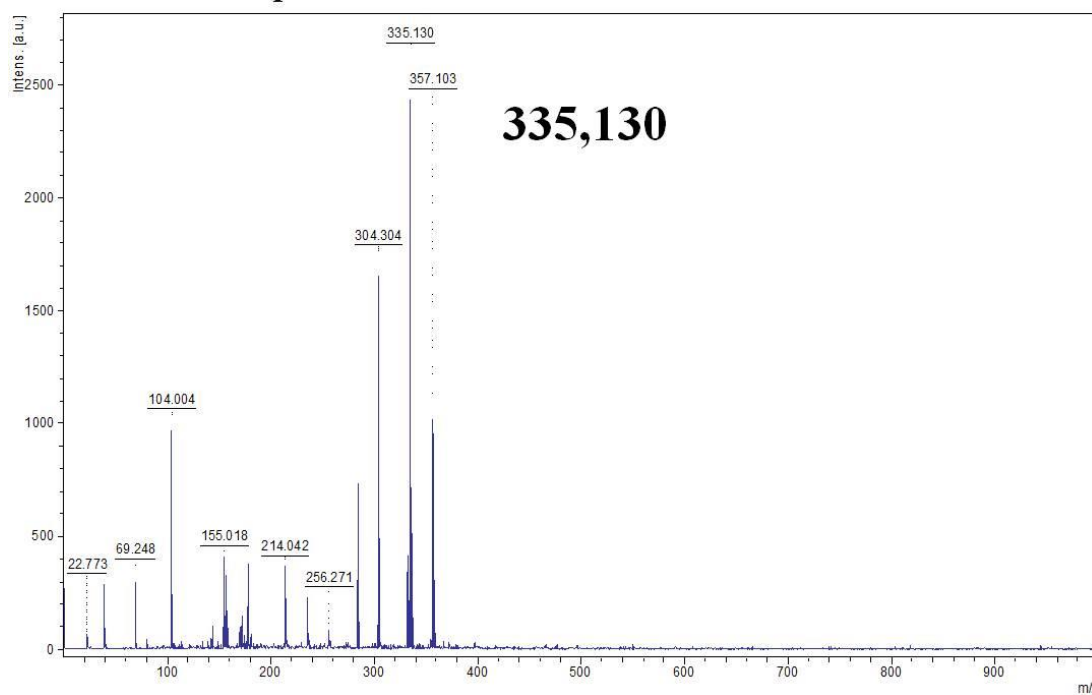
Agilent Technologies

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-86**

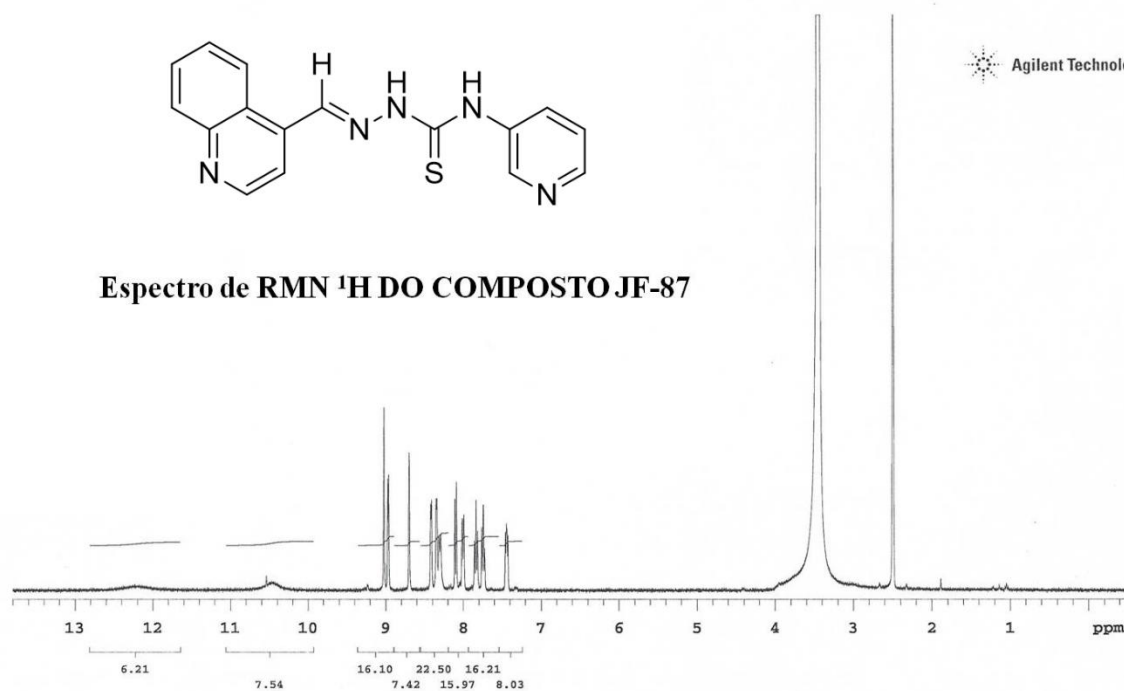
Agilent Technologies

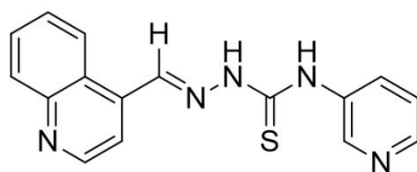
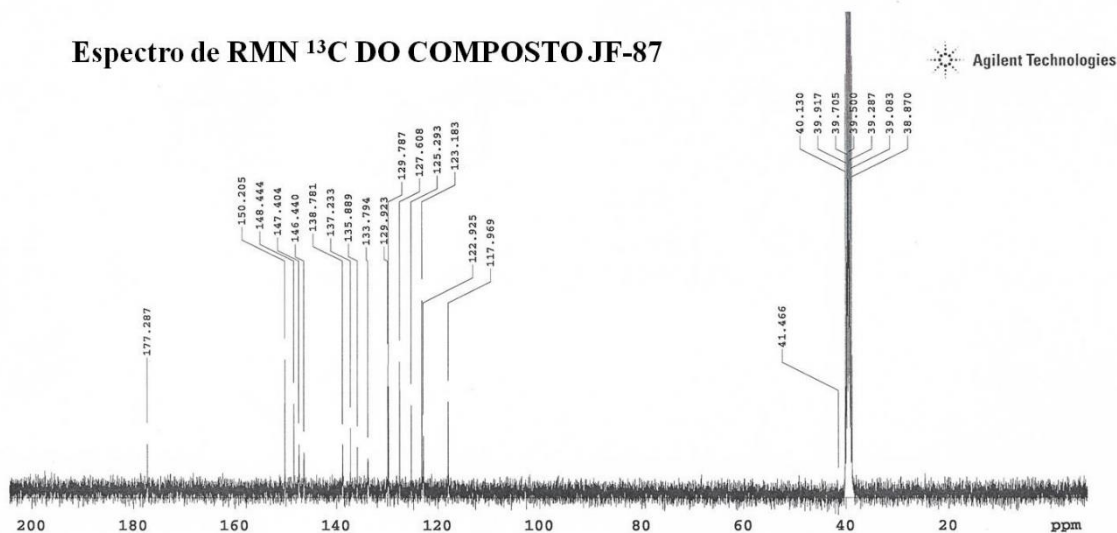
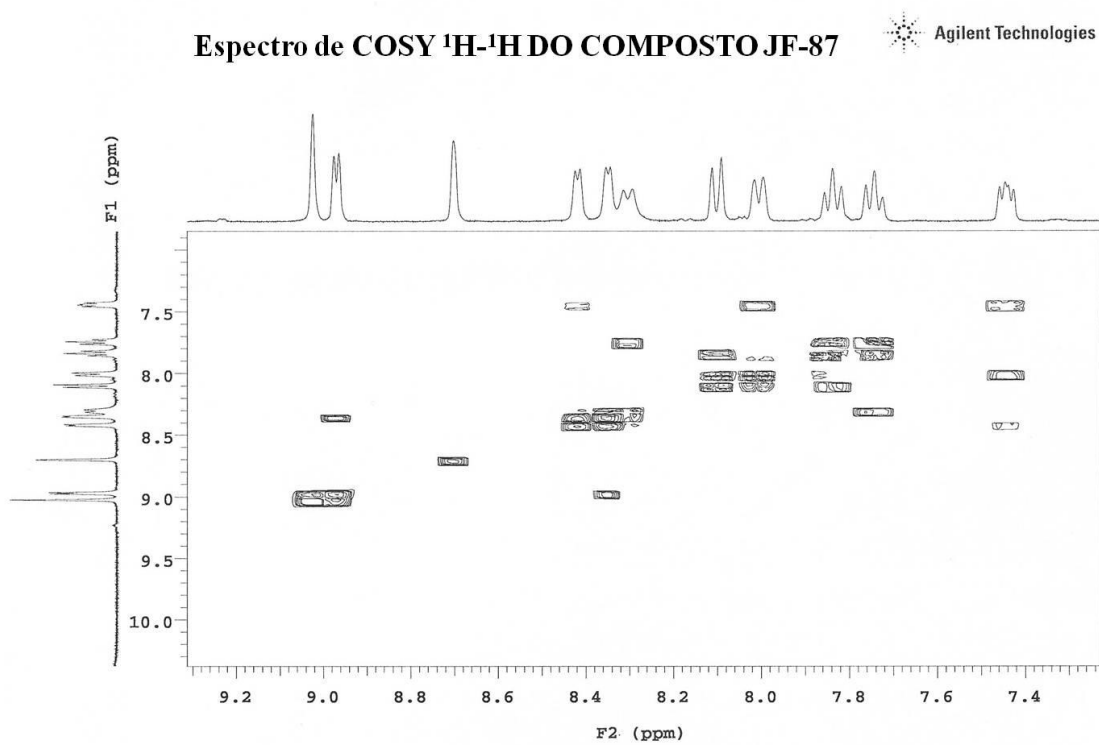
**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-86**

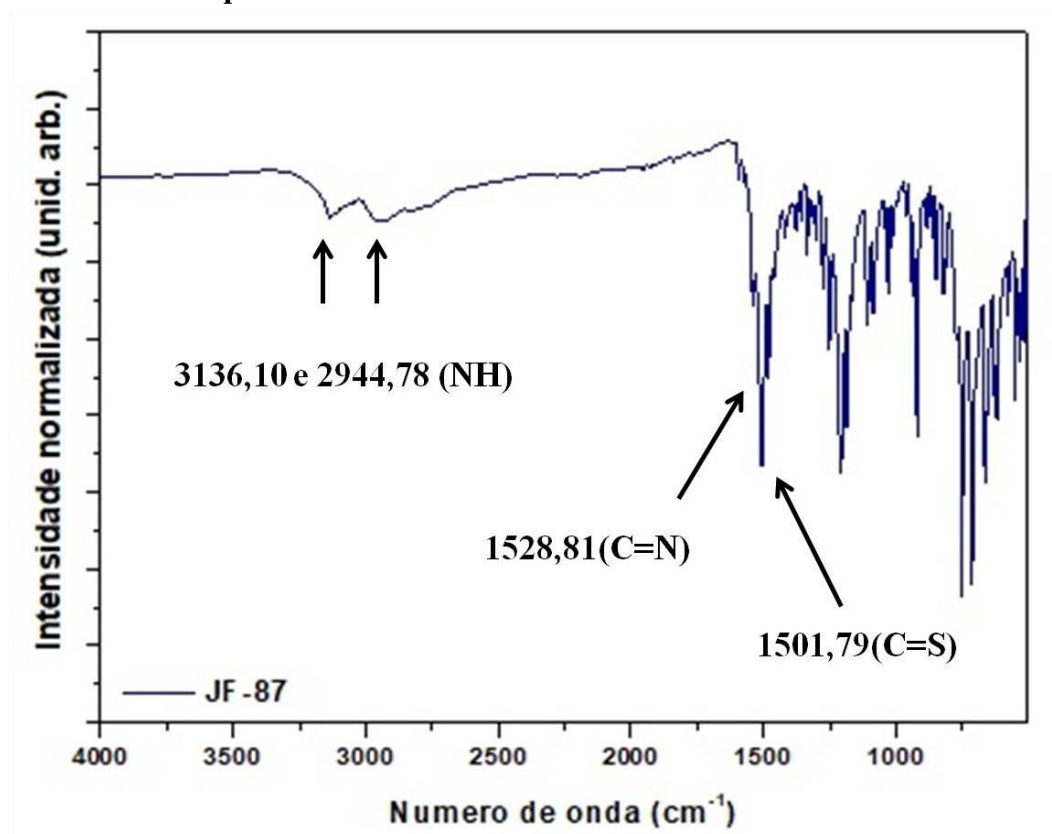
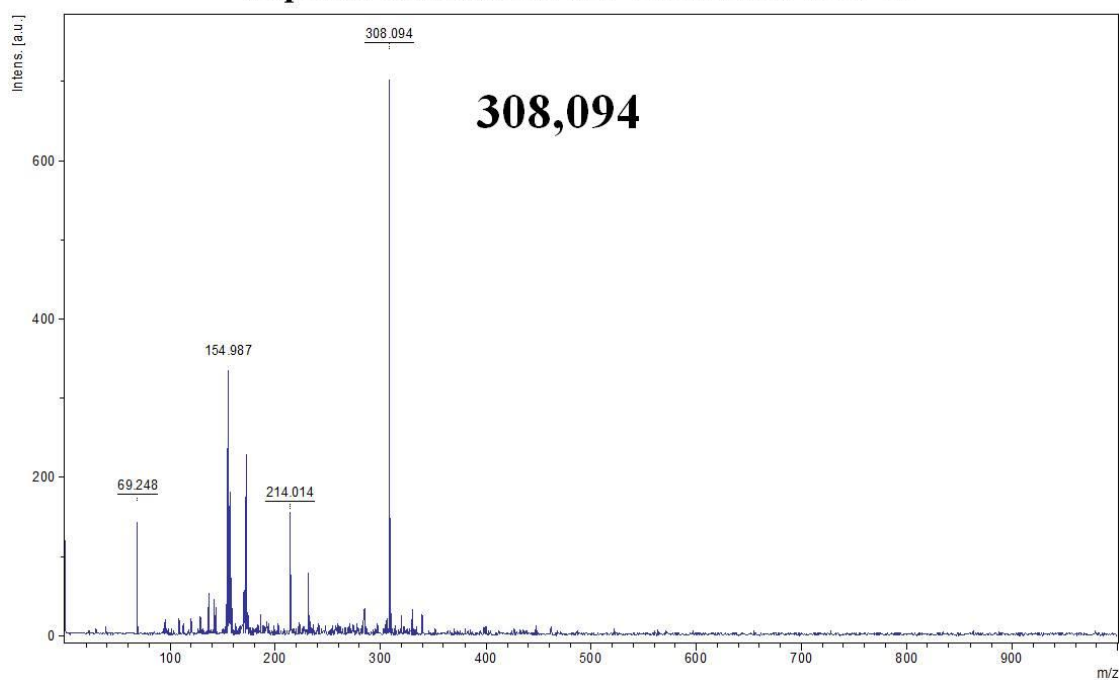
**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-86****Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-86**

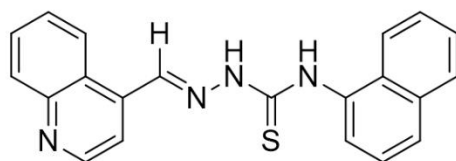
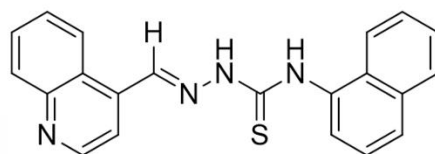
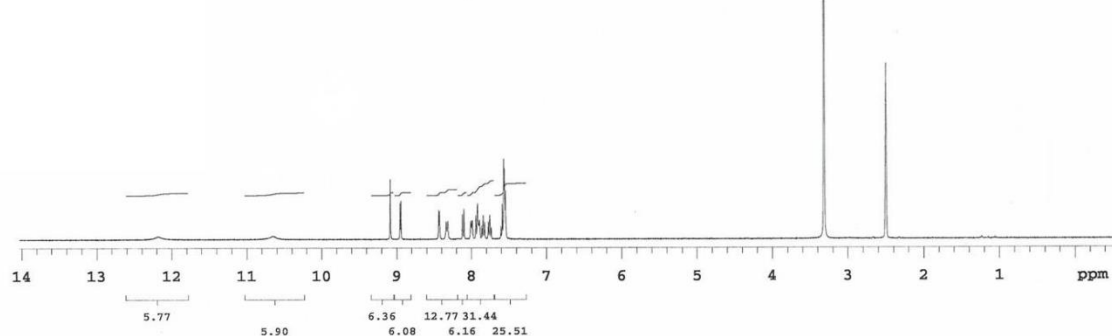
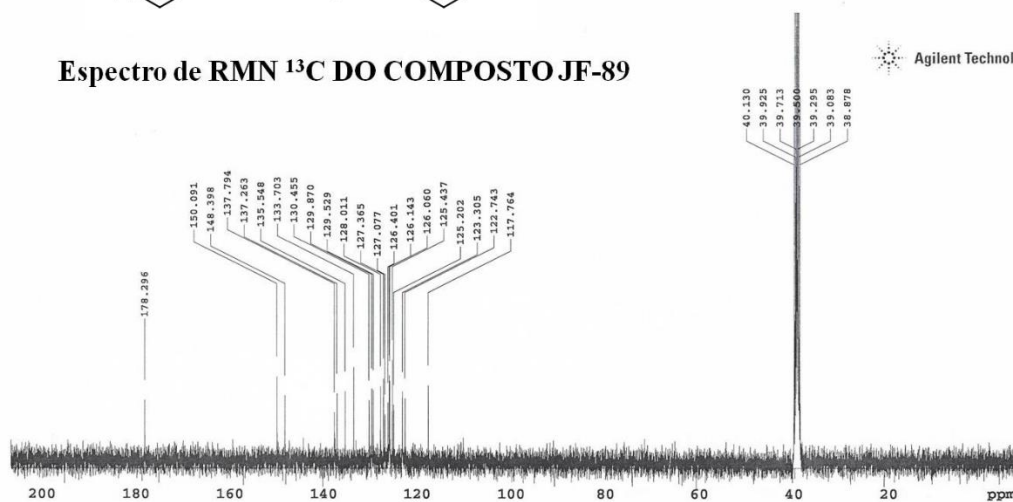
**Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-86**

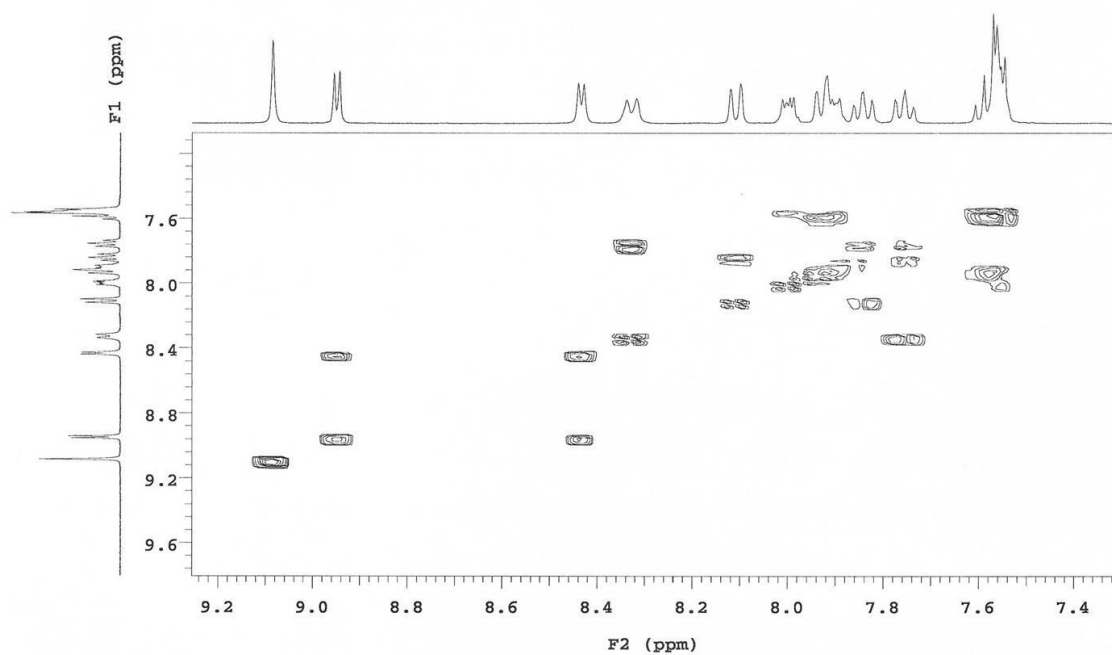
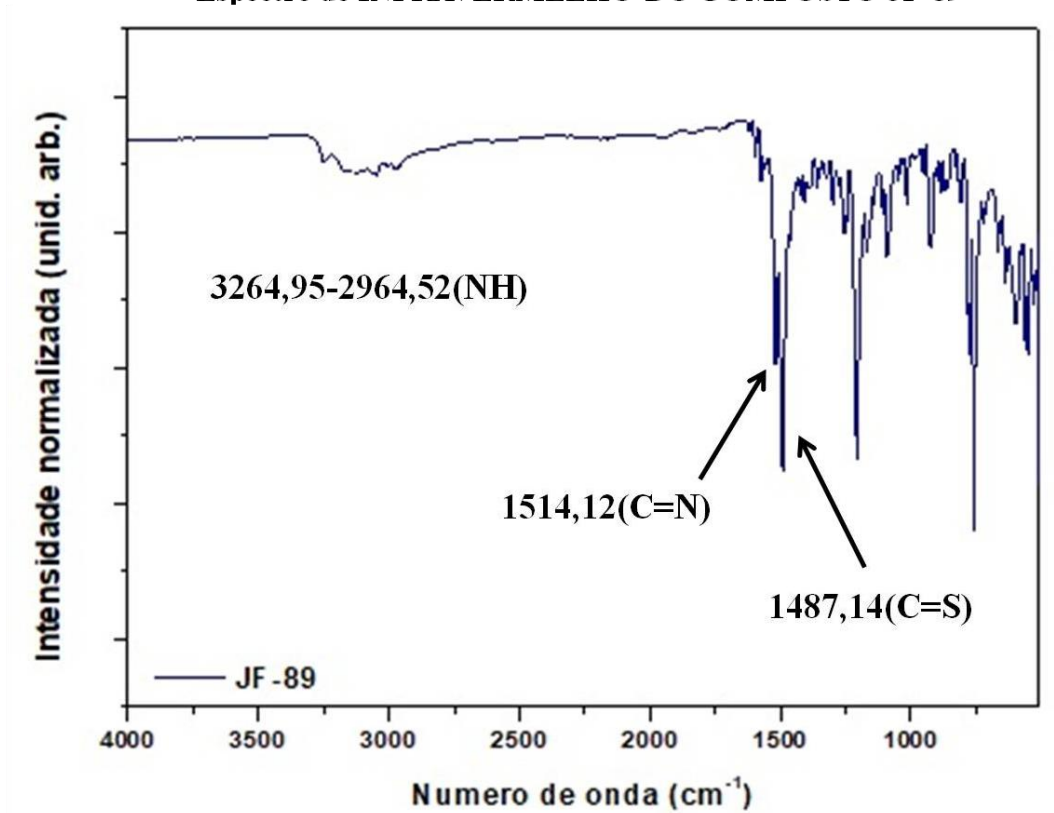
Agilent Technologies

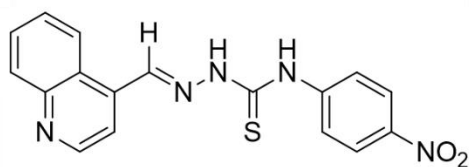
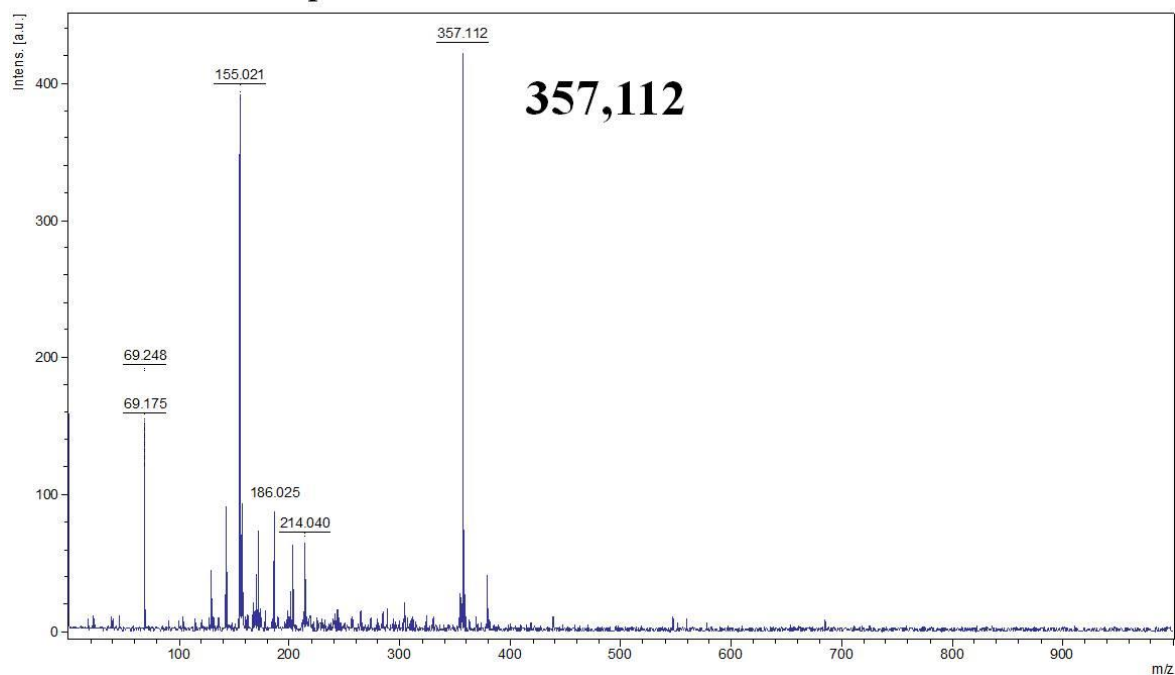
**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-87**

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-87Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-87

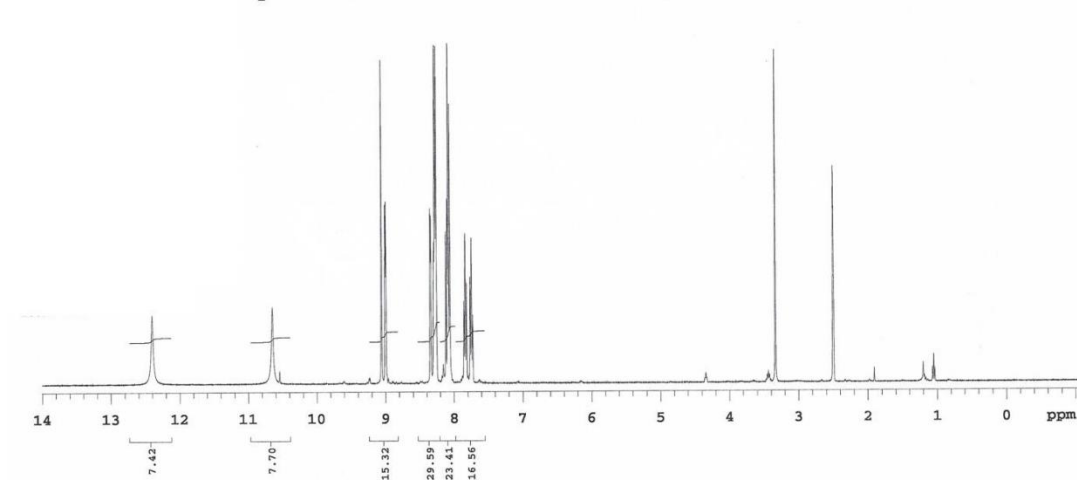
**Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-87****Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-87**

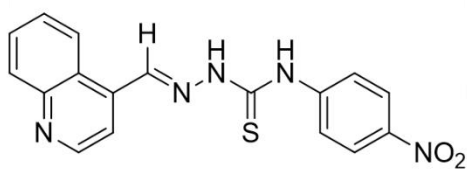
 Agilent Technologies**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-89** Agilent Technologies**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-89**

**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-89****Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-89**

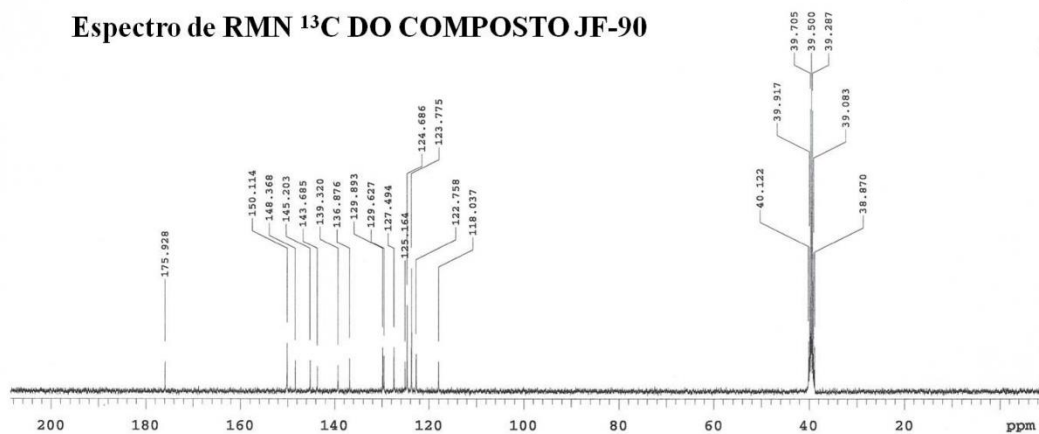
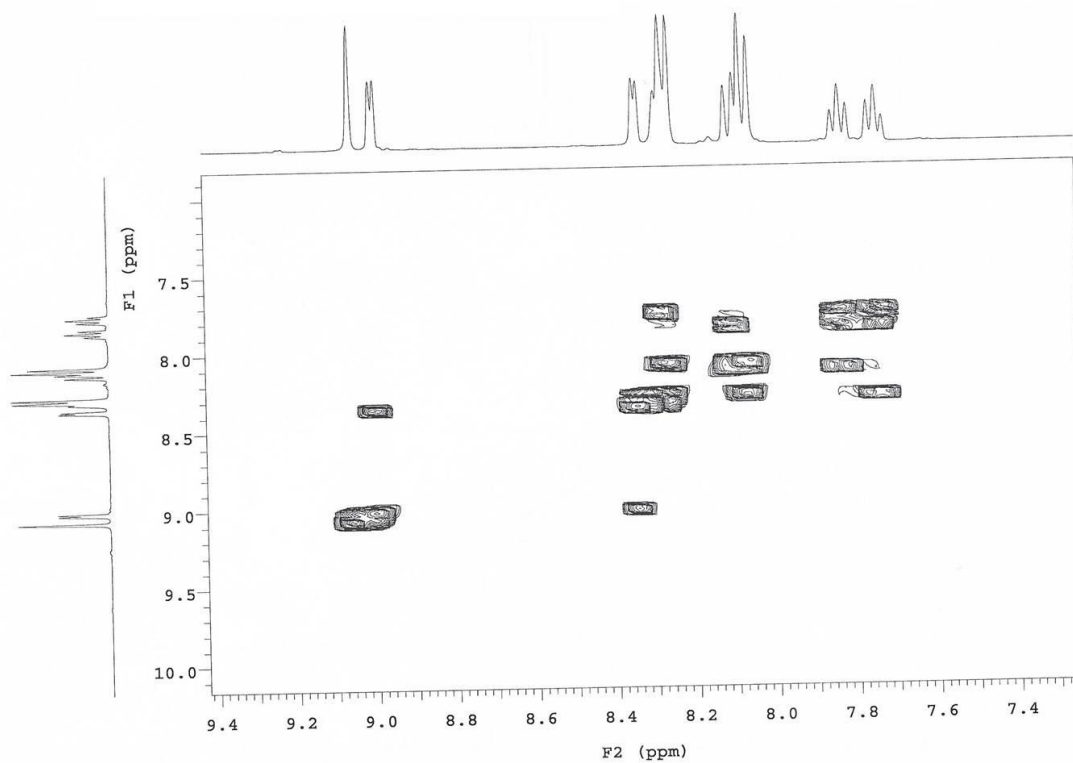
**Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-89**

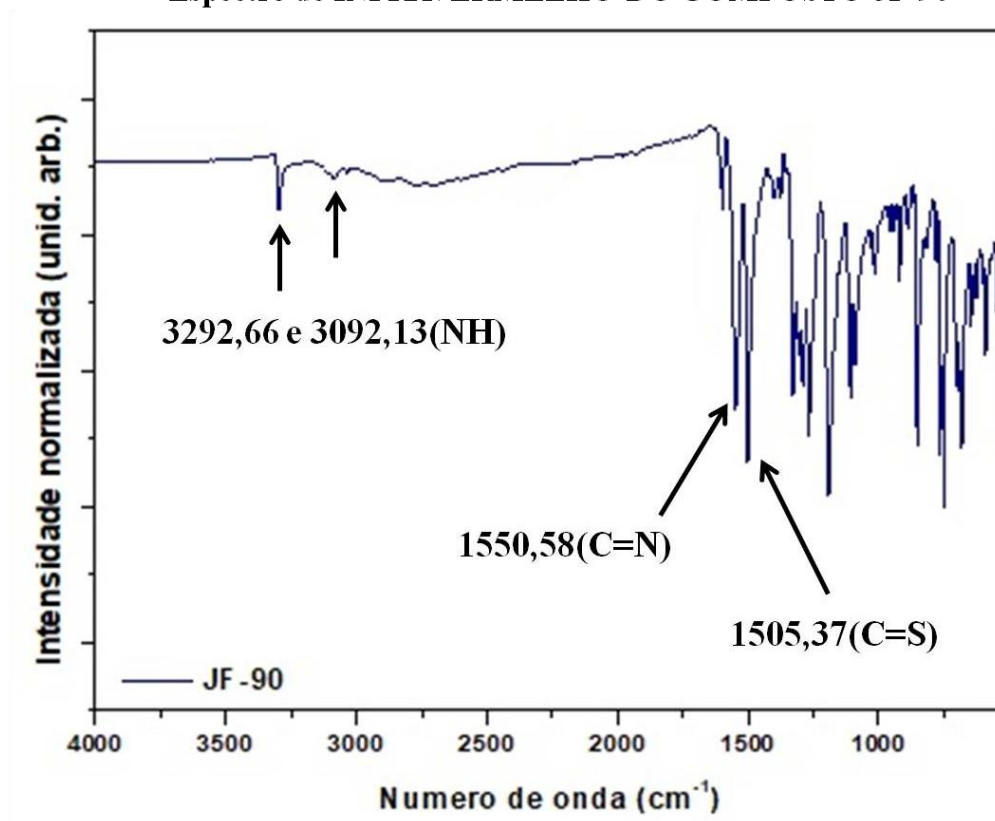
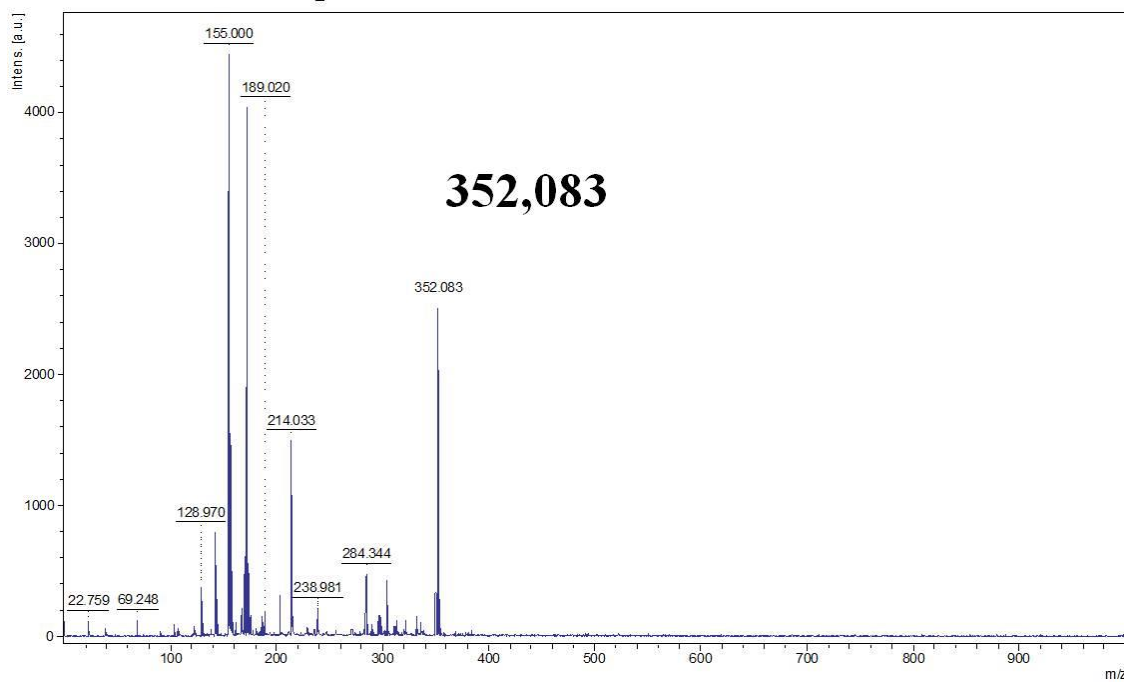
Agilent Technologies

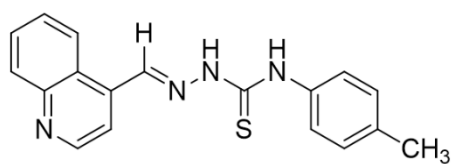
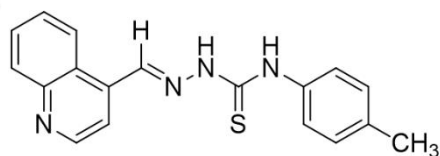
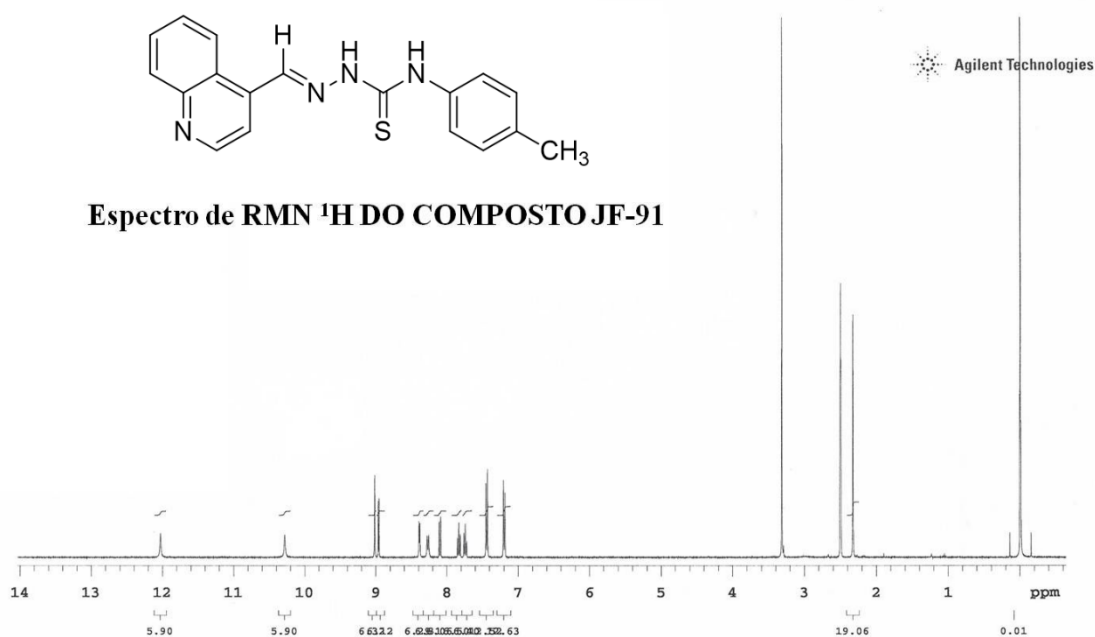
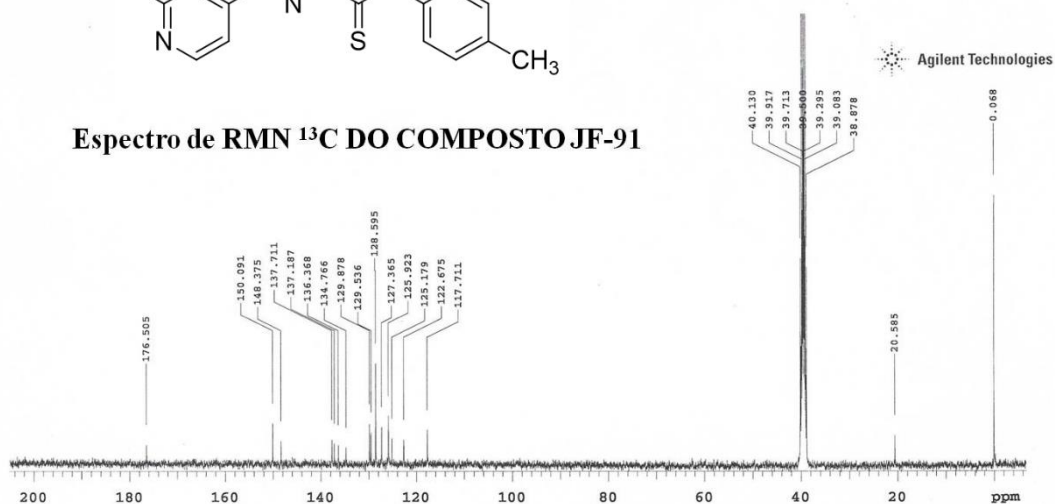
**Espectro de RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO JF-90**

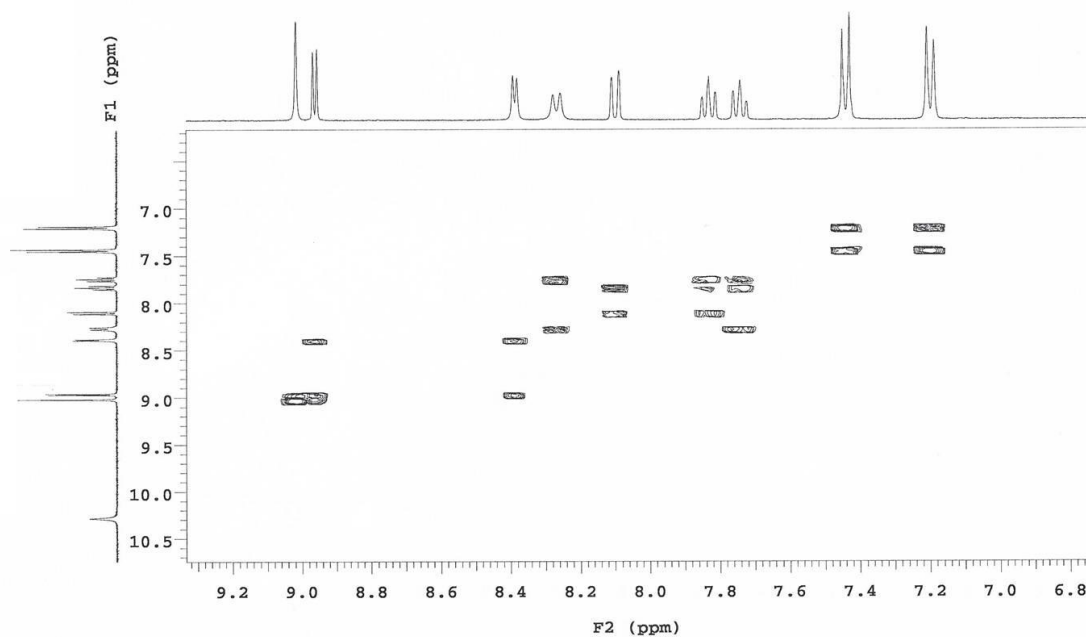


Agilent Technologies

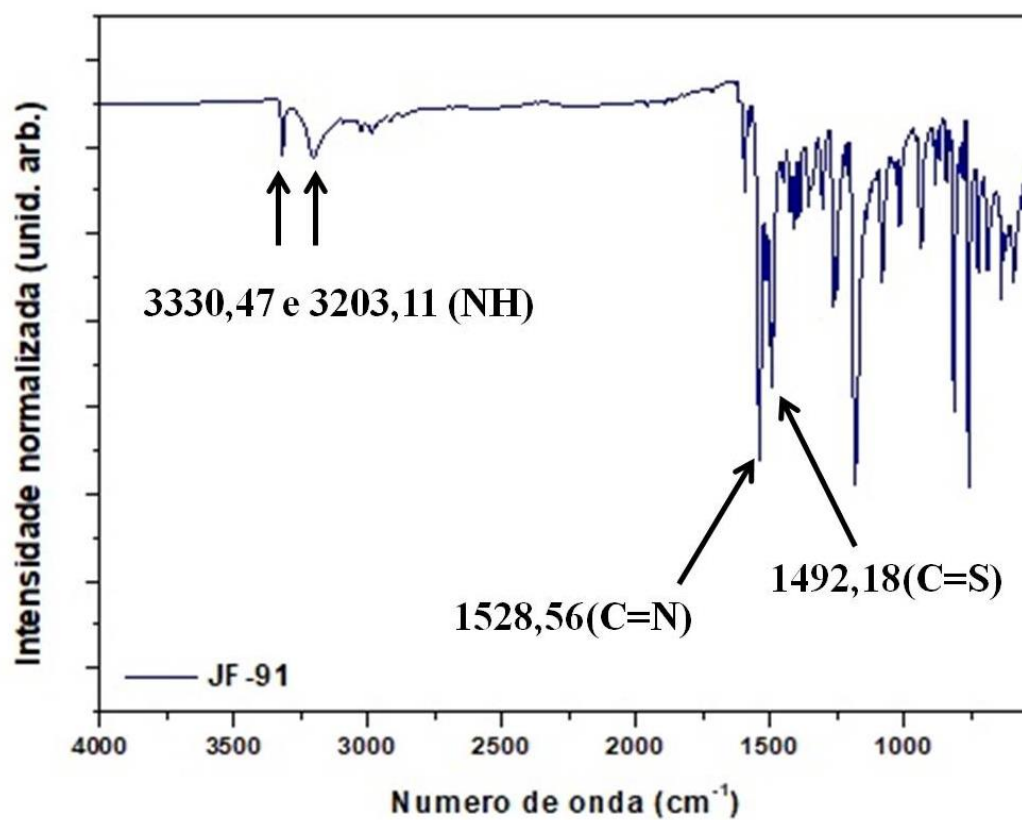
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-90Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-90

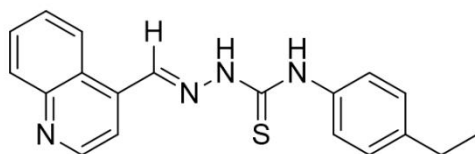
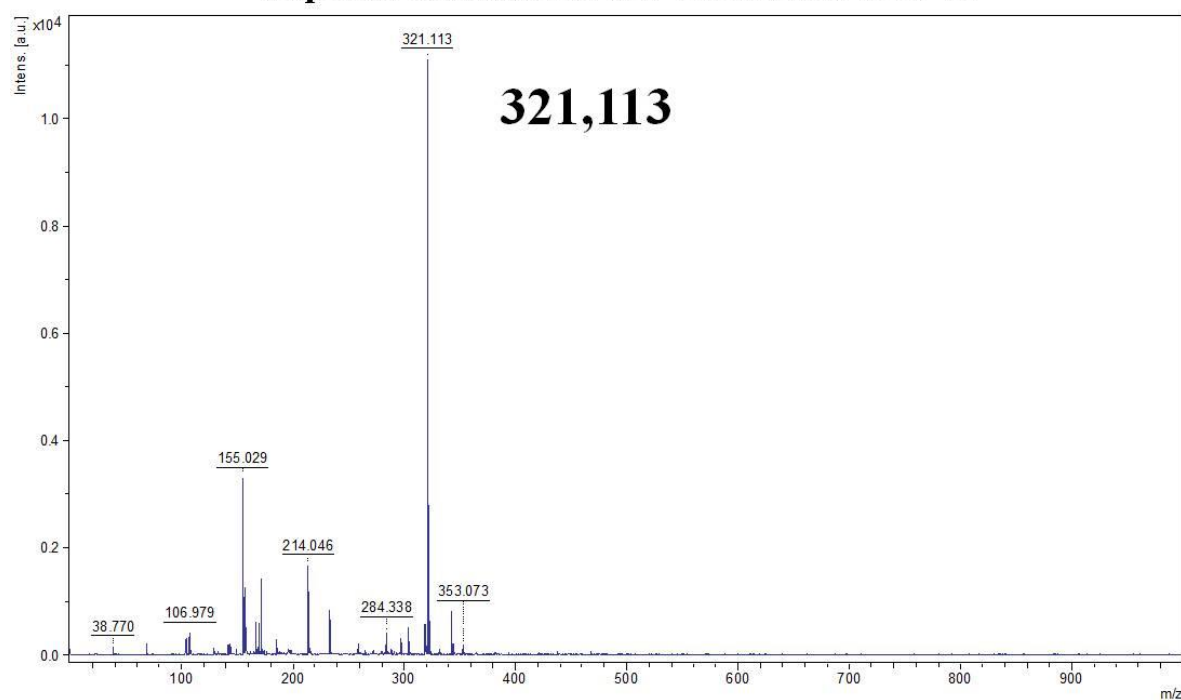
**Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-90****Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-90**

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-91****Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-91**

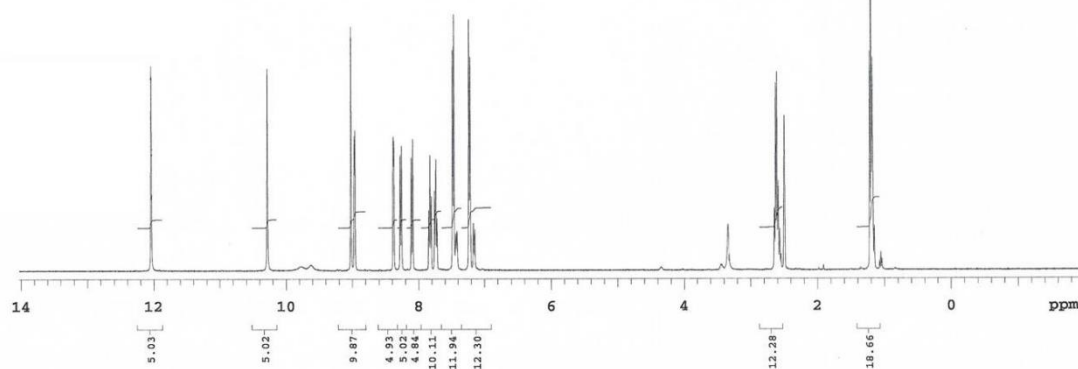
Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-91

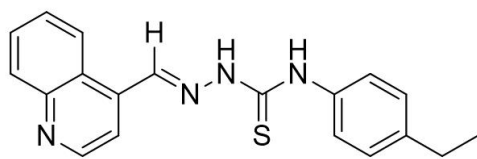
## Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-91



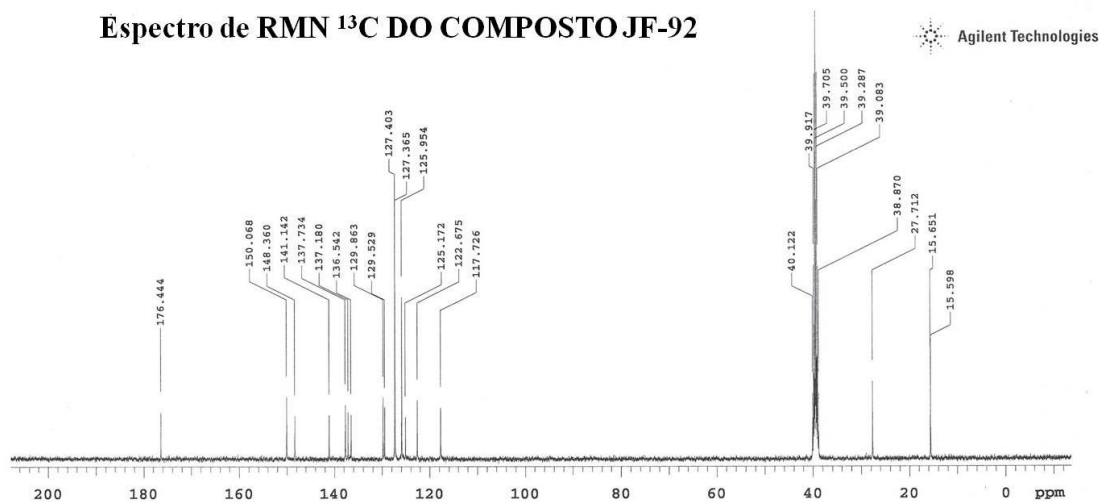
**Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-91**

Agilent Technologies

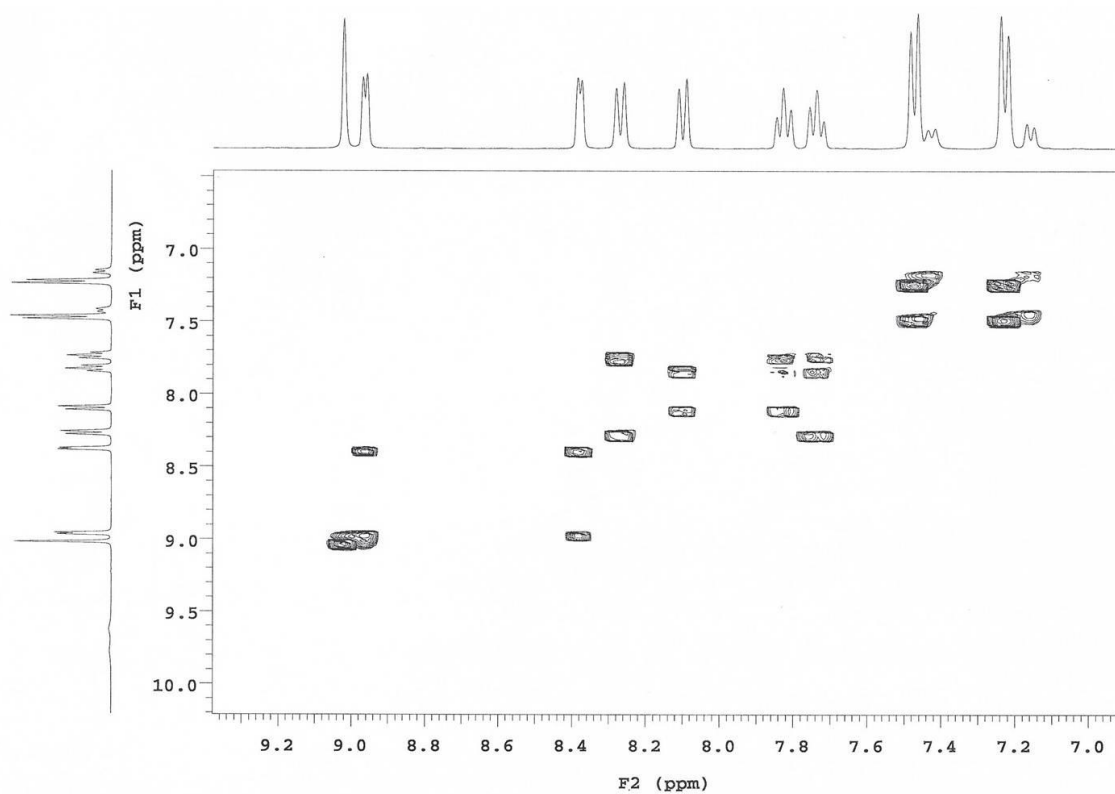
**Espectro de RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO JF-92**



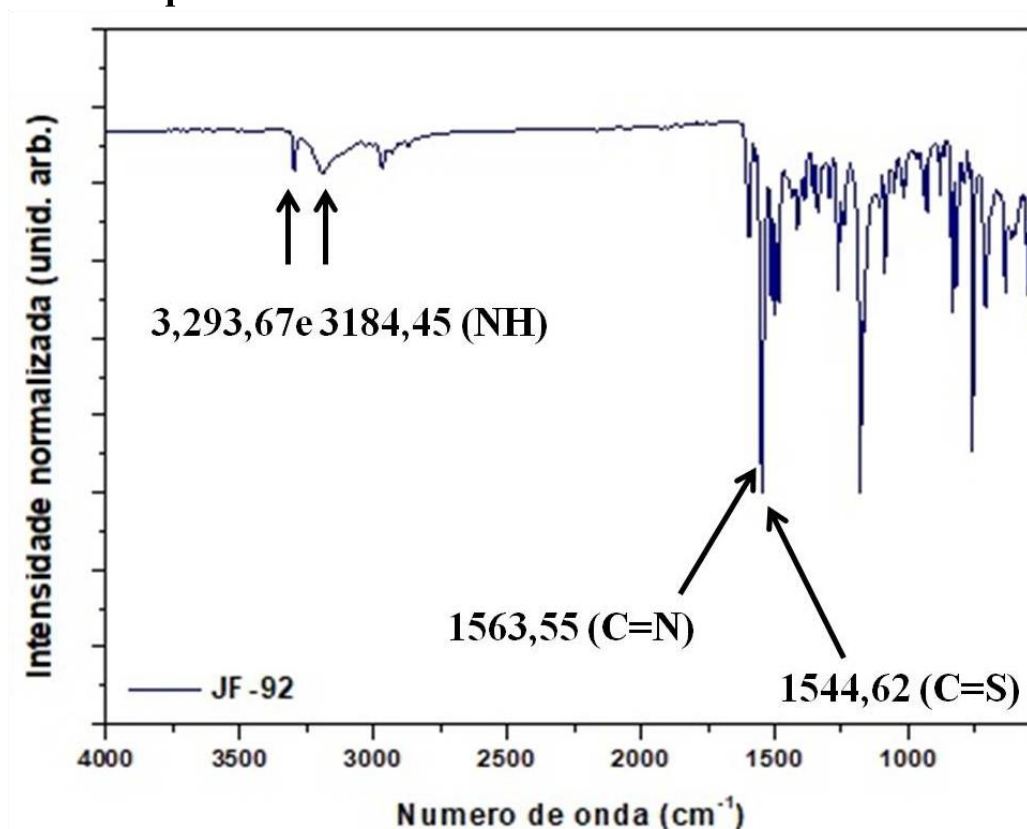
**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-92**



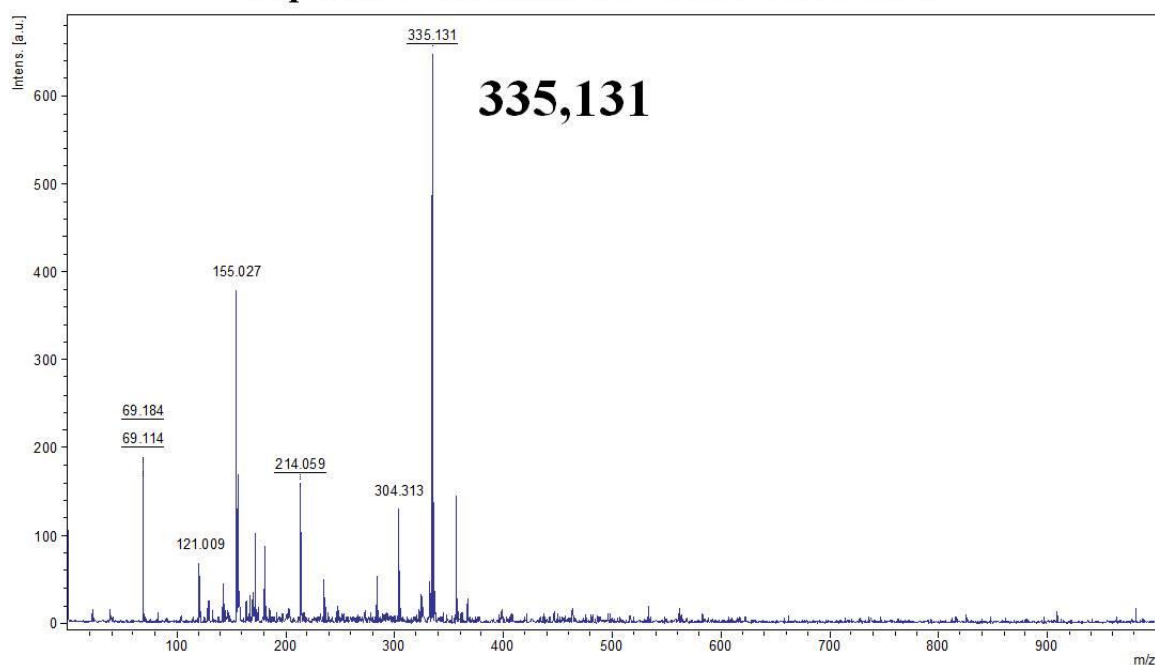
**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-92**

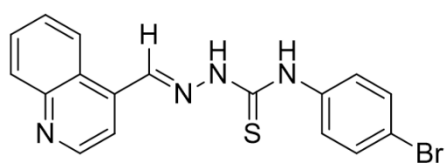
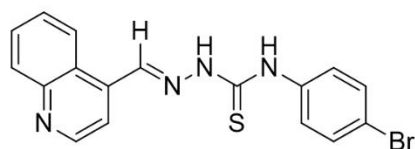
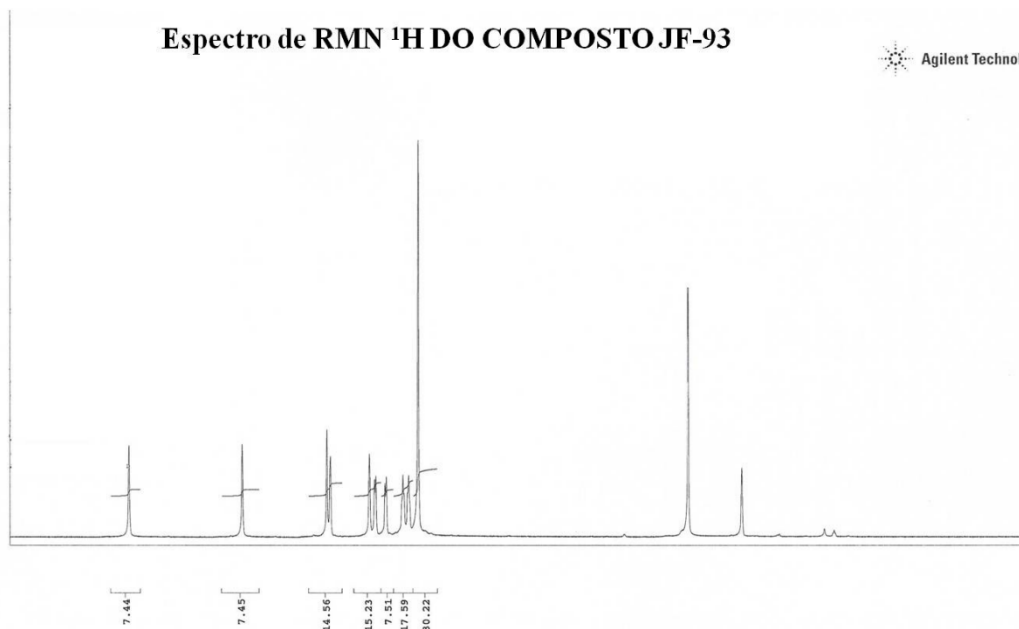
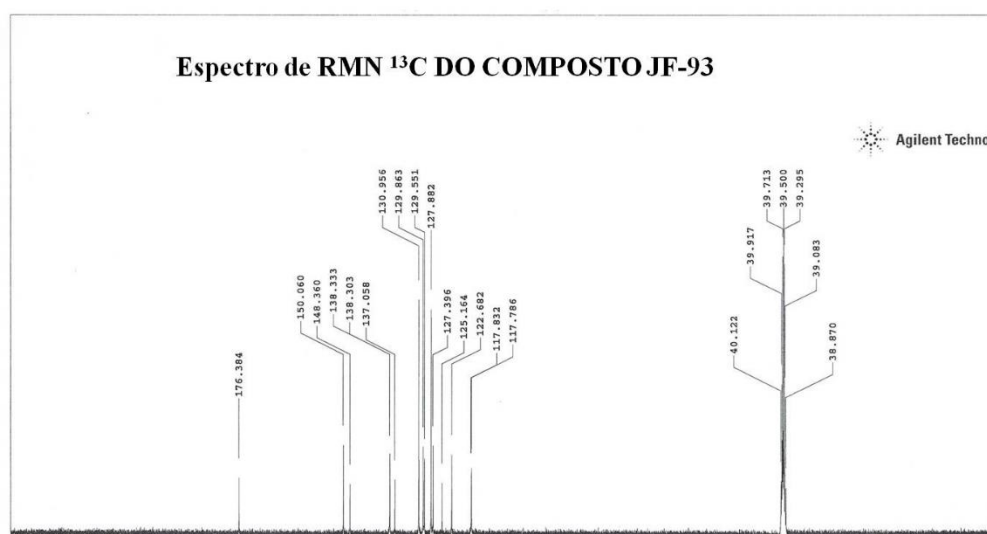


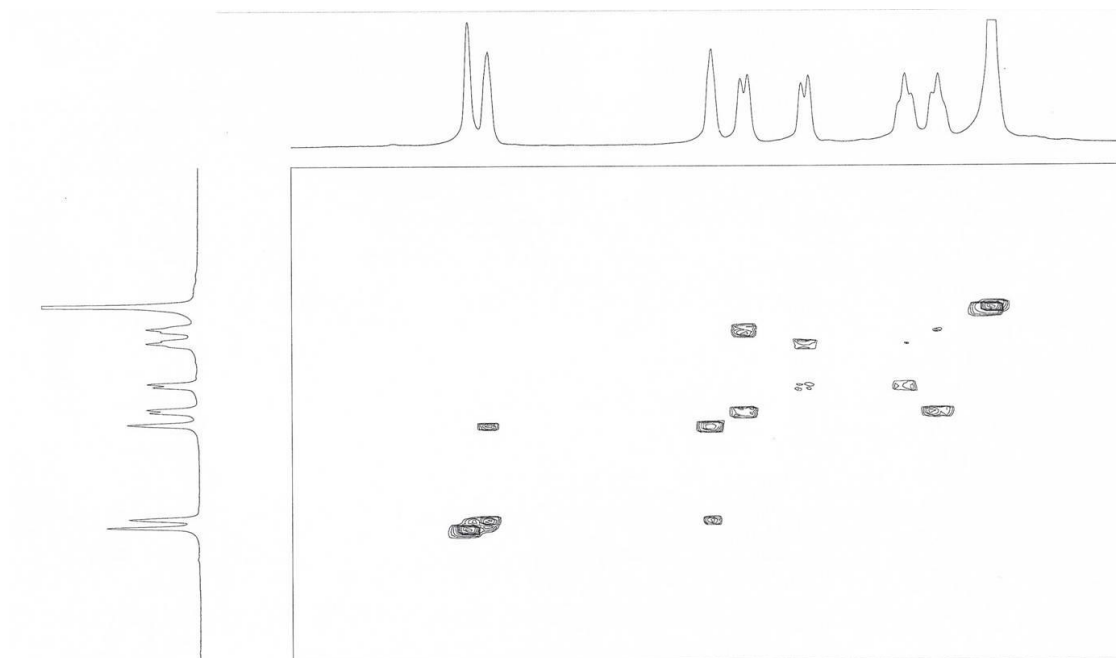
### Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-92



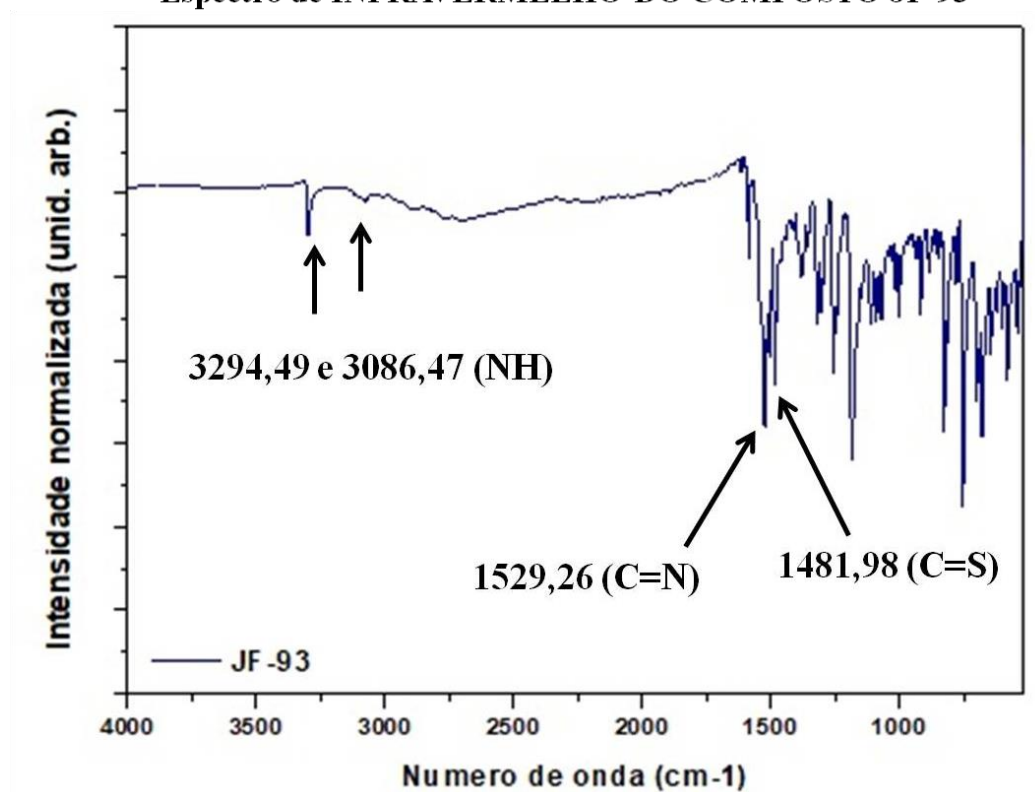
### Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-92

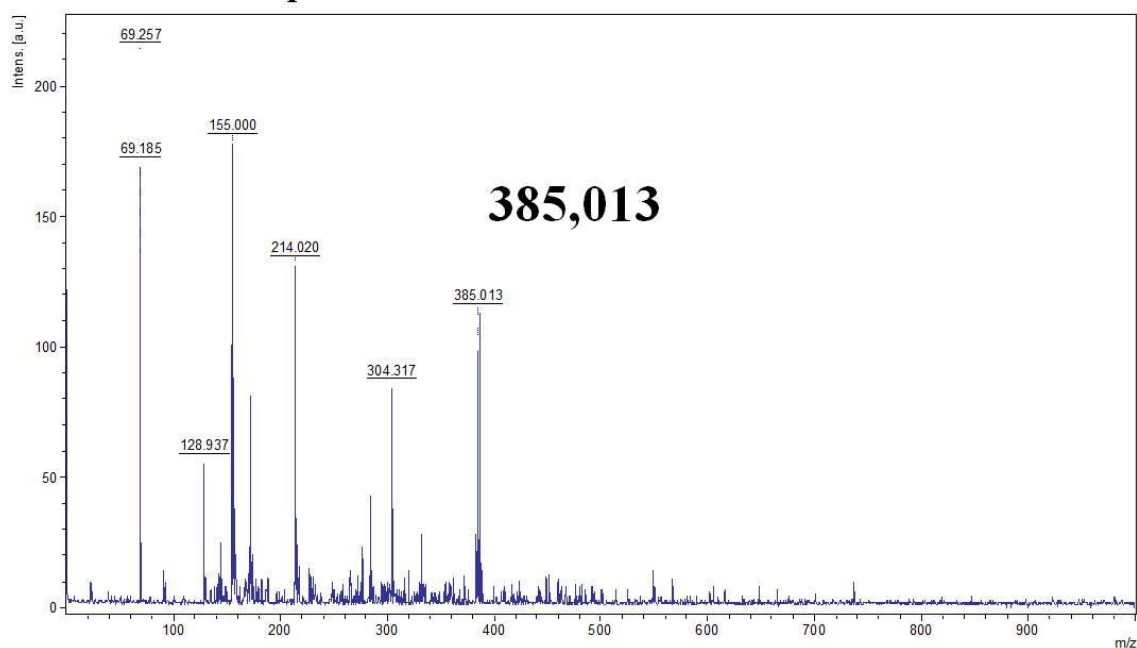


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-93 Agilent TechnologiesEspectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-93 Agilent Technologies

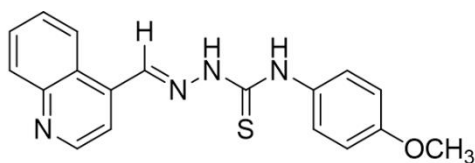
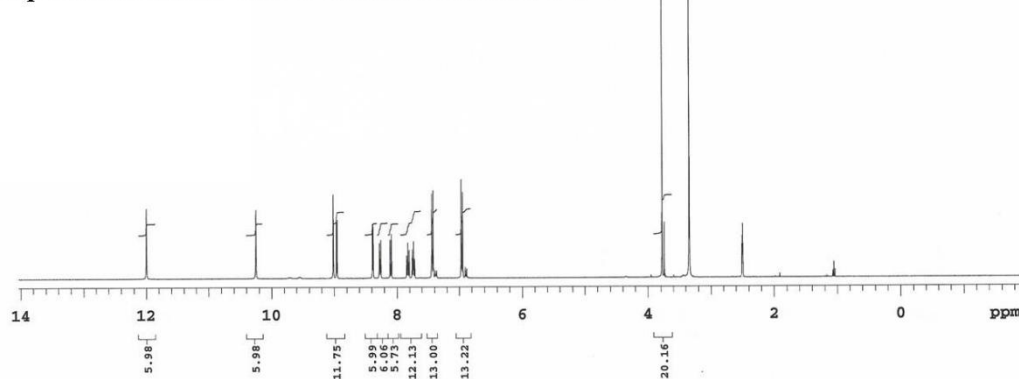
Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-93

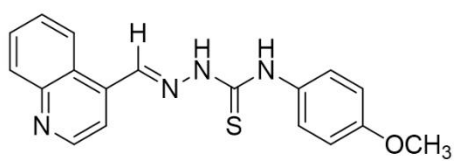
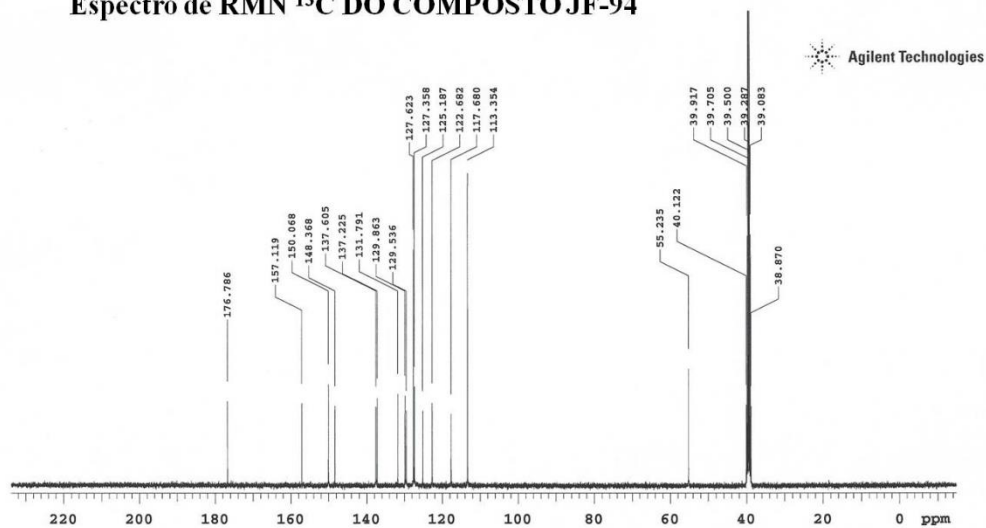
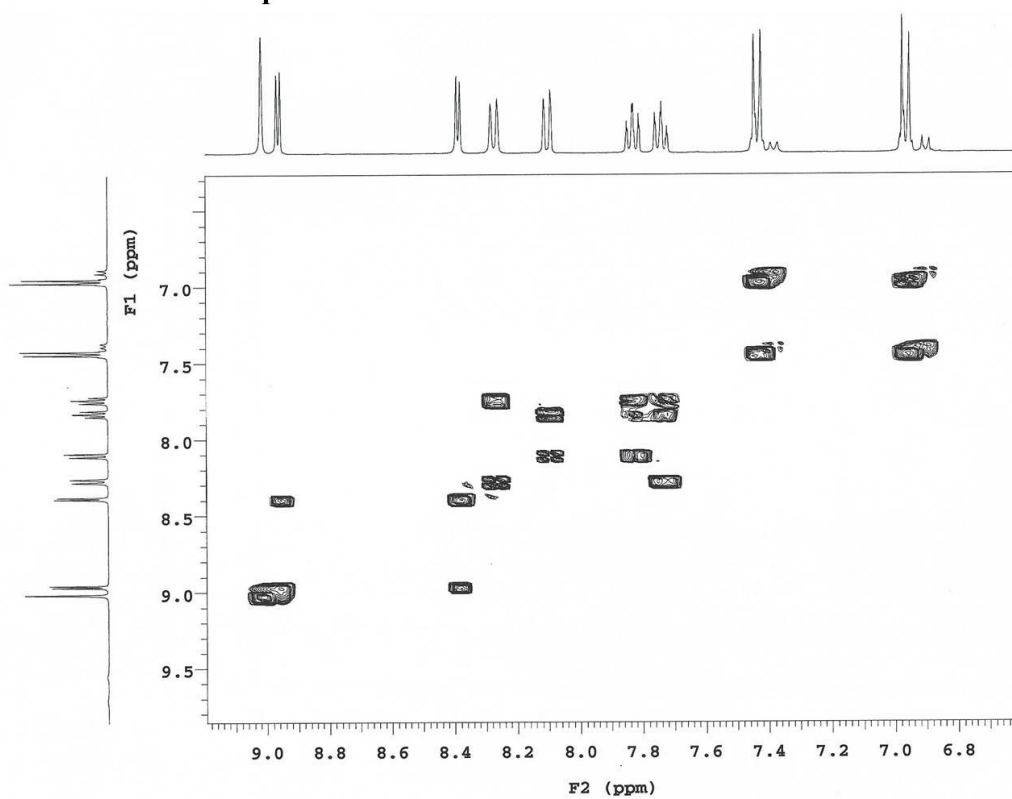
Espectro de INFRAVERMELHO DO COMPOSTO JF-93

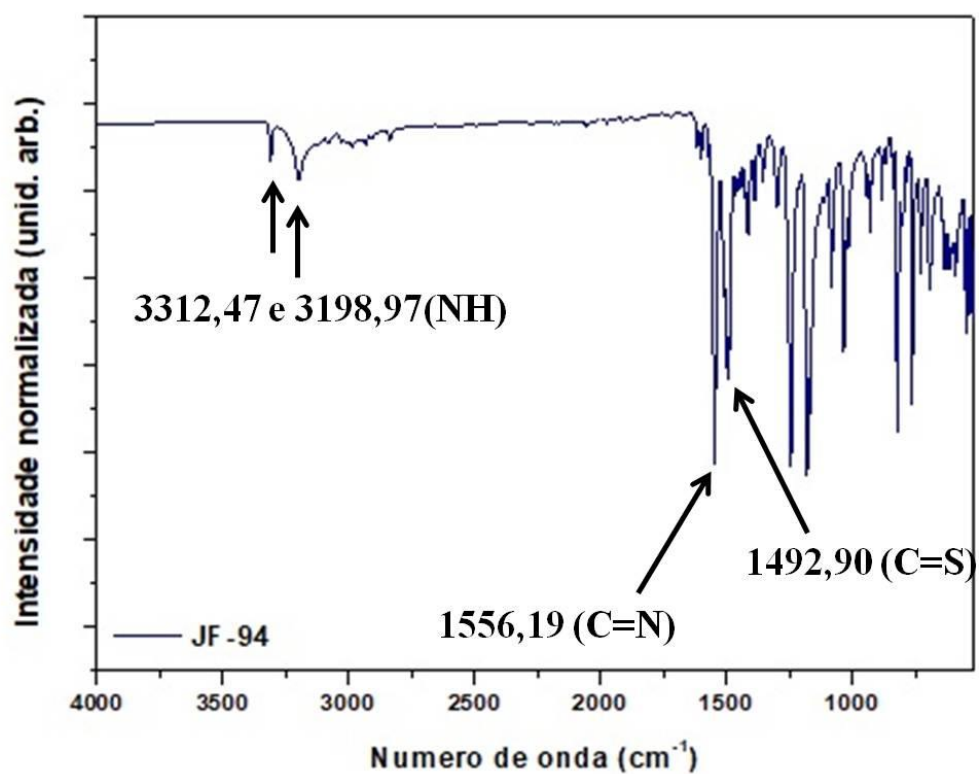


**Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-93**

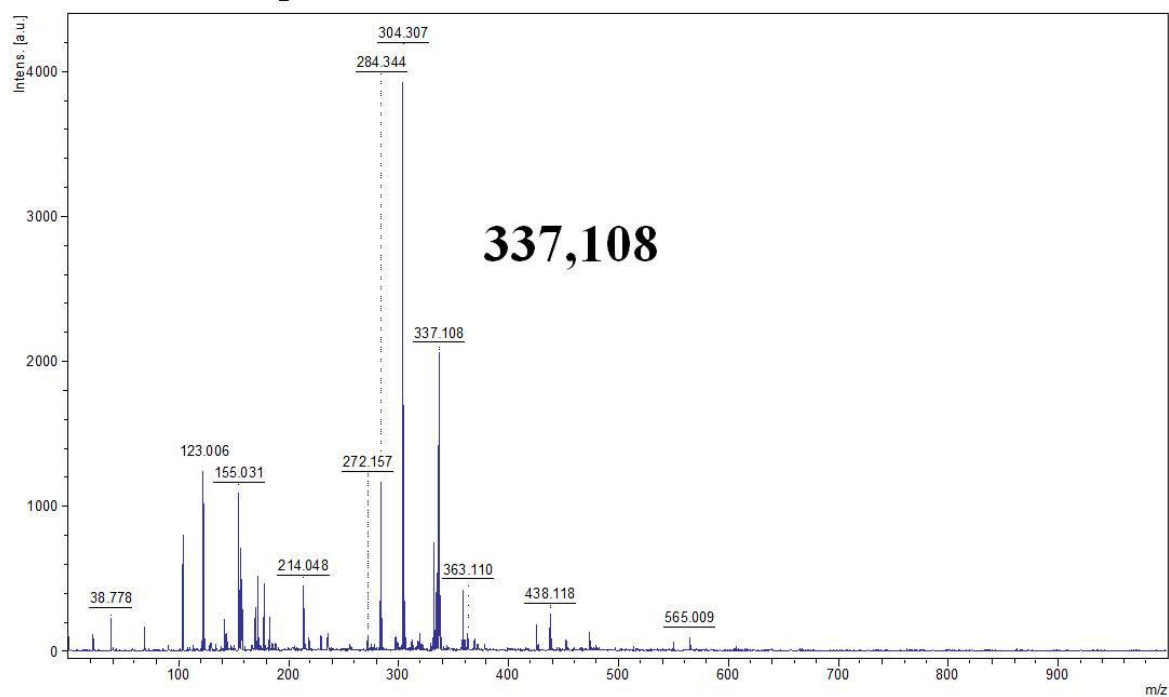
Agilent Technologies

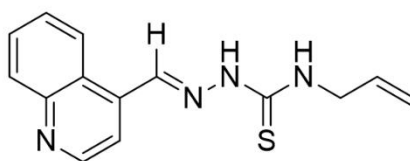
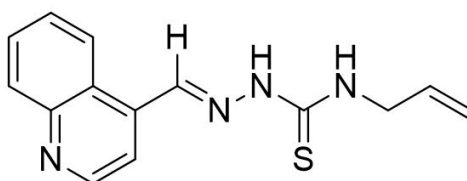
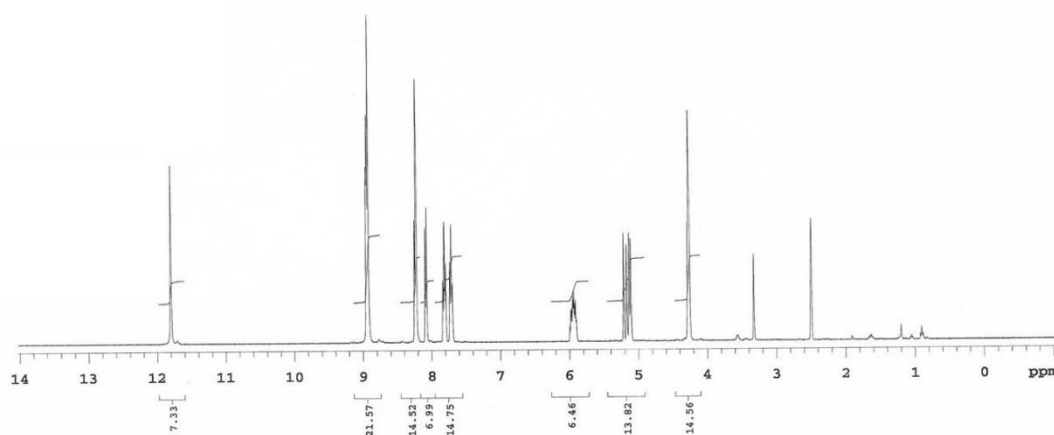
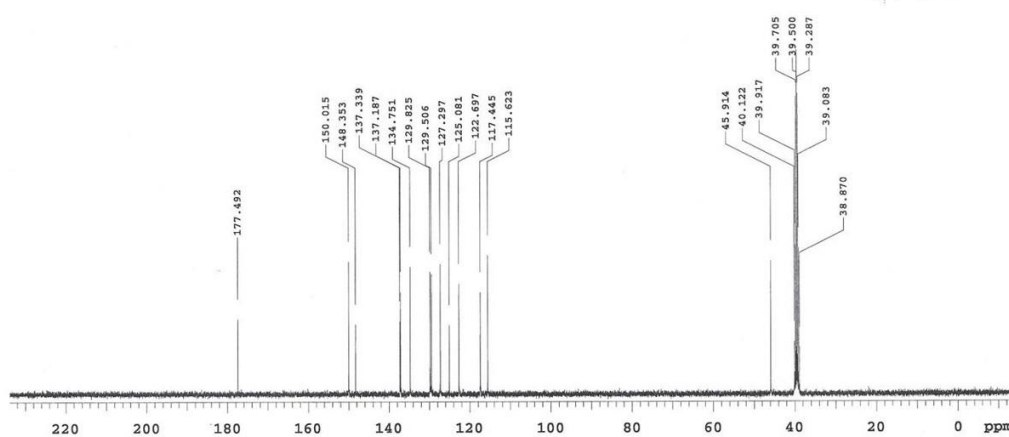
**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-94**

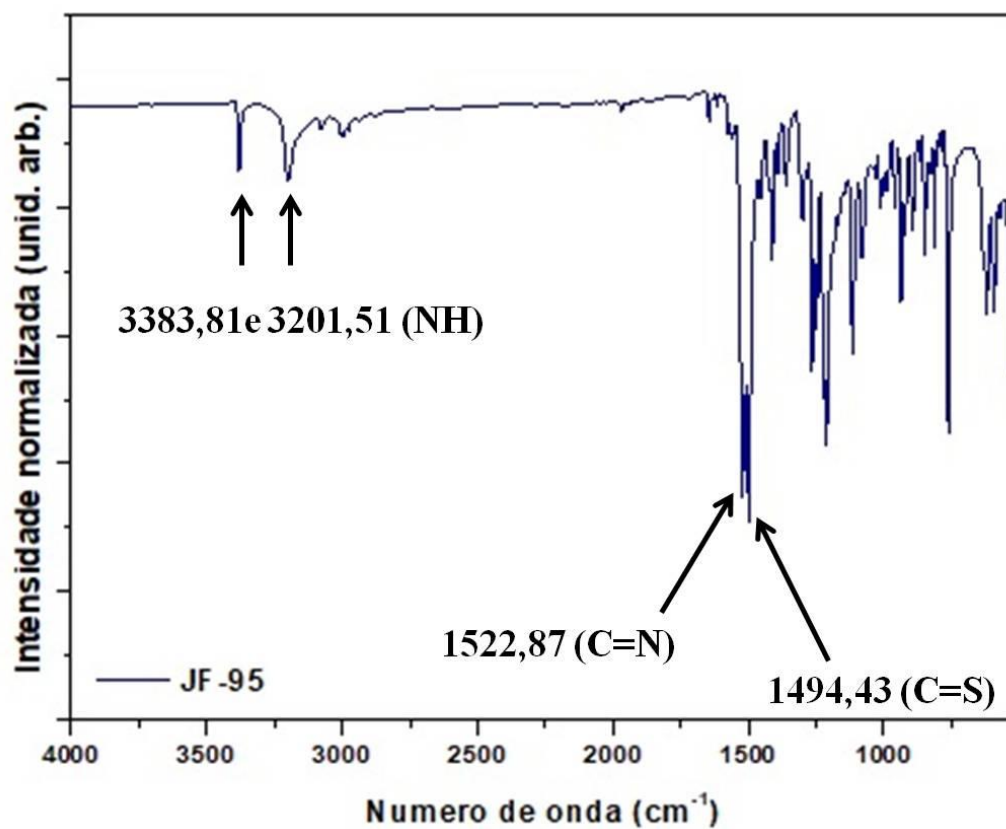
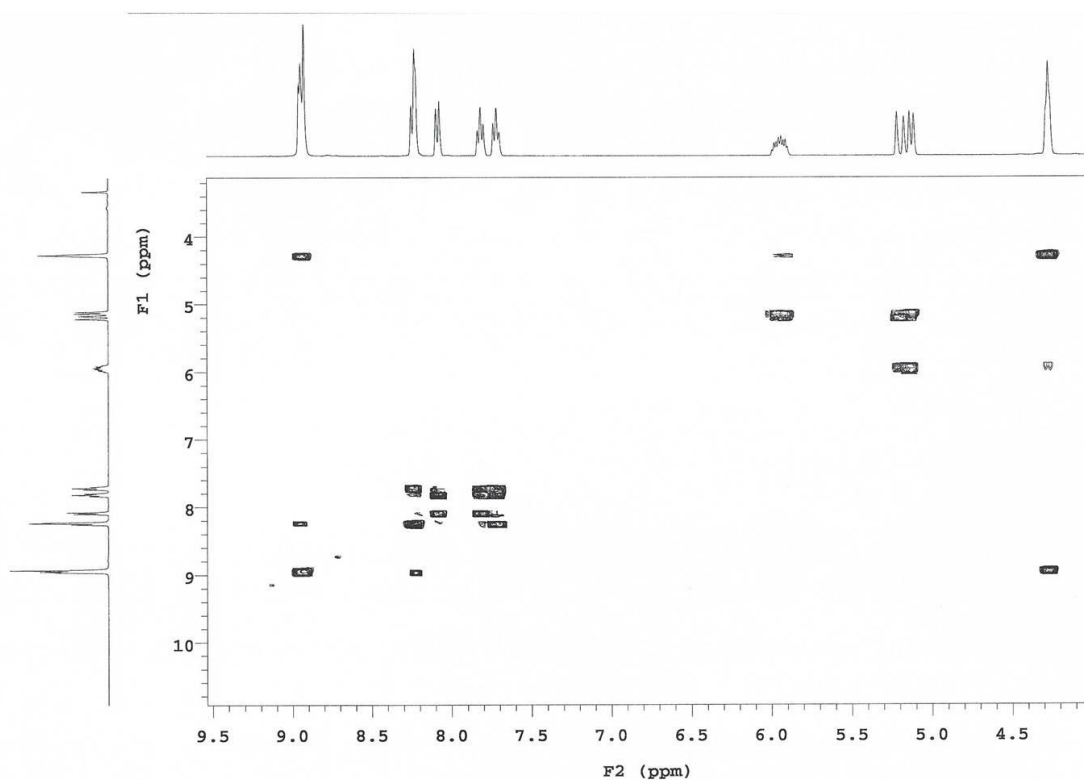
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-94Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-94



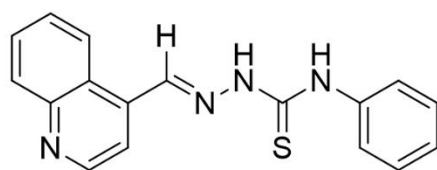
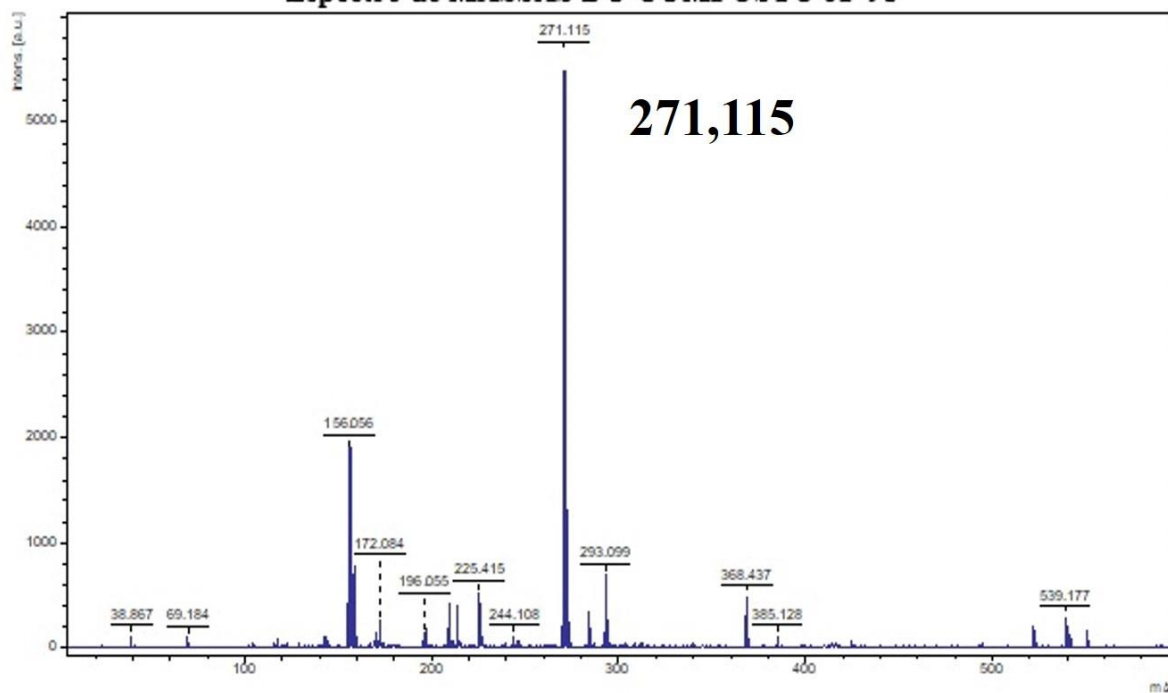
### Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-94



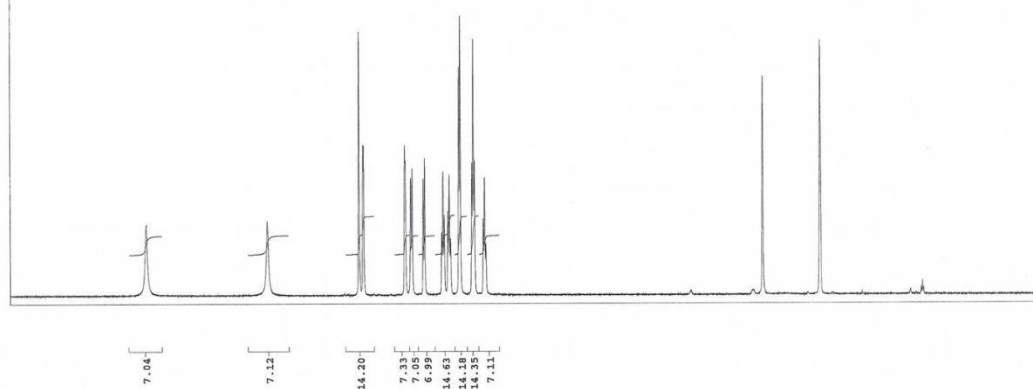
 Agilent Technologies**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-95****Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-95** Agilent Technologies

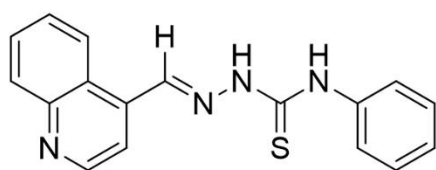
**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-95**

## Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-95

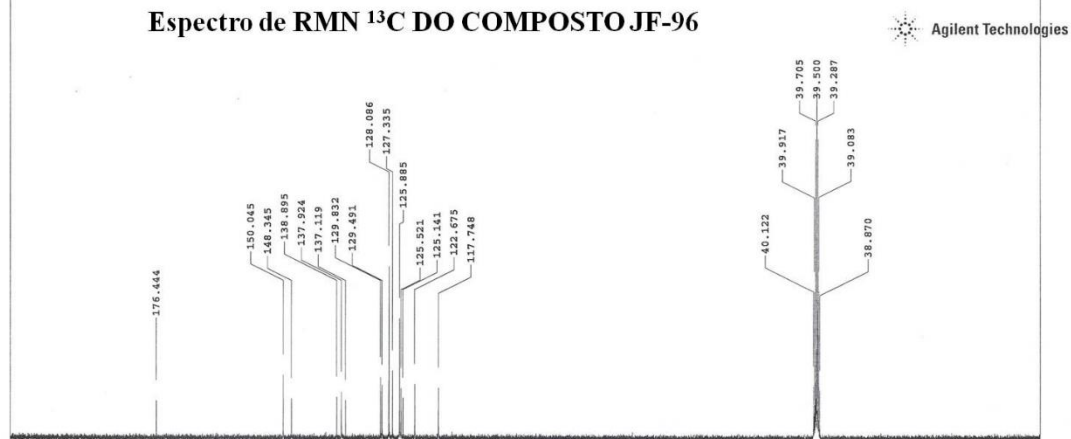


Agilent Technologies

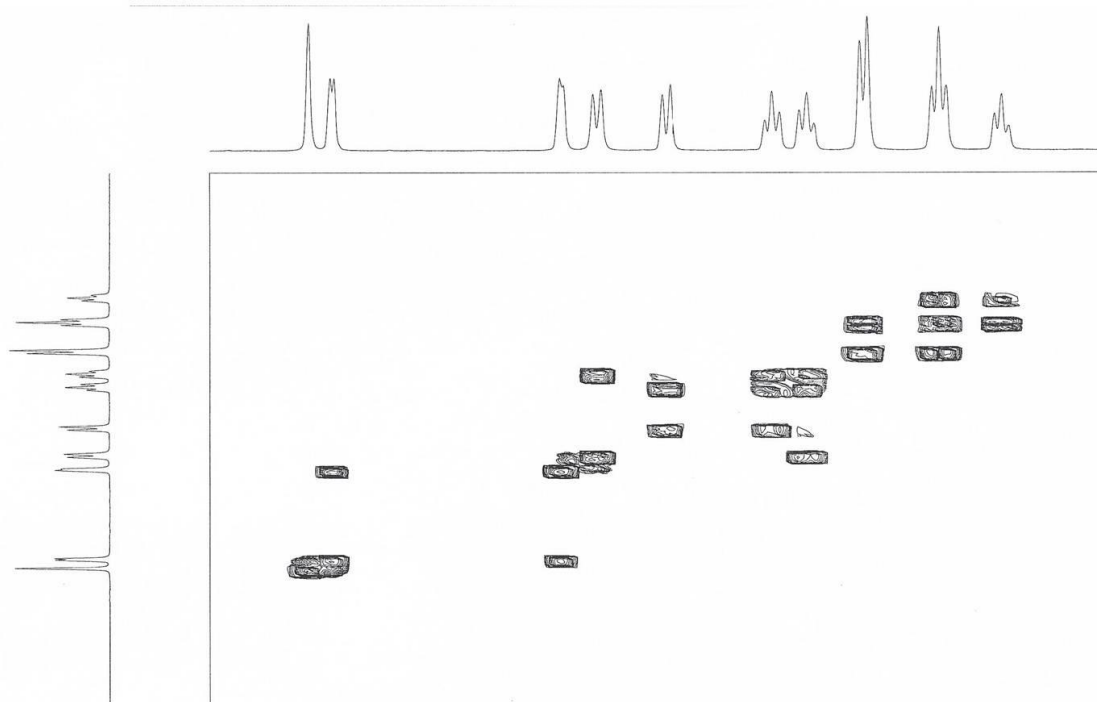
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-96

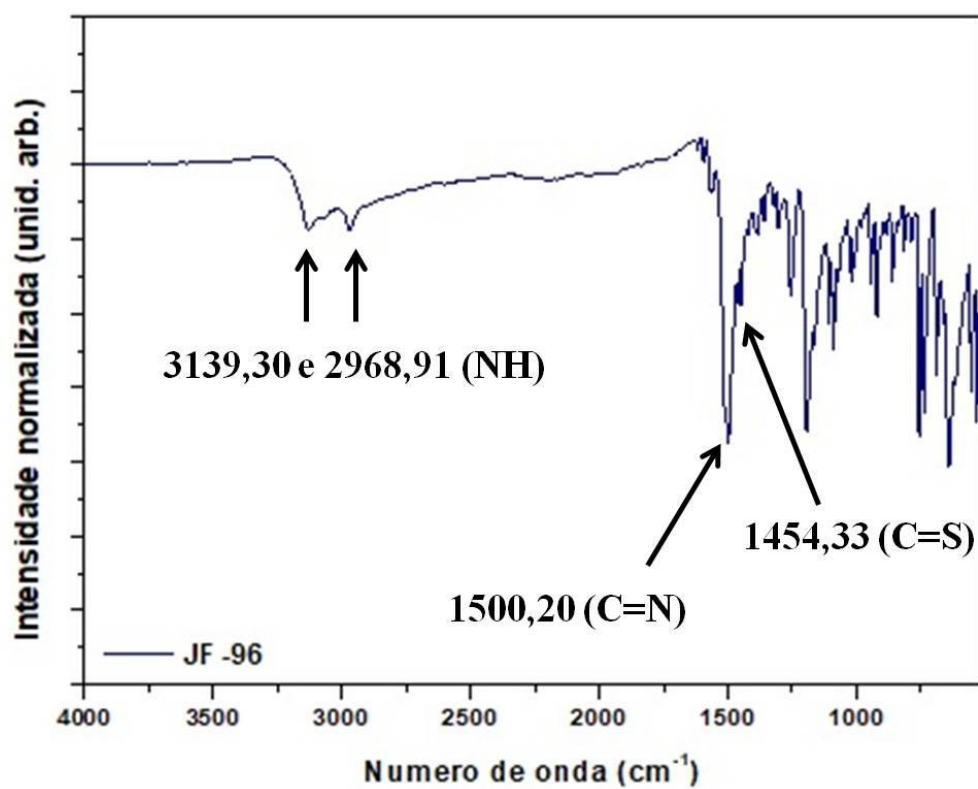


**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO JF-96**

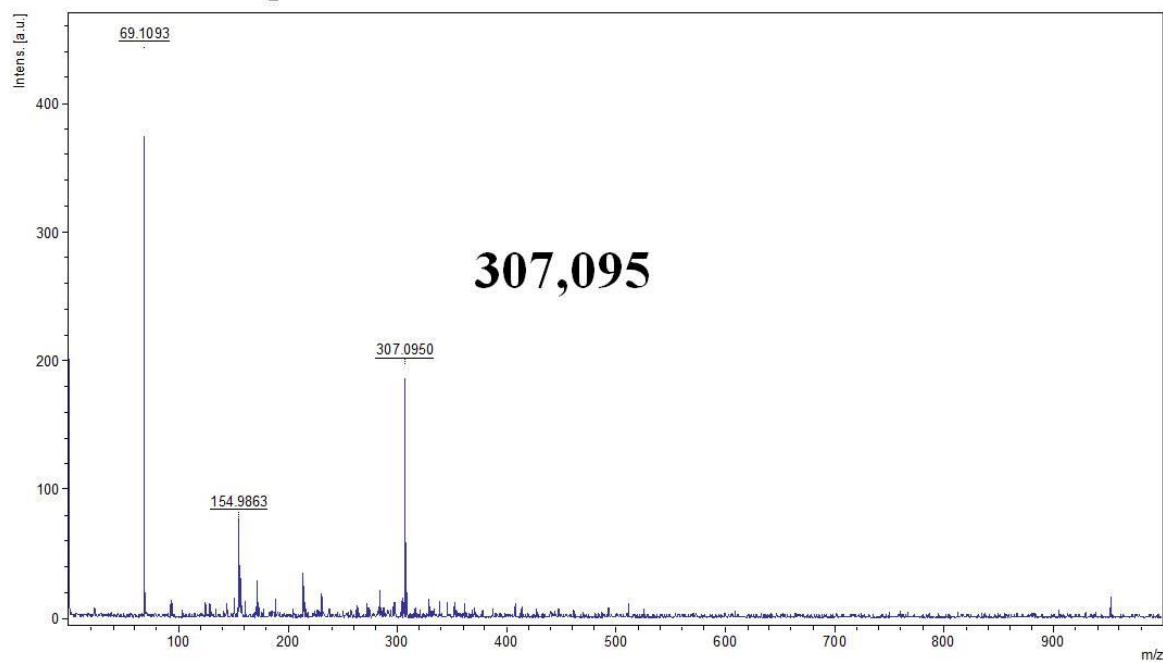


**Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DO COMPOSTO JF-96**



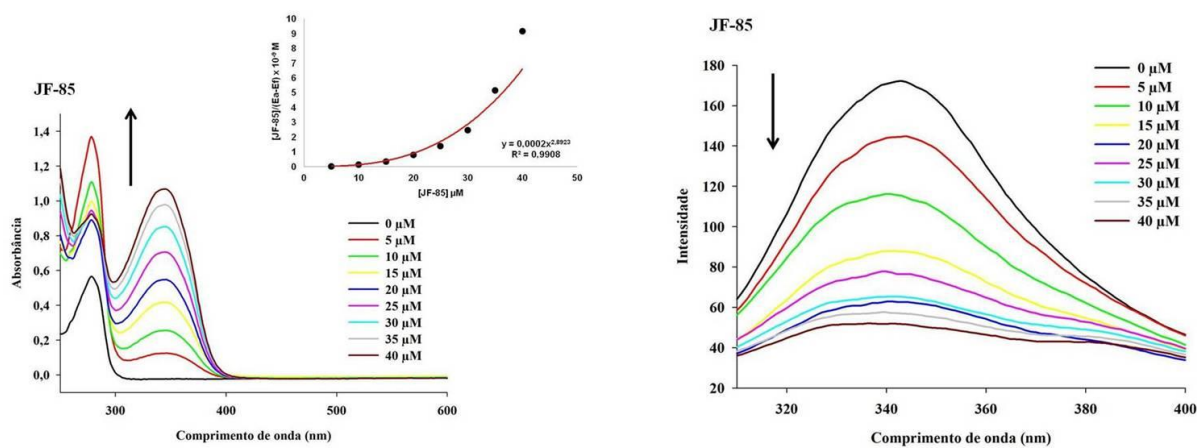


### Espectro de MASSAS DO COMPOSTO JF-96

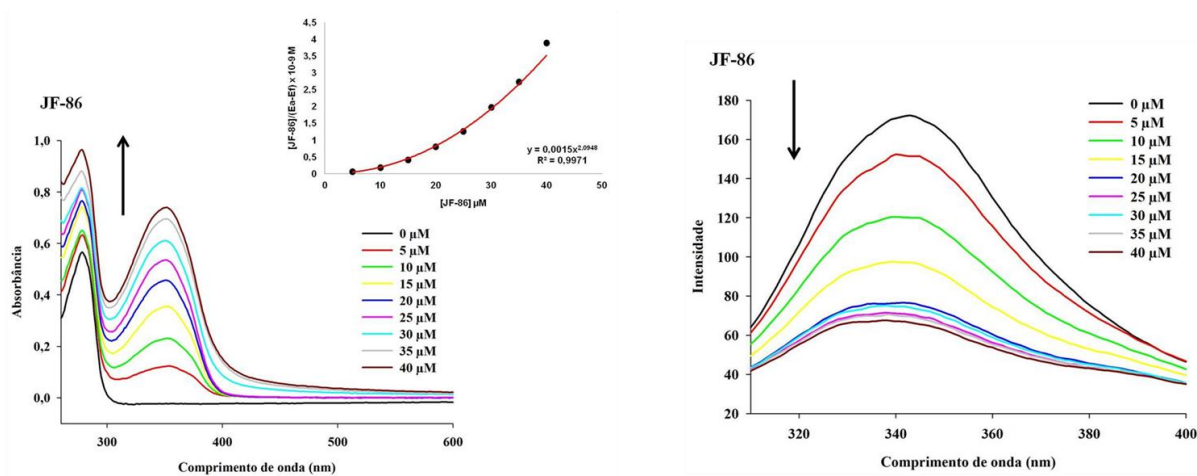


## APÊNDICE B – ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DOS DERIVADOS LqIT/JFs COM ctDNA E ALBUMINA DO SORO BOVINO

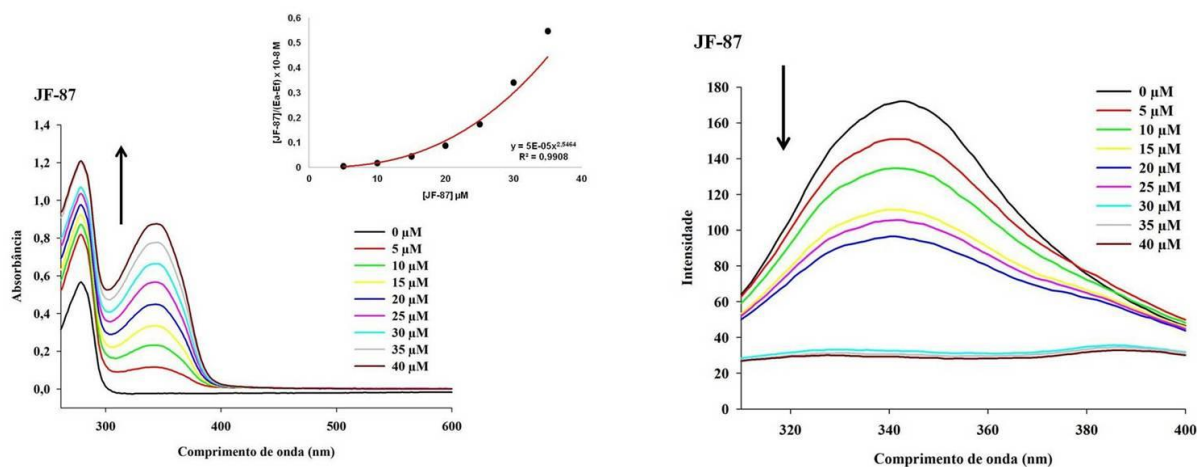
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-85 + albumina



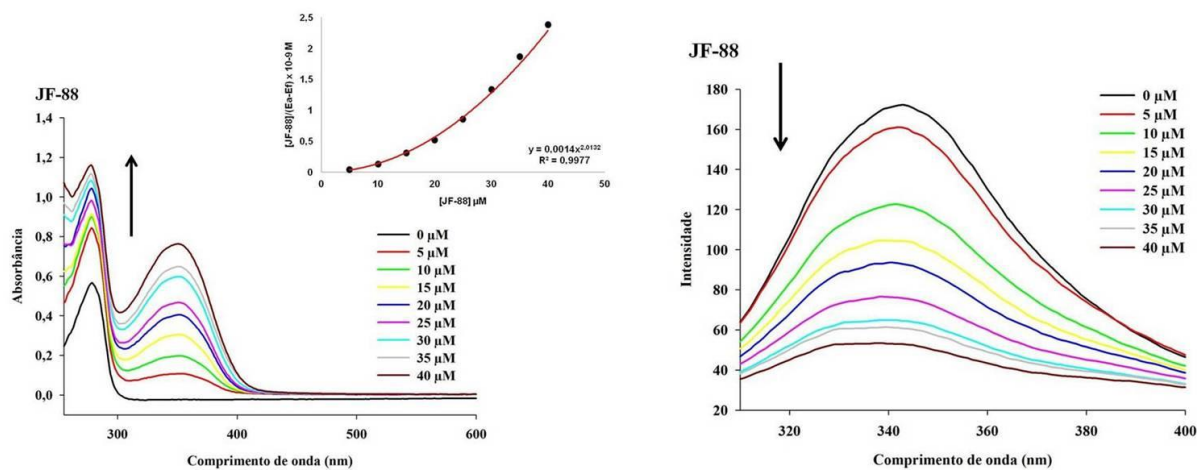
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-86 + albumina



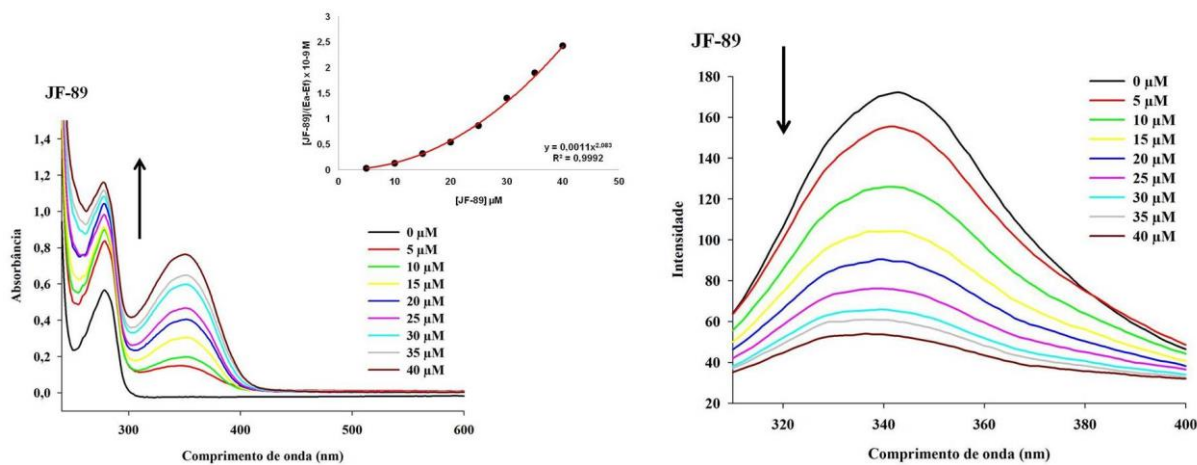
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-87 + albumina



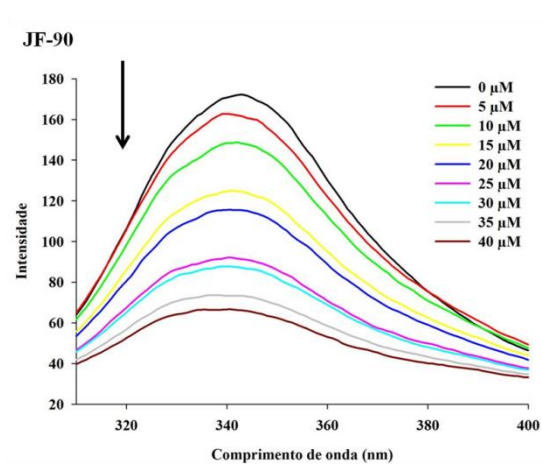
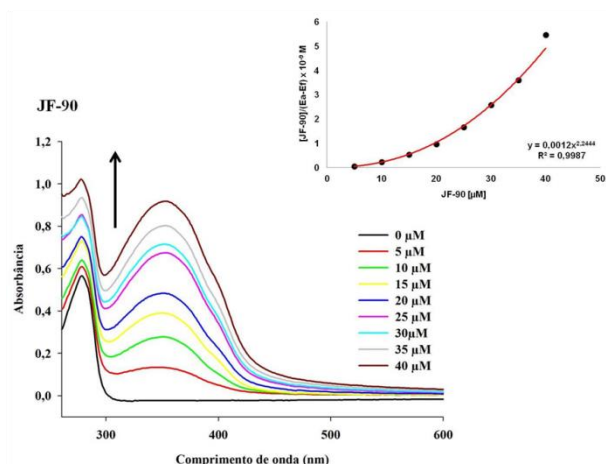
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-88 + albumina



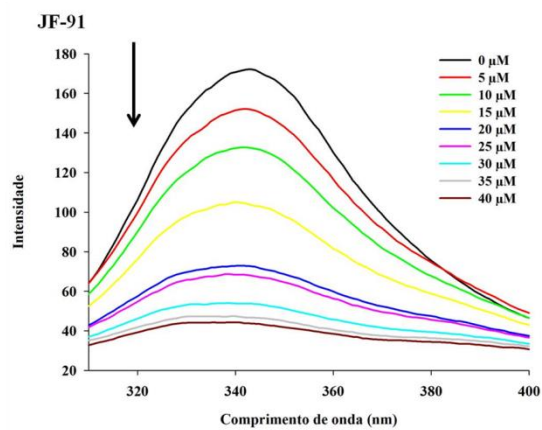
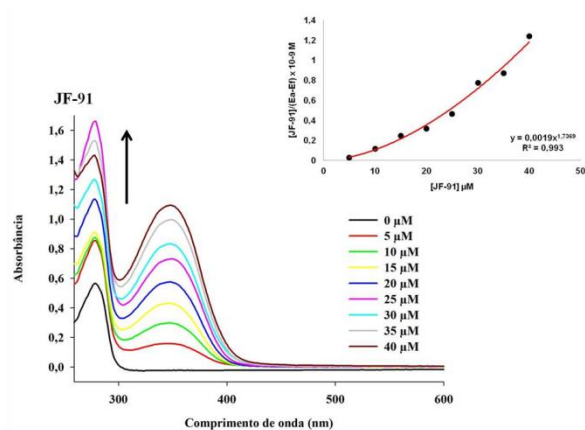
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-89 + albumina



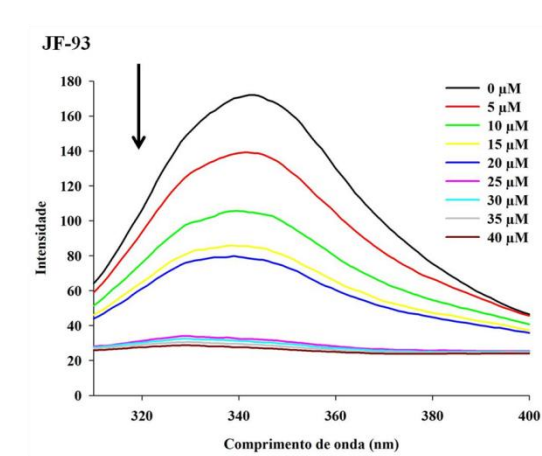
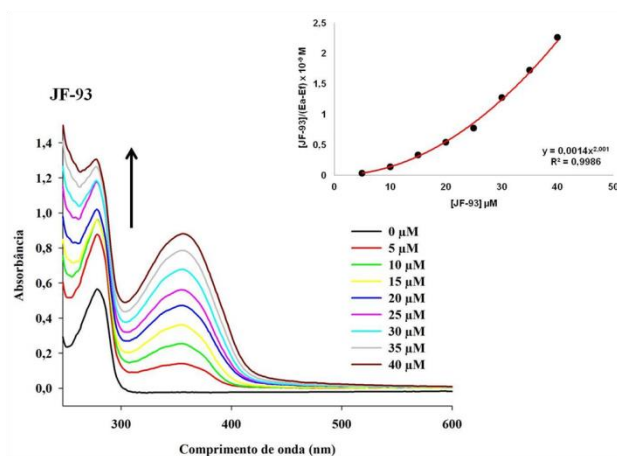
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-90 + albumina



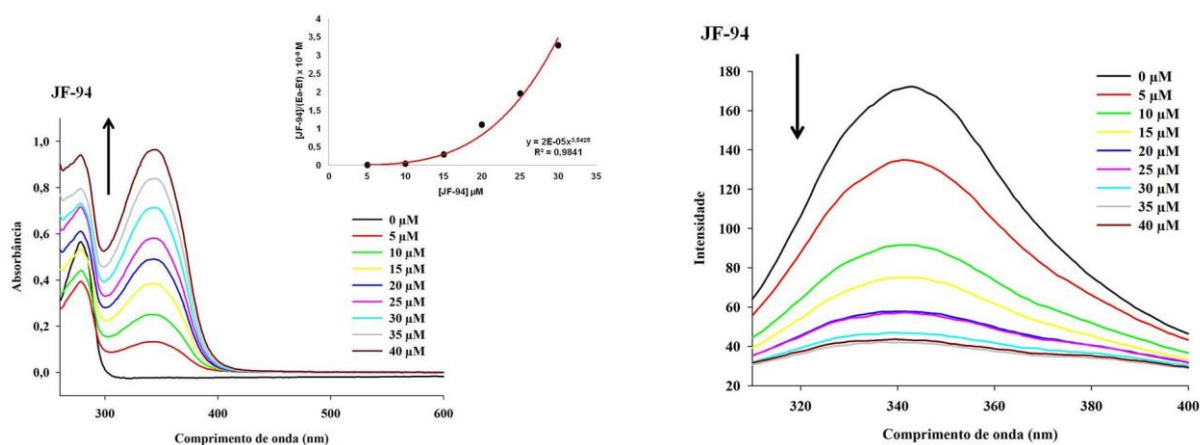
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-91 + albumina



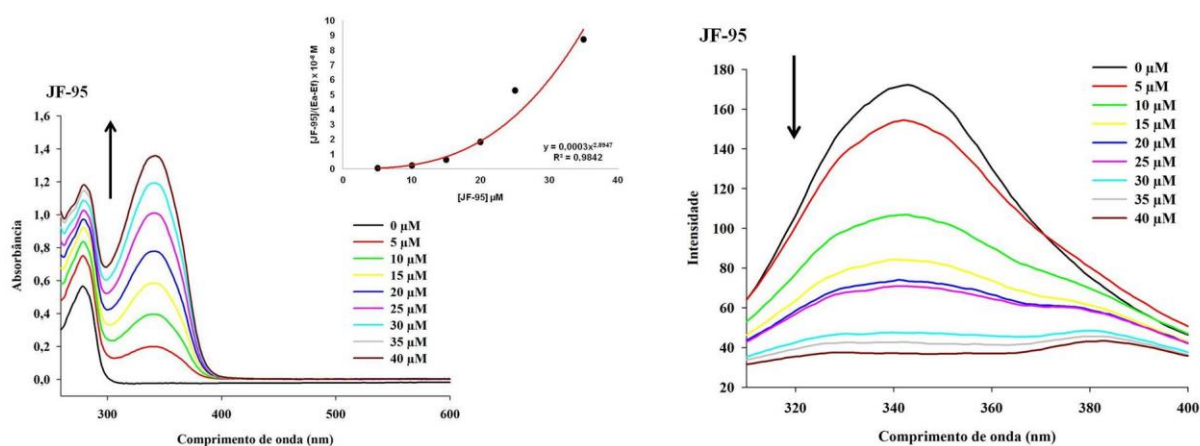
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-93 + albumina



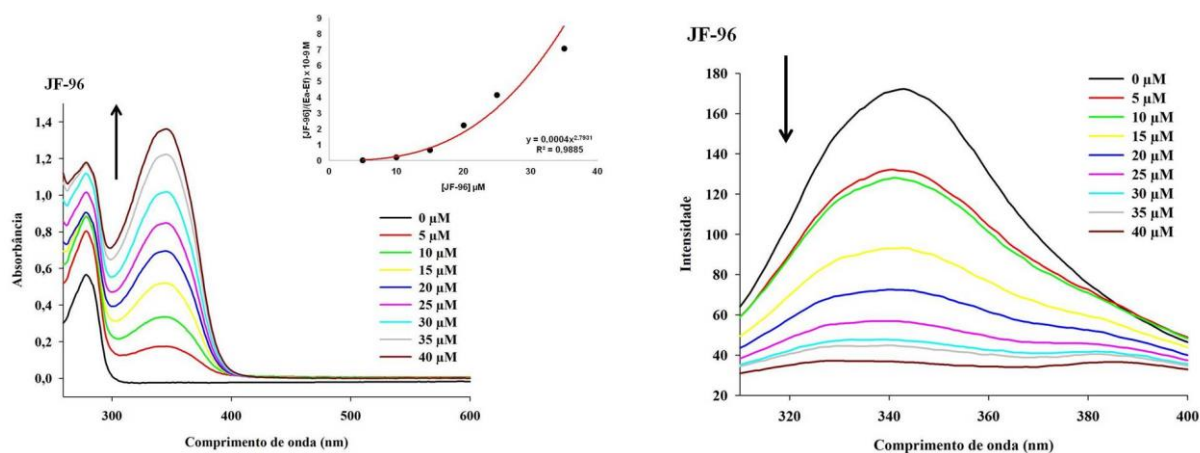
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-94 + albumina



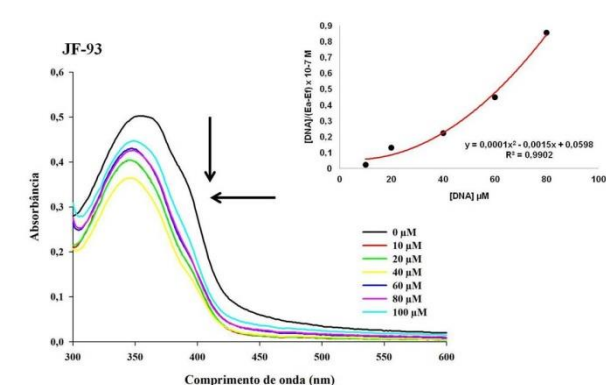
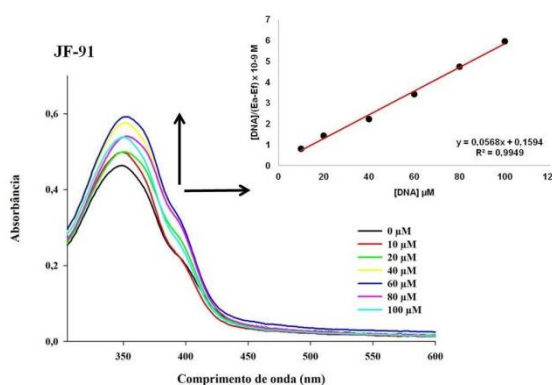
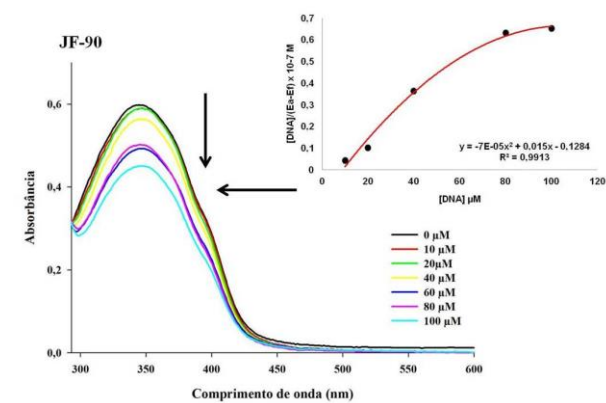
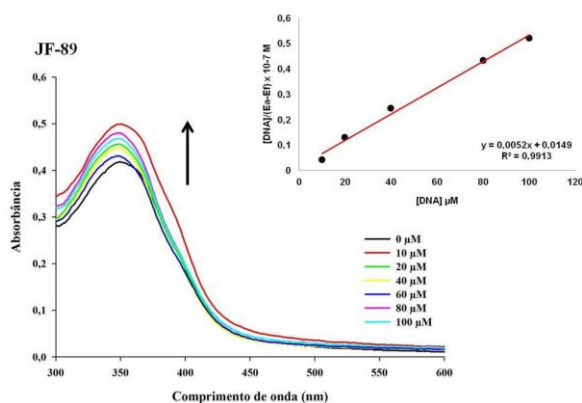
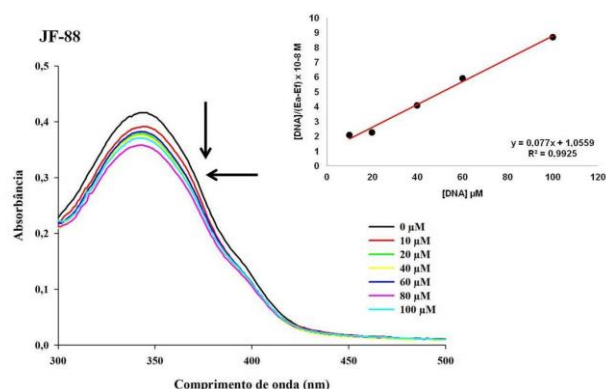
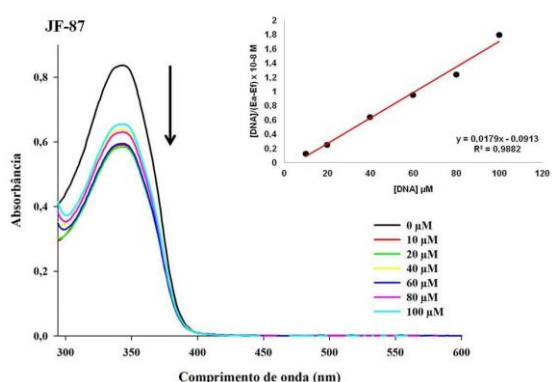
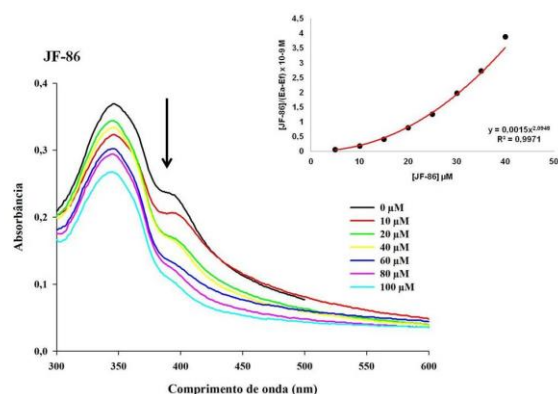
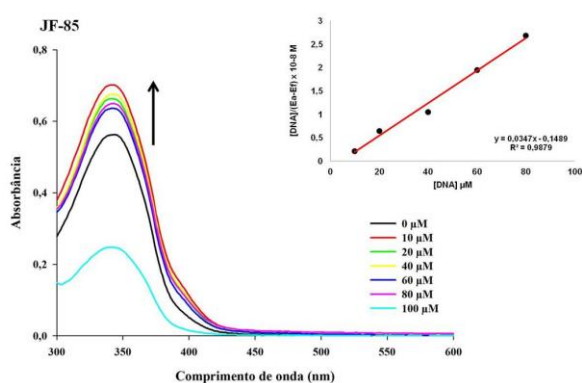
### Espectro de absorção e emissão do composto JF-95 + albumina

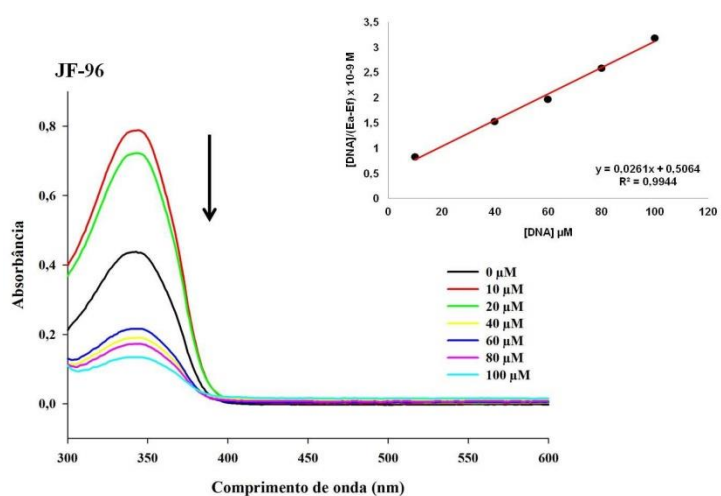
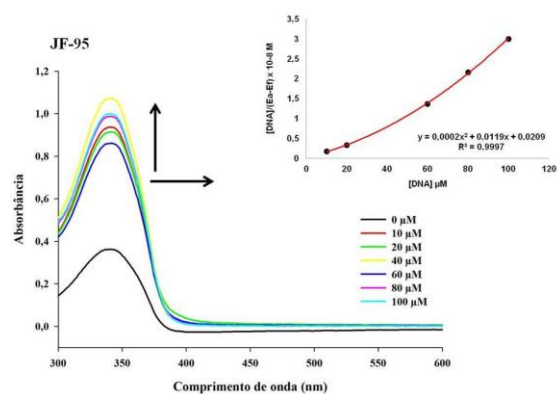
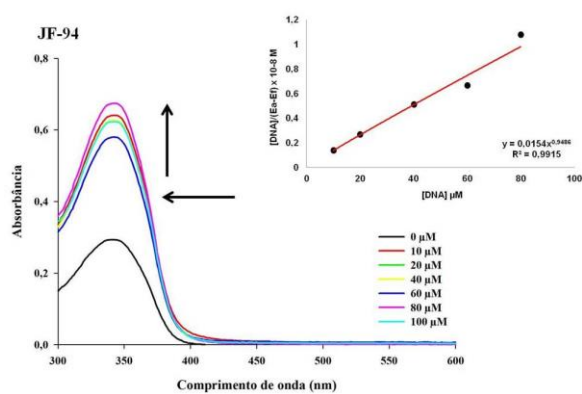


### Espectro de absorção e emissão do composto JF-96 + albumina

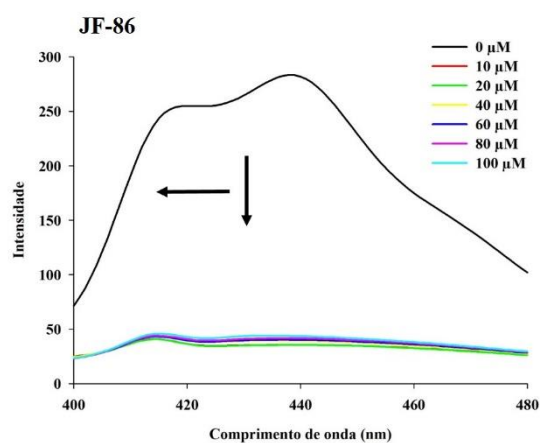
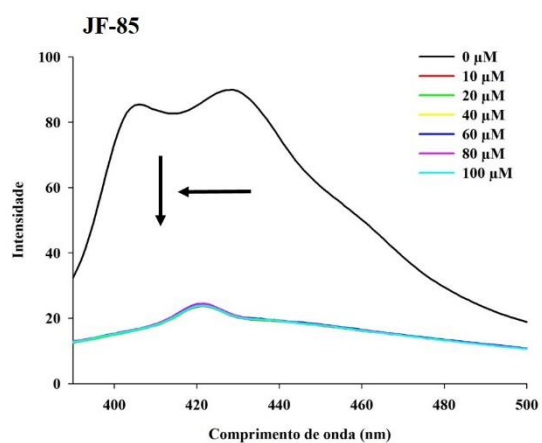


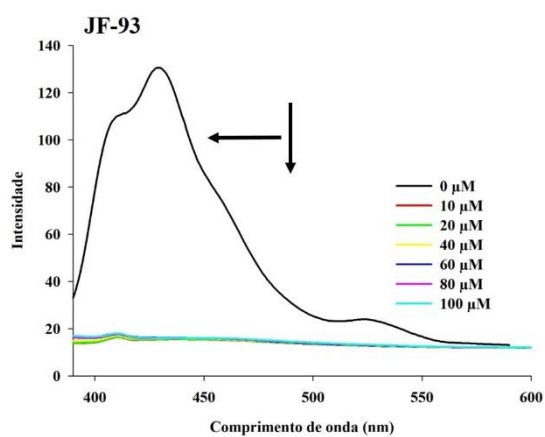
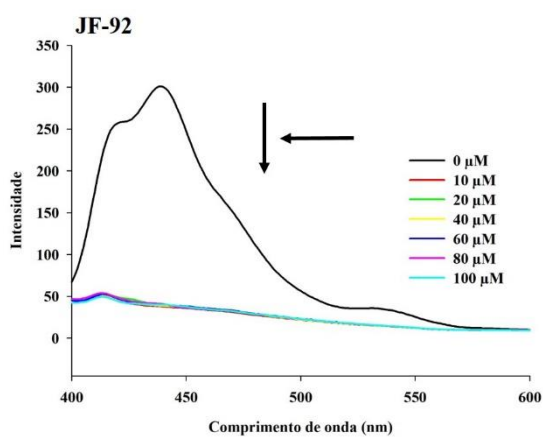
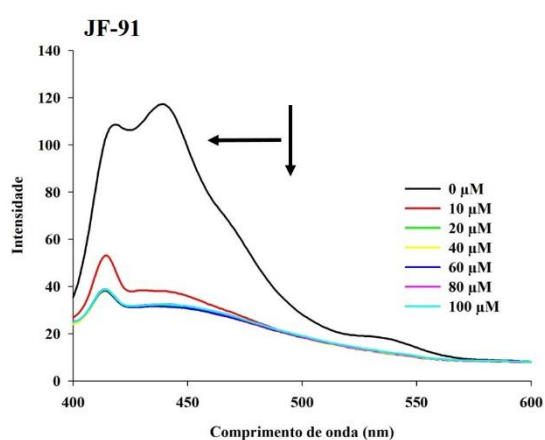
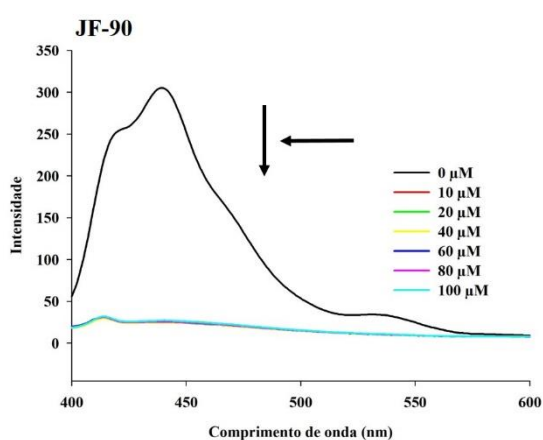
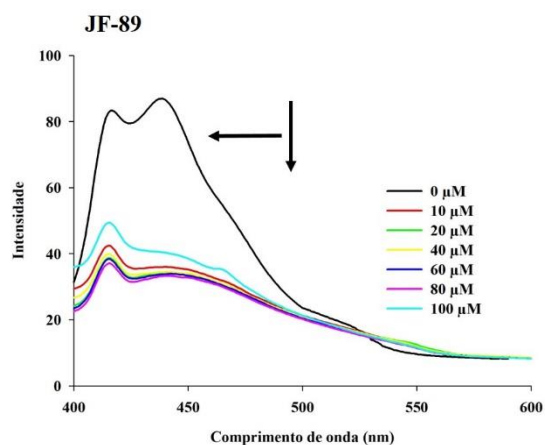
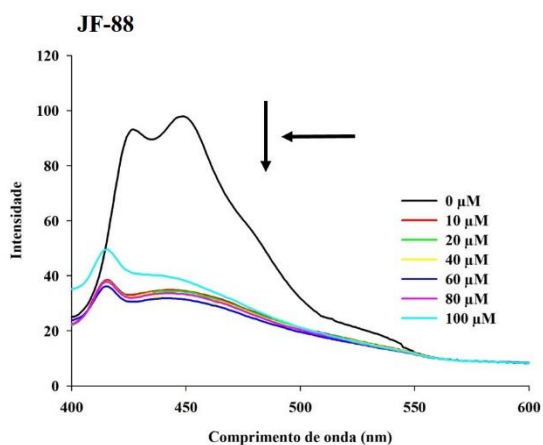
### Espectros de absorção dos derivados LqIT/JFs + ctDNA

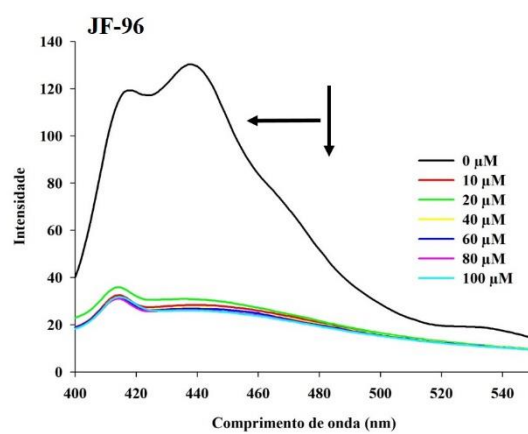
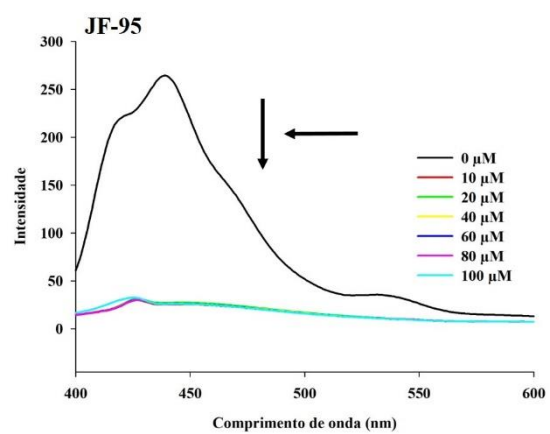




### Espectros de emissão dos derivados LqIT/JFs + ctDNA







## APÊNDICE C – ARTIGO

### **Artigo publicado na Biomedicine & Pharmacotherapy:**

**DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?**

**DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?**

Sinara Mônica Vitalino de Almeida<sup>ab</sup>, Amélia Galdino Ribeiro<sup>c</sup>, Geilza Carla de Lima Silva<sup>b</sup>, Josival Emanuel Ferreira Alves<sup>b</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>b</sup>, Jamerson Ferreira de Oliveira<sup>c</sup>, Luiz Bezerra de Carvalho Junior<sup>b</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), 55290-000, Garanhuns, PE, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-901, PE, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), 50670-901, Recife, PE, Brazil



## Review

# DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?



Sinara Mônica Vitalino de Almeida<sup>a,b</sup>, Amélia Galdino Ribeiro<sup>c</sup>, Geilza Carla de Lima Silva<sup>b</sup>,  
Josival Emanuel Ferreira Alves<sup>b</sup>, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>b</sup>,  
Jamerson Ferreira de Oliveira<sup>c</sup>, Luiz Bezerra de Carvalho Junior<sup>b</sup>,  
Maria do Carmo Alves de Lima<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), 55290-000, Garanhuns, PE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-901, PE, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), 50670-901, Recife, PE, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

DNA-topoisomerase  
Acridine derivatives  
Thiosemicarbazone  
Metallic compounds  
Nitrogenous heterocyclic derivatives

## ABSTRACT

DNA is considered one of the most promising targets of molecules with anticancer activity potential. Its key role in various cell division mechanisms, which commands the intense multiplication of tumor cells, is considered in studies with compounds whose mechanisms of action suggest likelihood of interaction. In addition, inhibition of enzymes that actively participate in biological functions of cells such as Topoisomerase, is seen as a primary factor for conducting several events that result in cell death. Discovery of new anticancer chemotherapeutic capable of interacting with DNA and inhibiting Topoisomerase enzymes is highlighted in anticancer research. The present review aims at showing through distinct biological tests the performance of different candidates to anticancer drugs and their respective chemical modifications, which are crucial and/or determinant for DNA affinity and inhibition of important enzymes in cells' vital processes to either separately or synergistically optimize anticancer activity.

## 1. Introduction

Cancer is one of the main causes of mortality in the world. Great efforts are currently made to discover and develop new anticancer drugs [1,2]. Usually, cancer is caused by multiple pathogenic factors. Its characteristics are related to an increase in tumor cell proliferation rates and numerous genetic and/or epigenetic mutations, which extend their life span. Despite the diversity and heterogeneity of tumors, they all present increased cell proliferation rate [3]. Among the available strategies for cancer treatment, chemotherapy remains the most established and used therapeutic approach nowadays [4]. The search for new effective anticancer agents with low toxicity is one of the most important tasks for the improvement of oncology treatment. Generally, the solution lies in the search for new compounds that affect molecular mechanisms that play an important role in carcinogenesis [5].

Currently available anticancer chemotherapeutics can be divided in three categories: (a) the first discovered drugs which affect DNA replication and cell division but present severe side-effects albeit highly successful in the treatment of some cancers and still used; (b) drugs that target biomolecules overexpressed specifically by cancer cells and

which reduce side effects, even if limited for example by the development of resistance and; (c) small molecule anticancer agents driven against complex multicomponent cellular machineries. This last type includes drugs that target both DNA replication and integrity by the following mechanisms: crosslinking nucleobases in DNA and blocking DNA replication; inhibiting DNA repair; inserting planar polyaromatic molecules between DNA base pairs and stabilizing the DNA-intercalator-topoisomerase II ternary complex [6]. In other words, new compounds that affect DNA or topoisomerase enzymes can be considered as belonging to the latest wave of anticancer drugs that target tumor-supportive cellular machineries. Consequently, there are a lot of new anticancer drugs developed to interfere with DNA metabolism and/or hindering the function of DNA processing enzymes such as topoisomerases [7].

Since its discovery in 1971 by J.C. Wang, DNA topoisomerases were established as molecular targets for developing anticancer agents [8]. One of the differences between cancer and normal cells, observed in genomic and proteomic studies, is the expression of an enlarged enzyme class known as topoisomerases (henceforth Topo). Elevated levels of Topo expression are expected due to its involvement in vital cellular

\* Corresponding author.

E-mail address: [nenalima.mariadocarmo@gmail.com](mailto:nenalima.mariadocarmo@gmail.com) (M.d.C. Alves de Lima).

processes [9], promoting accelerated cellular growth and division [10]. It is well known that agents that affect Topo functions are considered attractive for cancer therapy as they can cause damages that trigger a series of cellular events, induce apoptosis and, ultimately lead to cell death [11,12].

Topoisomerases are nuclear enzymes [13] characterized by their ubiquity [14] and are essential for vital cell processes [15] as they solve topological problems that inevitably occur during cell division [16,17] as well as other issues concerning DNA [18] such as its replication [19,20], transcription [21,22], recombination [23,24], reparation [25,26], chromosomal condensation [27] and segregation of chromatin [28,29], to which they require a transient break of either one or two DNA strands [30]. Such proteins are capable of unlinking the DNA double helix through a cleavage mechanism, allowing DNA replication [7] through the enzymatic activity of topoisomerases involving transitory cuts in the DNA strand, which is swivelled and its previously cut strands re-ligated [31].

The past few years witnessed pharmacological development of molecules that fight the activity of such enzymes, which are targeted by two main categories of drugs: DNA intercalators and non-intercalators [32]. However, literature describes a small number of chemical compounds capable of penetrating cellular nuclei to interact with DNA or block DNA-dependent enzymes, due to their lipophilic nature, and indirectly change the conformation site of DNA molecules, inducing cleavage or perturbation in the synthesis of the matrix. Damages to this nucleic acid result in the violation of cell cycle and cell viability thus achieving the therapeutic effect: cell proliferation is reduced and tumours are destroyed [33].

The molecular mechanism of action that inhibits Topo enzyme along with its specific binding in the interface of topoisomerase-DNA complexes have led to the concept of interfacial inhibition [34]. Structural and biochemical studies have demonstrated that Topo-inhibitors are interfacial, as the biological systems consist of macromolecular settings that need to move one another for structural or enzymatic functions. In addition, these reactions create a spectrum of molecular interfaces between macromolecules, elucidating how small molecules bind and interfere with functions of macromolecular complexes, as their complexity and dynamic behaviour create unique opportunities for developing and discovering small molecules that bind to high selectivity [35].

As the site of activity for Topo-inhibitors is an interface created by the three-dimensional structure of DNA and protein, molecules with sites that allow the simultaneous interaction with all parts of the interface might be more successful in inhibiting tumor cell growth, as is the case of *m*-amsacrine (*m*-AMSA) [36]. Many investigations in the literature concomitantly evaluate Topo inhibition, interaction with DNA and the extent to which these two properties influence the capacity of preventing tumor cells growth in new chemically modified molecules to elect the most effective for cancer treatment [37–39].

The present literature review looks at how chemical modifications of newly produced series might influence the capacity of simultaneous interaction with DNA and Topo inhibition, that is, what advances have been made in the synthesis of new compounds that possibly are interfacial Topo-inhibitors. Furthermore, analyses were conducted on the extent to which strength or the type of DNA interaction affect Topo inhibitory property and consequently the antiproliferative power against tumor cells.

## 2. DNA as therapeutic target

### 2.1. Principles of interactions and chemical characteristics of ligands

Over six decades after its discovery, DNA remains the object of various studies due to its relevance in the elucidation and diagnosis of diseases [40] or as target of many therapies that have as principle preventing the reading of the double-strand that suppresses genetic

replication or transcription inducing cell death [41]. Structurally, DNA is a double helix that comprehends two complementary anti-parallel strands containing sugar phosphate and nitrogen bases linked by hydrogen bonds, which stabilize its structure. The coiling of DNA chains forms major and minor grooves that provide support for the recognition of proteins and a region that favours the binding of small molecules [42].

Due to the role it plays in various biological processes, DNA is considered a promising target for the development of new more selective chemotherapeutic agents and a relevant element in the planning of pharmacological candidates. Molecules that bind to DNA can modify its physiological functions, inhibiting its replication, transcription or expression of genetic information in the target cells, thus preventing cellular growth [43,44].

Anticancer drugs that interfere with DNA metabolism act in three ways: (i) controlling transcription factors and polymerases, where drugs interact with proteins that bind to DNA; (ii) through the formation of DNA-RNA hybrids that interfere with transcription activities; (iii) through the binding of small molecules to DNA double helix [45]. The latter are called DNA ligands and might be classified according to the types of interactions in six categories (Fig. 1): (1) electrostatic attraction with the anion phosphate-sugar; (2) interactions with the major groove in DNA; (3) interactions with the minor groove in DNA; (4) intercalation of base pairs through the DNA major groove; (5) intercalation of base pairs through the DNA minor groove; and (6) threading intercalation [46]. In addition to these types, molecules with two intercalative portions linked by an adequate spacer produce the so called bis-intercalation [47].

Interaction between an organic molecule and DNA is determined by a set of chemical characteristics of the compound. Organic molecules with positive charge tend to occupy the place of cations which stabilize the physiological structure of DNA, such as  $\text{Na}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . Electrostatic interactions between the negative phosphate and the positive charge present in the molecule that dislocate normal cations are relevant for both DNA groove binding and intercalation. Such characteristic is the basis of the interaction of complexes as the one formed between ruthenium and phenanthroline [48]. On the other hand, aromatic compounds with non-fused ring systems whose bonds allow conformational flexibility in the adoption of a more adequate structure to the coiling of DNA, are characteristics of molecules that bind to DNA grooves. The presence of protonated groups in physiological pH can improve the attraction for DNA grooves. Examples of molecules with such characteristics are polyamines [46]. Finally, typical intercalators present a set of fused aromatic rings positively charged in the ring system or in chemical groups linked by lateral chains, such as acridine derivatives [37,49]. Therefore, organic intercalators are polyaromatic compounds that can insert themselves between two adjacent base pairs in the DNA double strands and inhibit the synthesis of nucleic acid *in vivo* [50].

In cancer therapy, DNA acts as target for two classes of chemotherapeutic: alkylating agents and molecules with non-covalent binding properties. For the latter, DNA recognition is a critical stage in antitumor action and intercalation is one type of interaction in the recognition of these biomolecules indispensable for clinic effectiveness of drugs, such as anthracyclines, acridines, and anthraquinones. On this account, the discovery of new DNA intercalators has been considered a practical approach and a significant number of molecules has been evaluated regarding their intercalation properties [44]. Discovering new compounds is not an exclusive object of investigation, but also the presence of such mechanisms for molecules already established in clinical cancer therapy such as doxorubicin (1) [51], *m*-AMSA (2) [52], 5-fluorouracil (3) [53] and mitoxantrone (4) (Fig. 2) [54].

### 2.2. Investigation of ligand-DNA interactions

The study of DNA interaction with molecules used in anticancer

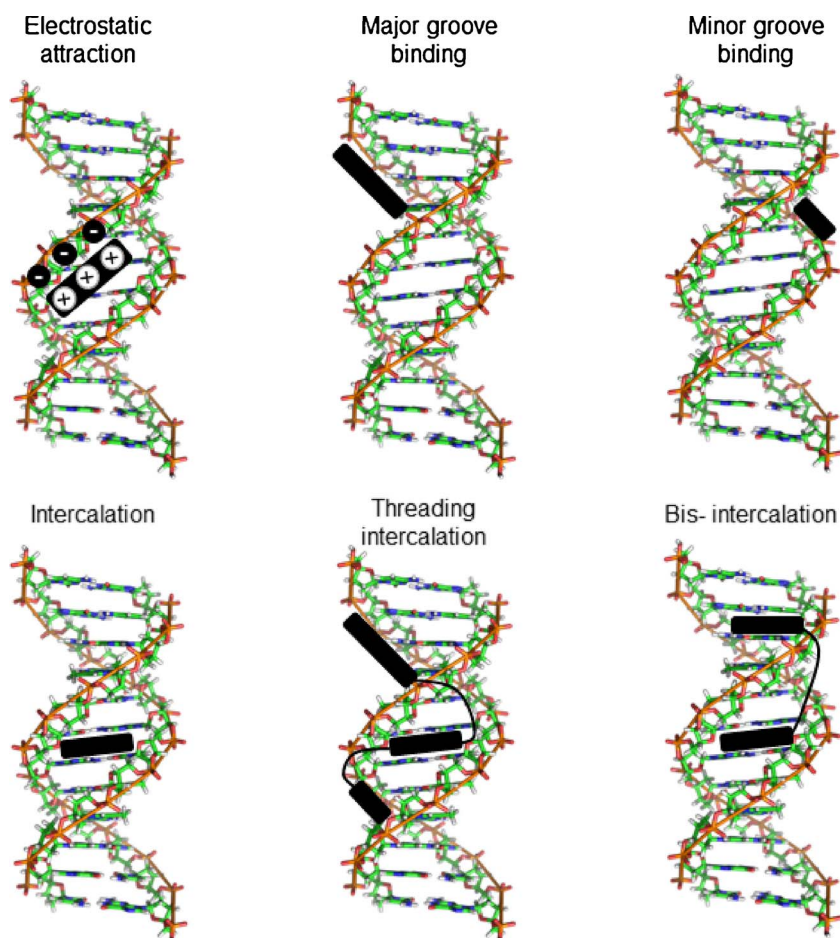


Fig. 1. Schematic representation of DNA binding modes.

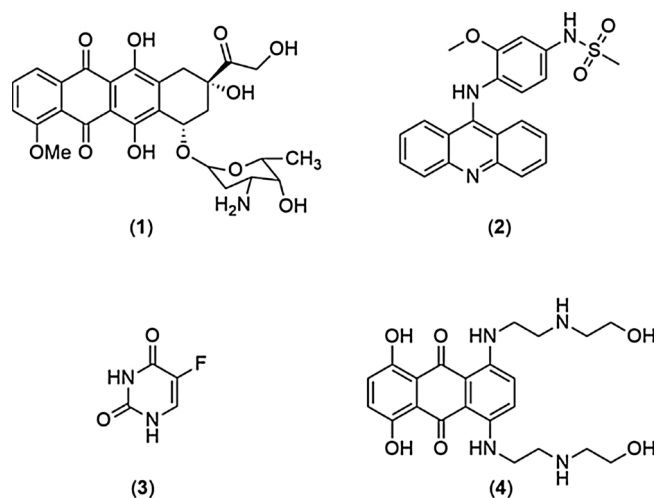


Fig. 2. Chemical structures of molecules with DNA intercalating properties used in clinical cancer therapy.

therapy seeks to elucidate the multiple mechanisms of action that includes interaction with DNA by groove binding or intercalation. Techniques used to identify the type of interaction between ligand and DNA are based on the identification of the following characteristics: (i) great alterations in the tertiary structure of DNA caused by the unwinding and prolongation of the DNA helix; (ii) small alterations in the double helix after the ligand interacted with the groove and; (iii) presence or absence of ligand characteristics in solution such as detection of absorbed light or fluorescence emitted by the supposed intercalator

or ligand to the DNA groove [55].

In addition to assessing chemical structures and features of DNA ligands, there are techniques to support investigations on the interaction with DNA that lead to the deduction of the binding type (intercalation, groove binding, or both). The most frequently used techniques are (i) spectroscopy of absorption, which allows the assessment of the maxima in absorption for the intercalated molecule with or without red shifts [56]; (ii) fluorescence emission which allows to verify the extinction or increase in fluorescence of the fluorescent intercalator compound [57]; (iii) circular and linear dichroism spectroscopy to assess molecule orientation or rigor and techniques of polarization of fluorescence to monitor the immobilization of the molecule when bound to DNA [58] and; (iv) alterations in viscosity of the solution and circular DNA electrophoretic mobility in the presence of ligands [59].

Employing spectroscopy of visible UV absorption and emission to study interactions with DNA is possible due to the ability of ligand aromatic compounds to absorb or emit fluorescence [37]. Qualitatively, the following effects may be observed in absorption or fluorescence spectrum after interaction between ligand and DNA: (a) hypochromic effect correspondent to a decrease in either emitted or absorbed light [60]; (b) hyperchromic effect, defined as the increase of intensity in the absorption and emission of light [54]; (c) bathochromic effect, observed when there are shifts of maxima of absorption or emission after binding to DNA for a longer wavelength (red shift region) [61]; and (d) hypsochromic effect when there is shifting of the maxima either of absorption or emission for shorter wavelength (blue shift) [62].

Experimental spectroscopy data are usually used to obtain the binding constant ( $K_b$ ), a quantitative measurement of the interaction between organic compounds and DNA. The value is useful to compare molecules with different structures as well as to indicate the means of

DNA binding [63,64]. Binding constants for typical intercalators are in the interval from  $10^4$  to  $10^6 \text{ M}^{-1}$  and are significantly smaller than binding constants for ligand agents in DNA grooves which range from  $10^5$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}$  [65,66].

Because DNA is the site of activity for many enzymes such as topoisomerase that metabolize mostly during fast replication processes, as observed in cancer, it is not uncommon for DNA ligands to be Topo inhibitors, such as *m*-AMSA. The relation structure-function and the role of the DNA binding to therapeutic action is of *m*-AMSA have been elucidated by means of synthesis of a series of derivatives that presented increased DNA cleavage mediated by Topo II and DNA intercalation. Results have shown that activity and specificity of *m*-AMSA as Topo II poison is due to its 4'-amino-sulfomethyl-*m*-anisidine group while DNA intercalation by acridine ring is responsible for increasing affinity in the formation of the cleavage complex DNA-Topo II [36]. Hence, various synthetic derivatives with antitumor potential containing chemical groups likely to interact with DNA, such as indoles, thiosemicarbazones, acridines and metal complexes are assessed in their properties of DNA interaction and Topo inhibitory power [37,38,66,67].

### 3. Topoisomerases as target for anticancer therapy

Topo inhibitors are widely used in anticancer chemotherapy [68]. The extended inhibition activity of these enzymes breaks DNA strands, resulting in significant genotoxicity and cytotoxicity [69]. They are classified in two different categories: Topo I inhibitors or interfacial Topo I poison, which inhibit the rotation of the axis or the religation of the enzymatic reaction and then stabilize the covalent complexes of Topo-DNA [70]; Topo II inhibitors or catalytic Topo inhibitors act by blocking two essential steps in the enzymatic catalytic cycle: ligation to the substrate or cleavage complex during the formation of the covalent bond. They might be DNA intercalators or smaller groove ligands or both [71].

There are six topoisomerases in human [72] classified as IA, IB and IIA and they perform their respective functions by transesterification process, which is highly reversible and minimizes risks for genome stability [73]. Type IA topoisomerases are TOP3 $\alpha$  and TOP3 $\beta$  which cleave a DNA strand when supercoiled [74]. Type IIA topoisomerases (TOP2 $\alpha$  and TOP2 $\beta$ ) break both strands of a DNA molecule to make passage for other chains of these biomolecules [75], and control the DNA structure, catalysing its cleavage, and religating the phosphodiester bonds [76]. Type IB topoisomerases include TOP1 nuclear and TOP1mt mitochondrial. TOP1 initiates DNA relaxation by breaking one of its strands. Then, a cleavage complex TOP1-DNA (TOP1cc) is formed by covalent bond to the extremity 3'-phosphate through tyrosine residue Y723 (3'-P-Y) [77,78].

Topo I inhibitors prevent the catalytic action of the enzyme, that is, they prevent the relaxation of DNA supercoiling [79]. However, inhibitors considered Topo I poison stabilize an intermediary covalent complex, named cleavable complex, maintaining the breaks of DNA strands [80], promoting stagnation in cell cycle and, finally, triggering the apoptosis [81]. Examples of the main drugs already in use clinically as Topo I inhibitors are camptothecin [82] and their derivatives irinotecan [83] and topotecan [84] as well as indenoisoquinoline [85].

Topo II is more important for cell proliferation than Topo I [86]. Therefore, it has been considered a better target than Topo I regarding the conception of anticancer agents. Nonetheless, this enzyme is capable of cleaving both strands in a DNA duplex (G segment) to make the other duplex (T segment) pass through the transient break in G segment, solving topological problems for these biomolecules [3]. Irreversible inhibition caused by Topo II $\alpha$  poison (TOP2A) makes the break in the double strands of DNA shift from transient to permanent, an essential factor for the consequent apoptosis in tumor cells [87], that is, this type of inhibitor transforms the enzyme into a form of cell poison [74]. Catalytic inhibitors act to prevent the bond between DNA and

TOP2A [88], to stabilize DNA with TOP2A non-covalent complexes [89] or even to block the site of enzyme bonding ATPase [90]. Examples of the main drugs already in use clinically as Topo II inhibitors are doxorubicin [91] and daunorubicin [92] of the anthracyclines class, etoposide [93] and teniposide [94] of the epipodophyllotoxins class, mitoxantrone [95] of the anthraquinone class, *m*-AMSA [96], a type of acridine [97], and amonafide [98].

Because both Topo I and Topo II are excellent targets, their simultaneous inhibition has become desirable [25]. Hence, countless attempts have focused on the identification of anti-cancer drugs and Topo I and II inhibitors are the most investigated. The synthesis of compounds capable of inhibiting both types is desirable to minimize the occurrence of secondary toxic effects and eventual drug resistance [99]. Various unique agents with double inhibitory activity of both types Topo I and II display antitumor activity that is more promising than solo action mechanisms [100]. Although most of the Topo inhibitors are selective for one Topo type, a small number of compounds can act against both [32].

The effectiveness of Topo inhibitors in cancer therapy promotes the development of new chemical compounds that are more potent due to greater enzymatic selectivity. Considering the proposed chemical modifications, the most promising derivatives are elected for inhibiting Topo I, II or both. Examples of rings that have been modified as compounds to discover new Topo I inhibitors are: isoquinoline ring with two promising compounds [101]; derivatives of platinum (II) cyclometallized (1*R*-6*R* and 1*S*-2*S*) containing a chiral primary amine ligand [(*R* or *S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine] and coordination compound 7*R*, containing non-cyclometallized chiral amine [102]; acridone derivatives by combining the pyridyl group and the acridone-4-carboxamide scaffold [103]; a series of anthrac[2,3-*b*][1,4]oxazine-3,6,11-trione and anthra[2,3-*d*]oxazole-2-thione-5,10-dione heterocyclic compounds whose objective was to infuse the oxazole fraction in the tricyclic planar ring system [104]; and 3-heteroarylisoquinolinamines under the assumption that heteroaromatic rings retained the necessary structure to express Topo inhibitory activity [105]; derivatives 2-arylquinazolinones [24]. In order to find Topo II $\alpha$  inhibitors, structural modifications were made to produce derivatives of podophyllotoxin, CIP-36 [106,107]; of hydroxylated 4-phenyl-2-aryl-chromenopyridines molecules [108]; and derivatives of spiro-acridines [37].

A synergistic combination of Topo I inhibitor, camptothecin (CPT), and Topo II inhibitor, doxorubicin (DOX) was identified and a way of administering the combination *in vivo* by conjugation with a natural biopolymer soluble in water, hyaluronic acid (HA) [109] was reported. In specific molar proportions, it was observed that DOX and CPT are among the most synergistic combinations with indexes of 0.01 and 0.1. This experiment caused significant reduction in mouse 4T1 breast cancer cells when administered intravenously. BT-474 human breast cancer cells were treated with CPT and DOX at a molar ratio of *R* = 4.5; both were able to inhibit 95% of cell growth. In addition, this combination induced more than 20% increase in pre-apoptotic cells compared to any single drug treatment, thus significantly improving the effectiveness of low concentrations of said drugs.

Also, regarding molecules with dual Topo inhibition factor, a series of different enantiomers of chiral Ru (II) complexes with thiophene ligands was synthesized and characterized: Ru II complexes [Ru (bpy)<sub>2</sub>(pscl)]<sup>2+</sup> and [Ru(bpy)<sub>2</sub>(psbr)]<sup>2+</sup> (Bpy = 2,2'-bipyridine, pscl = 2-(5-chlorothiophen-2-yl)imidazo[4,5-*f*][1,10]phenanthroline, psr = 2-(5-bromothiophen-2-yl)imidazo[4,5-*f*][1,10]phenanthroline) [110]. Only four of them displayed dual inhibitory activity against Topo I and II at different concentrations ranging from 8 to 14  $\mu\text{M}$ , thus acting as poison inhibitor for both enzymes.

Many natural compounds or related to the them are effectively used in anticancer therapy and have presented great Topo inhibitory action. For instance, triterpenoids collected from the species *Abies faxoniana* [111], an alkaloid of phenanthroquinolizidine (Boehmeriasin A) isolated from aqueous ethanol extract of the plant belonging to the species

*Boehmeria siamensis* Craib [112]; the synthesis of four series of derivatives of Cassiarine A (compounds extracted from the plant belonging to *Cassia siamea*) whose Topo II inhibitory capacity was over 95% at 50  $\mu\text{M}$  [113]; the synthesis of twenty five fatty acids conjugated from a series of five 3,5-bisarylidene-4-piperidones conceived as analogous to curcumin, an isolated dietary phytochemical of long curcumin known as saffron [114]; as well as the isolation and elucidation of three new compounds and five others already known isolated from the roots of *Stellera chamaejasme* L., of which four have shown Topo II inhibitory activity at concentration of 100  $\mu\text{M}$  [115].

Synthesis of new Topo inhibitors is also rationalized by the junction with portions that have DNA affinity by intercalation or groove interactions. These properties can influence both Topo inhibition and anticancer activity. Various investigations propose chemical changes in already established nuclei such as acridine and indole rings and assess whether such modifications increase or not the biological activity. This assessment is based on an interfacial inhibition mechanism which is confirmed by means of structural techniques such as crystallography [35]. However, analysis of DNA interaction and assessment of Topo inhibition might provide information on the extent of the influence of the former on the latter. The next section exposes analyses of chemical modifications to produce new promising agents for cancer therapy that are Topo inhibitors and interact with DNA.

#### 4. Topo inhibition and interaction with DNA - double mechanism for anticancer activity

The pursuit of chemical modifications to improve biological activity in molecules with antitumor properties has been widely explored once tumor cells are constantly finding cell mechanisms to resist the existent drugs [116]. As exposed, Topo enzymes are rather promising targets in the discovery of anticancer drugs from remodelling of the above-mentioned molecules. Therefore, Topo inhibition tests, *in vitro* tests of antiproliferative activity in transformed cell lines as well as physical-chemical analyses for elucidating the interaction of such compounds with DNA are commonly conducted to find likely candidates for new anticancer drugs. Results for new compounds produced in the search for new antitumor agents, DNA ligands and Topo inhibitors are found in Table 1.

Confirmation of interfacial inhibitory activity is achieved by means of structural techniques such as X-ray crystallography [117]. However, assessment of DNA-compound interactions and *in vitro* Topo inhibition tests can inform the extent of the influence of the former on the latter. To better explain the results, this session is divided accordingly to the chemical classes of the new derivatives: metallic compounds, nitrogenous heterocyclic and acridine derivatives.

##### 4.1. Metal complexes

Metal complexes are widely investigated in anticancer therapy as they are considered very important for medicinal chemistry. The investigations on this class of compounds started after the discovery of cisplatin ( $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ), one of the most used medication in cancer treatment. However, tumor cells usually develop resistance and side effects such as diarrhoea, fatigue, anaemia and neurotoxicity are rather common [11,118,119]. DNA is the cell target of platinum derivatives by the formation of adducts mostly with atom N7 of guanine or adenine bases. These interactions preferably occur in the groove of the larger double helix of DNA, where bases are more accessible. The adducts formed lead to uncoiling of DNA and induce the swivelling of its structure, which interferes with normal processes of transcription and replication. Eventually, these perturbations in DNA processing will cause cytotoxicity and lead the cancer cell to death [120]. Side effects and low specificity of platinum derivatives are due to the covalent binding to DNA and the absence of specific targets, respectively. These features stimulate the search for new organometallic derivatives with

different transition metals that present antitumor activity, capacity for non-covalent binding to DNA and enzyme inhibition such as topoisomerase [102,118,119,121–126].

New organometallic cobalt complexes were effective in inhibiting Topo I and hinting at interaction with DNA by intercalation in rich sequences of GC. DNA-complexes binding constant for the best cobalt (II) derivative **5** (9-methyl-[1,10]phenanthroline-2-carboxylic acid), was  $2.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (Table 1) (Fig. 3). Intercalation probably prevents binding to Topo as these organometallic complexes by interfacial inhibition at concentration of 25  $\mu\text{M}$ . This interaction was noted from the alterations in DNA viscosity, hypochromism of 57% by UV-vis absorption, increase in fluorescence after interaction to ctDNA and increase in denaturation temperature of 7.5 °C [11].

Inhibition of Topo II by new cobalt organometallic complexes which interact non-covalently to DNA, has also been explored. Analyses of compound **6**,  $[\text{Co}(\text{L})_2] \cdot 2\text{NO}_3$  ( $\text{L} = 4'$ -phenyl-2,2':6',2''terpyridine) (Fig. 4), showed Topo II inhibition at concentration < 30  $\mu\text{M}$ . In addition, biological assays were conducted to verify antiproliferative activity against HeLa cells (cervix cancer), with  $\text{IC}_{50}$  of 10  $\mu\text{M}$ . UV-vis, fluorescence spectroscopy and viscosity tests revealed hypochromism, fluorescent suppression and increase in viscosity after contact with DNA, respectively. Molecular docking studies indicated binding through DNA grooving in rich sequences in GC, with binding constant of  $1.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [127]. New iron organometallic complexes that bind non-covalently to DNA and inhibit Topo II activity have also been explored.

The new derivative, compound **7**, (6-(4-(ferrocenylmethylamino)butyl)-5*H*-indeno[1,2-*c*]-isoquinoline-5,11(6*H*)-dione) (Fig. 5) inhibited Topo II at concentrations of 25 and 50  $\mu\text{M}$  and showed antiproliferative potential against metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231, with  $\text{IC}_{50}$  of 0.95  $\mu\text{M}$ . Fluorescence and denaturation tests identified the type of DNA binding with binding constant of  $0.45 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (Table 1). It is noted a constant of superior binding for this derivative with lower values of  $\text{IC}_{50}$  for the tested tumor cells. However, concentration values for Topo II inhibition suggested that interfacial inhibition is the main mechanism of action [21]. Also on the new propositions of complexes for Topo II inhibition, derivatives of copper complex 1,2-diaminocyclohexane (DACH) were synthesized [128]. Biological assays revealed that compounds **8** (nalidixic acid-DACH conjugate Cu(II)) (Fig. 5) display antiproliferative activity against osteoblastoma (U2OS) cells at a concentration of 30  $\mu\text{M}$ . Topo II inhibition was achieved at a concentration of 25  $\mu\text{M}$  and followed with evidences from DNA interaction tests of groove interaction generating binding constant of  $5.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . This type of binding is confirmed mostly by DNA viscosity tests in the presence of the compound in which no alterations were detected after interaction with Topo II inhibitor and DNA.

New organometallic complexes with Topo I and II inhibitory properties in addition to DNA interaction are also objects of research in experimental cancerology. Several chemically modified polypyridyl-ruthenium derivatives were assessed for their anticancer activity [129]. Two molecules achieved satisfactory results as Topo inhibitors and anticancer agents: compounds **9** and **10**,  $([\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bfpH})](\text{ClO}_4)_2$  and  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bfpH})](\text{ClO}_4)_2$ , respectively (Fig. 6). Topo inhibition test for both molecules showed inhibitory power for Topo I and II at concentrations of 17 and 8  $\mu\text{M}$  for derivative **9**; and 18 and 13  $\mu\text{M}$  for derivative **10**. In addition, antiproliferative assays with HeLa (cervix cells), BEL-7402 (liver) and MCF7 (non-metastatic breast cells) showed that compounds **9** and **10** were active against all cells lines. In DNA interaction evaluation, UV-vis and fluorescence spectroscopies, viscosity and denaturation tests were conducted to determine DNA binding type. Hypochromism in UV-vis spectroscopy, increase in viscosity after interaction with DNA for both compounds, and increase in denaturation temperature (18.4 °C for **9** and 19.1 °C for **10**) indicated that both are DNA intercalating with constants at  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Table 1).

Studies show that two polypyridyl ruthenium (II) metallic

**Table 1**  
Organometallic compounds, Heterocyclic derivatives, thiosemicarbazones and acridine derivatives and their respective DNA binding data, Topoisomerase inhibition and antiproliferative properties.

| Compounds                                              | UV-vis spectroscopy                                                                                       | DNA binding constant                                                                   | Fluorescence                                                                                                                                                           | Viscosity                  | DNA desaturation                                | DNA binding mode                                     | Antiproliferative activity<br>IC <sub>50</sub>                                                      | Topo inhibition                                                           | Ref.                    |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Organometallic complexes</b>                        |                                                                                                           |                                                                                        |                                                                                                                                                                        |                            |                                                 |                                                      |                                                                                                     |                                                                           |                         |
| (5)                                                    | Absorption at 282 nm                                                                                      | $2.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{a}$                                              | $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 396 \text{ nm}$<br>Increase<br>$\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ | Increase                   | Increase of 7.5 °C after interaction with ctDNA | Intercalation sequences rich in G-C                  | N.E.                                                                                                | Topo I (25 µM)                                                            | [11]                    |
| (6)                                                    | Hypochromism (57%)<br>Absorption at 277 and 317 nm                                                        | $1.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                              | Decrease<br>$\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$                                                                                                                     | Constant increase          | N.E.                                            | Binding to the larger groove (Rich in C-G sequences) | 10 µM (HeLa)                                                                                        | Topo II (< 30 µM)                                                         | [126]                   |
| (7)                                                    | Hypochromism<br>N.C.<br>N.E.                                                                              | $0.45 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                              | Decrease<br>$\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$                                                                                                                     | N.E.                       | Increase of 13.7 °C                             | Intercalation                                        | 0.95 µM (MDA-MB-231)                                                                                | Topo II (25 and 50 µM)                                                    | [21]                    |
| (8)                                                    | Absorption at 263 nm<br>Hyperchromism (33–39%)<br>Absorption at 461 nm                                    | $5.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}$<br>$4.59 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}$ | Decrease<br>$\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$<br>Increase<br>N.E.                                                            | Small change<br>Increase   | N.E.<br>Increase of 18.4 °C                     | Groove Binding<br>Intercalation                      | 30 µM (U2OS)<br>$8.50 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ (BEL-7402)                                     | Topo II (25 µM)<br>Topo I (17 µM)<br>Topo II (18 µM)                      | [128]<br>[129]          |
| (10)                                                   | Hypochromism (26.13%)<br>Absorption at 457 nm<br>Hypochromism (38%)                                       | $6.37 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}$                                              | N.E.                                                                                                                                                                   | Increase                   | Increase of 19.1 °C                             | Intercalation                                        | $4.40 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ (BEL-7402)                                                     | Topo I (8 µM)<br>Topo II (13 µM)<br>Topo I (3–20 µM)<br>Topo II (3–20 µM) | [129]<br>[130]<br>[130] |
| (11)                                                   | N.E.                                                                                                      | $8.7 \pm 0.37 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                      | N.E.                                                                                                                                                                   | Increase                   | N.E.                                            | Intercalation                                        | N.E.                                                                                                | Topo I (0.1–20 µM)<br>Topo II (5.3 µM)<br>Topo II (25 µM)                 | [131]                   |
| (12)                                                   | N.E.                                                                                                      | $5.1 \pm 0.45 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                      | N.E.                                                                                                                                                                   | Increase to both           | N.E.                                            | Intercalation                                        | N.E.                                                                                                | Topo I (1.9 µM)<br>Topo II (4 µM)                                         | [131]                   |
| (13)                                                   | Absorption at 447 nm<br>Hypochromism (15.7%)<br>Absorption at 447 nm                                      | $6.49 \pm 0.21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                     | Decrease (51%)                                                                                                                                                         | Increase                   | N.E.                                            | Intercalation                                        | Less toxicity compared to cisplatin in cells HeLa                                                   | Topo I (25 µM)<br>Topo I (1.9 µM)<br>Topo II (4 µM)                       | [131]                   |
| (14)                                                   | Hypochromism (21.7%)<br>Absorption at 447 nm                                                              | $20.7 \pm 0.71 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                     | Decrease (60%)                                                                                                                                                         | Increase                   | N.R.                                            | Intercalation                                        | Less toxicity compared to cisplatin in cells HeLa                                                   | N.E.                                                                      | [134]                   |
| <b>Heterocyclic Derivatives and Thiosemicarbazones</b> |                                                                                                           |                                                                                        |                                                                                                                                                                        |                            |                                                 |                                                      |                                                                                                     |                                                                           |                         |
| (16)                                                   | Hypochromism: 360 nm<br>Hyperchromism: 460 nm and displacement to the red at 2–4 nm<br>N.C.<br>334/501 nm | $33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{b}$                                                | $\lambda_{\text{em}} = 399 \text{ nm}$ Increase                                                                                                                        | Increase after interaction | N.E.                                            | Intercalation                                        | N.E.                                                                                                | Topo I (25 µM)                                                            | [135]                   |
| (17)                                                   | Hypochromism (20%)                                                                                        | N.C.                                                                                   | Increase<br>$\lambda_{\text{ex}} = 350\text{--}650 \text{ nm}$                                                                                                         | N.E.                       | N.E.                                            | N.D.                                                 | 1.5 µM (HeLa)<br>5.5 µM (U-87)<br>5.5 µM (MCF-7)<br>0.6 µM (HeLa)<br>1.5 µM (U87)<br>1.3 µM (MCF-7) | Topo I (25 µM)                                                            | [135]                   |
| (18)                                                   | 334 nm (single)<br>Hypochromism (28%)                                                                     | N.C.                                                                                   | $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{--}650 \text{ nm}$<br>Increase                                                                                                         | N.E.                       | N.E.                                            | N.D.                                                 |                                                                                                     | Topo I (25 µM)                                                            | [135]                   |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Compounds            | UV–vis spectroscopy                                                                                              | DNA binding constant                    | Fluorescence                                                              | Viscosity | DNA desaturation                                                 | DNA binding mode                          | Antiproliferative activity<br>IC <sub>50</sub> | Topo inhibition                                                       | Ref.  |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| (19)                 | N.C.                                                                                                             | 10 <sup>6</sup> M <sup>−1b</sup>        | λ <sub>exc</sub> = 488 nm<br>λ <sub>em</sub> = 520 nm                     | N.R.      | 20.37–22.73 °C<br>Increase<br>(G4 compared to<br>duplex)<br>N.E. | Sequences rich in G (G4)<br>Intercalation | N.A.                                           | Topo Iα<br>(5.44 μM)                                                  | [136] |
| (20)                 | Hyperchromism (6%)                                                                                               | 5.69 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 526 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>600 nm;<br>Decrease | N.E.      | N.E.                                                             | N.E.                                      | 3.61 μM<br>(HL60)<br>22.47 μM<br>(K562)        | No activity<br>against Topo I                                         | [38]  |
| (21)                 | Hyperchromism (75%)                                                                                              | 4.51 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 526 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>600 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | N.E.                                      | > 50 μM (All Cells)                            | No activity<br>against Topo I                                         | [38]  |
| (22)                 | Hypochromism<br>(24%)                                                                                            | 7.26 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 526 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>600 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | N.E.                                      | 1.93 μM<br>(T47D)<br>12.78 μM<br>(HL60)        | No activity<br>against Topo I                                         | [38]  |
| (23)                 | Hypochromism (11%)                                                                                               | 6.27 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 526 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>600 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | N.E.                                      | 13.43 μM (MCF-7)                               | No activity<br>against Topo I                                         | [38]  |
| (26)                 | Hyperchromism (13%)                                                                                              | 4.3 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup>  | λ <sub>exc</sub> = 335 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>435 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | N.E.                                      | 0.01 μM<br>(K-562)<br>0.01 μM<br>(HT-29)       | Topo Iα (50 and<br>100 μM)                                            | [39]  |
| Acridine derivatives |                                                                                                                  |                                         |                                                                           |           |                                                                  |                                           |                                                |                                                                       |       |
| (27)                 | Hyperchromism (92.58%)                                                                                           | 3.77 × 10 <sup>5</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 359 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>349 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | 4.41 μM (OVGAR)                                | N.E.                                                                  | [67]  |
| (28)                 | Absorption at 420 nm<br><br>Hypochromism (60%)                                                                   | 1.68 × 10 <sup>5</sup> M <sup>−1b</sup> | Emission at 400 nm<br><br>Decrease                                        | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | 4.17 μM<br>(HicCat)<br>0.61 μM (A549)          | Topo I<br>(50, 75 and<br>100 μM)<br>Topo Iα<br>(10, 50 and<br>100 μM) | [143] |
| (29)                 | Slight bathochromism<br>Hypochromism (28.85%)                                                                    | 3.25 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 364 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>418 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | N.E.                                           | Topo I (100 and<br>200 μM)                                            | [63]  |
| (30)                 | Hypochromism (15.50%)                                                                                            | 6.01 × 10 <sup>4</sup> M <sup>−1c</sup> | λ <sub>exc</sub> = 360 nm/λ <sub>em</sub> = around<br>435 nm<br>Decrease  | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | N.E.                                           | Topo I (100 and<br>200 μM)                                            | [63]  |
| (35)                 | Absorption at 349 and 420 nm<br><br>Hypochromism (47%)<br>Slight bathochromism                                   | 1.9 × 10 <sup>5</sup> M <sup>−1c</sup>  | λ <sub>exc</sub> = 399 nm/λ <sub>em</sub> = 531 nm<br>Decrease            | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | 4.94 μM<br>(HeLa)<br>5.99 μM<br>(U1210)        | Topo I (40 μM)                                                        | [61]  |
| (36)                 | Absorption at 371 nm<br><br>Hypochromism<br>17–42%<br>Slight bathochromism<br>Absorption at 415 nm and<br>440 nm | 1.25 × 10 <sup>5</sup> M <sup>−1c</sup> | Emission at 384 nm<br>Decrease                                            | Increase  | Increase of 18.5 °C                                              | Intercalation                             | 5 μM– 57.54%<br>72 h                           | Topo I (5 and<br>60 μM)                                               | [64]  |
| (37)                 |                                                                                                                  | 1.49 × 10 <sup>5</sup> M <sup>−1a</sup> | Strong absorbance peaks at<br>about 415 nm and 440 nm                     | N.E.      | N.E.                                                             | Intercalation                             | 72 h<br>Cells HeLa<br>2.68 μM<br>(K562)        | Topo I (50 μM)                                                        | [145] |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Compounds           | UV–vis spectroscopy                                                              | DNA binding constant                              | Fluorescence                                                                                           | Viscosity      | DNA desaturation       | DNA binding mode                         | Antiproliferative activity<br>IC <sub>50</sub>                       | Topo inhibition                             | Ref.  |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------|
|                     | Hypochromism                                                                     |                                                   | Decrease                                                                                               |                |                        |                                          | 8.11 $\mu$ M<br>(HepG-2)                                             |                                             |       |
| (38)                | N.C.<br>Absorption at 426/470 nm<br>Hypochromism<br>Slight bathochromism<br>N.C. | N.C.                                              | Emission around 460 nm.<br>Decrease                                                                    | N.E.           | N.E.                   | N.E.                                     | 2.517 $\mu$ M (K562)<br>10.73 $\mu$ M (HepG2)                        | Topo I (1 $\mu$ M)                          | [2]   |
| (39)                | Absorption at 425 nm                                                             | $5.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                 | $\lambda_{\text{ex}} = 425 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = \text{around } 480 \text{ nm}$<br>Increase | Increase       | N.E.                   | Intercalation                            | 0.16–3.79 $\mu$ M (All Cells)                                        | Topo I (50 $\mu$ M)                         | [81]  |
|                     | Hypochromism<br>Slight bathochromism<br>N.C.                                     |                                                   |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      |                                             |       |
| (40, 41, 42 and 43) | Hypochromism (14–35%)                                                            | $0.126\text{--}1.394 \times 10^4 \text{ M}^{-1a}$ | Decrease                                                                                               | N.E.           | N.E.                   | Intercalation                            | N.E.                                                                 | Topo I (30 $\mu$ M)                         | [147] |
| (44)                | Hyperchromism (89.36%)                                                           | $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                 | $\lambda_{\text{ex}} = 406 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = \text{around } 466 \text{ nm}$<br>Decrease | N.E.           | N.E.                   | Intercalation                            | < 6 $\mu$ M<br>(All Cells)                                           | Topo IIc (50 and 100 $\mu$ M)               | [37]  |
| (45)                | Hypochromism (34.3%)                                                             | $0.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                | Decrease                                                                                               | No changes     | N.E.                   | Binding to the groove                    | 20 and 50 $\mu$ M (HL-60)                                            | Topo I (60 and 80 $\mu$ M)                  | [148] |
| (46)                | Hypochromism (26.6%)                                                             | $0.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                | Decrease                                                                                               | Increase       | N.E.                   | Intercalation                            | 20 and 50 $\mu$ M (HL-60)                                            | Topo I (60 and 80 $\mu$ M)                  | [148] |
|                     |                                                                                  |                                                   |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      | Topo II (5 $\mu$ M)                         |       |
| (47)                | Hypochromism (22.1%)                                                             | $0.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                | Decrease                                                                                               | Increase       | N.E.                   | Intercalation                            | 20 and 50 $\mu$ M (HL-60)                                            | Topo I (60 and 80 $\mu$ M)                  | [148] |
| (48)                | Hyperchromism                                                                    | N.C.                                              | Decrease                                                                                               | N.E.           | N.E.                   | Binding to DNA surface/<br>Intercalating | 1.09 $\mu$ M (MCF-7)<br>0.79 $\mu$ M (DU-145)<br>1.47 $\mu$ M (HeLa) | Topo II (1–100 $\mu$ M)                     | [76]  |
|                     | N.C.                                                                             |                                                   |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      |                                             |       |
| (49)                | Hyperchromism                                                                    | N.C.                                              | Decrease                                                                                               | N.E.           | N.E.                   | Binding surface/<br>Intercalation        | 2.45 $\mu$ M (MCF-7)<br>1.34 $\mu$ M (DU-145)<br>3.46 $\mu$ M (HeLa) | Topo II (1–100 $\mu$ M)                     | [76]  |
|                     | Hypochromism                                                                     |                                                   |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      |                                             |       |
|                     | N.C.                                                                             |                                                   |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      |                                             |       |
| (50)                | Absorption at 337 nm<br>Hypochromism (17%)                                       | $2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1c}$                 | $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 476 \text{ nm}$<br>Decrease                | Small Increase | Small variation (5 °C) | Intercalation                            | N.E.                                                                 | Topo I (30 $\mu$ M)<br>Topo II (50 $\mu$ M) | [32]  |
|                     | Slight bathochromism<br>Absorption at 331 nm                                     |                                                   | $\lambda_{\text{ex}} = 421 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 493.92 \text{ nm}$<br>Decrease             | Increase       | Variation of 32 °C.    | Intercalation                            | N.E.                                                                 | Topo I (5 $\mu$ M.)<br>Topo II (10 $\mu$ M) | [149] |
| (54)                | Hypochromism (58.8%)<br>Bathochromism at 10 nm                                   | $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1c}$                 |                                                                                                        |                |                        |                                          |                                                                      |                                             |       |

N.E.: Not Evaluated; N.C.: Not calculated. N.A.: Not active.

<sup>a</sup> Wolfe-Shiner Equation.<sup>b</sup> Not mentioned the origin of the constant.<sup>c</sup> McGhee and Von Hippel Equation.

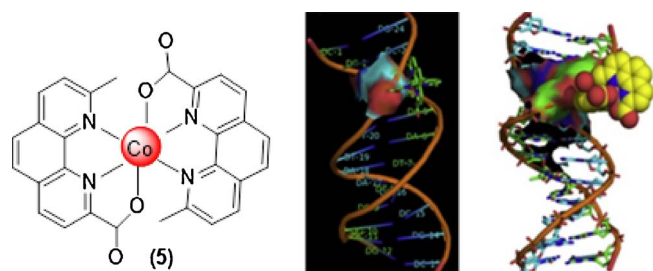


Fig. 3. Organometallic complex containing cobalt (II) and its mode of interaction with DNA by intercalation.

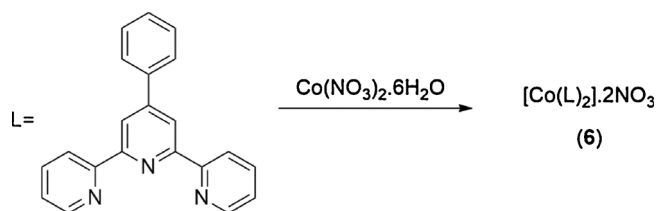


Fig. 4. Organometallic complex phenyl-terpyridine-cobalt(II) with properties Topo II inhibitor and binding to the DNA grooves.

complexes (compounds **11** and **12**) (Fig. 6) interact with DNA in the magnitude of  $10^6 \text{ M}^{-1}$  [ $K_b(\text{11}) > K_b(\text{12})$ ]. Viscosity studies assessed the type of DNA binding by comparison to ethidium bromide (EB) (already known to be a classic DNA intercalator). Increase in DNA viscosity produced by both complexes was inferior to ethidium bromide ( $\text{EB} > \text{11} > \text{12}$ ). Authors suggested two possibilities for DNA binding, intercalation or electrostatic interaction, the latter more predominantly for compound **12**. Both complexes inhibited Topo I activity by means of stabilization of the cleavage complex DNA-Topo I. Results then make evident that both compounds are Topo I poison when tested at concentrations of 3–20  $\mu\text{M}$ . Regarding Topo II inhibition, both complexes also present inhibition in a concentration-dependent manner with mechanisms of action of Topo II human poison [130].

In a subsequent work, the potential of two new ruthenium complexes obtained (compounds **13** and **14**) by replacing polypyridyl groups with dipyrrodo-phenazine (Fig. 6) [131] was discussed. In DNA binding assay, it was noted that both complexes presented hypochromic effect with red shift indicating intercalation. DNA binding constants for compounds **13** and **14** presented values of  $6.49 \pm 0.21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  and  $20.7 \pm 0.71 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectively. Fluorescence assay with EB as probe demonstrated that complexes induce fluorescent suppression. These results indicated intercalation as the type of DNA binding corroborated by the increase in DNA viscosity for both complexes in the following order:  $\text{EB} > \text{14} > \text{13}$ . Contrary to complexes **11** and **12**, Topo I inhibition occurred through catalytic inhibition which reveals the importance of groups (dipyrrodo-phenazine) for Topo inhibitor

activity. Topo II assay showed that both complexes inhibited DNA relaxation with  $\text{IC}_{50}$  values of 25 and 4  $\mu\text{M}$  respectively, thus highlighting that compound **14** inhibits DNA relaxation mediated by Topo II more effectively than compound **13**. Furthermore, results suggested that compound **13** is Topo II suppressor while compound **14** is a Topo II poison. Additional results showed reduced cytotoxicity in comparison to cisplatin when tested for HeLa cell line, which signals its potential through the of Topo inhibition action mechanism.

Results indicate the potentiality of organometallic complexes for cancer therapy with greater specificity compared to platinum derivatives. Inhibition of Topo I, Topo II or both related to non-covalent bond to DNA allows for more effective antiproliferative action. The lower values for Topo inhibition were attributed to compounds **7** and **14**, which inhibited Topo I and complex **14**, aside from inhibiting subtype I, inhibited Topo II with interfacial and catalytic inhibition mechanisms, respectively. Furthermore, they showed capacity of interacting with DNA as both intercalated in the double helix. The type of interaction was not related to concentrations of Topo I and II inhibition or antiproliferative activity. Compound **14**, containing Ruthenium presented lower values of  $\text{IC}_{50}$  for Topo I inhibition (1.9  $\mu\text{M}$ ) as well as considerable inhibitory activity as poison, presenting  $\text{IC}_{50}$  value of 4  $\mu\text{M}$ . It is likely that compound **14** best DNA binding activity and Topo inhibition are due to the presence of aromatic rings in their structure increasing lipophilia. Also, not replacing the aromatic portion of the ruthenium complex, compared to its analogous replacement with group  $\text{CO}_2\text{Me}$ , is a key factor for improving biological activity.

#### 4.2. Heterocyclic derivatives and thiosemicarbazones

A notorious class of Topo inhibitors and DNA ligands are heterocyclic derivatives due to their structural properties that facilitate interaction with DNA consequently improving antiproliferative activity. Examples are derivatives anthraquinones-thiosemicarbazones whose anticancer activity is attributed to DNA intercalation [132] and derivatives anthra[2,1-c][1,2,5]thiadiazole-6,11-dione (**15**) which are DNA intercalator as well as Topo I inhibitor [133] (Fig. 7). Seemingly, both activities (interaction with DNA and Topo inhibition) are potentialized when derivatives present heterocyclic containing nitrogen or portions of lateral chains with these atoms, such as thiosemicarbazone [132]. Thiosemicarbazone derivatives (Fig. 7) were synthesized and anticancer potential and DNA interaction were assessed [134]. DNA binding is due to coupling of orbitals  $\pi$  for compounds with orbitals  $\pi$  of the base pairs, thus reducing transition energy. The highest value for the binding constant for compound **16** ( $33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), probably is due to the presence of phenyl aromatic ring and the Fluor atom, that favours intercalation. The best interaction with DNA was followed by the highest cytotoxicity against HCT-116 cells, with values of  $\text{IC}_{50} = 31.4 \mu\text{M}$  [134] (Table 1).

Studies investigated anticancer activity of various benzimidazole derivatives [135]. Two molecules displayed satisfactory performance as

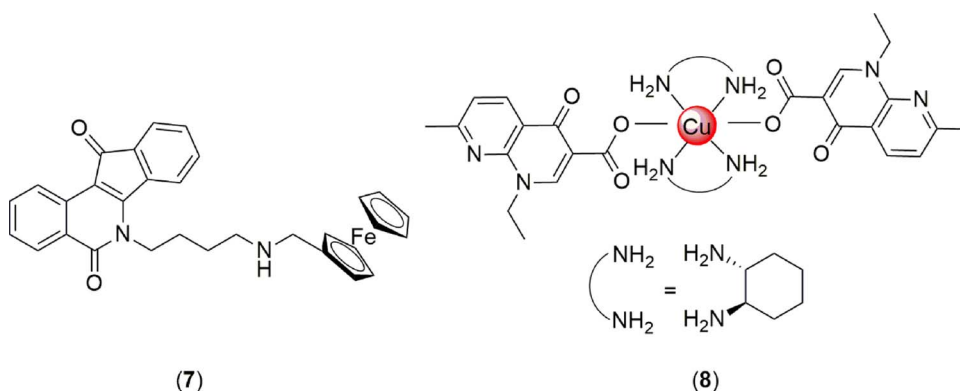


Fig. 5. Chemical structures of ferrocenyl-isoquinoline (**7**) and nalidixic acid-DACH conjugate Cu (II) (**8**) derivatives, promising in anticancer activity due to interaction with DNA and inhibition of topoisomerase.

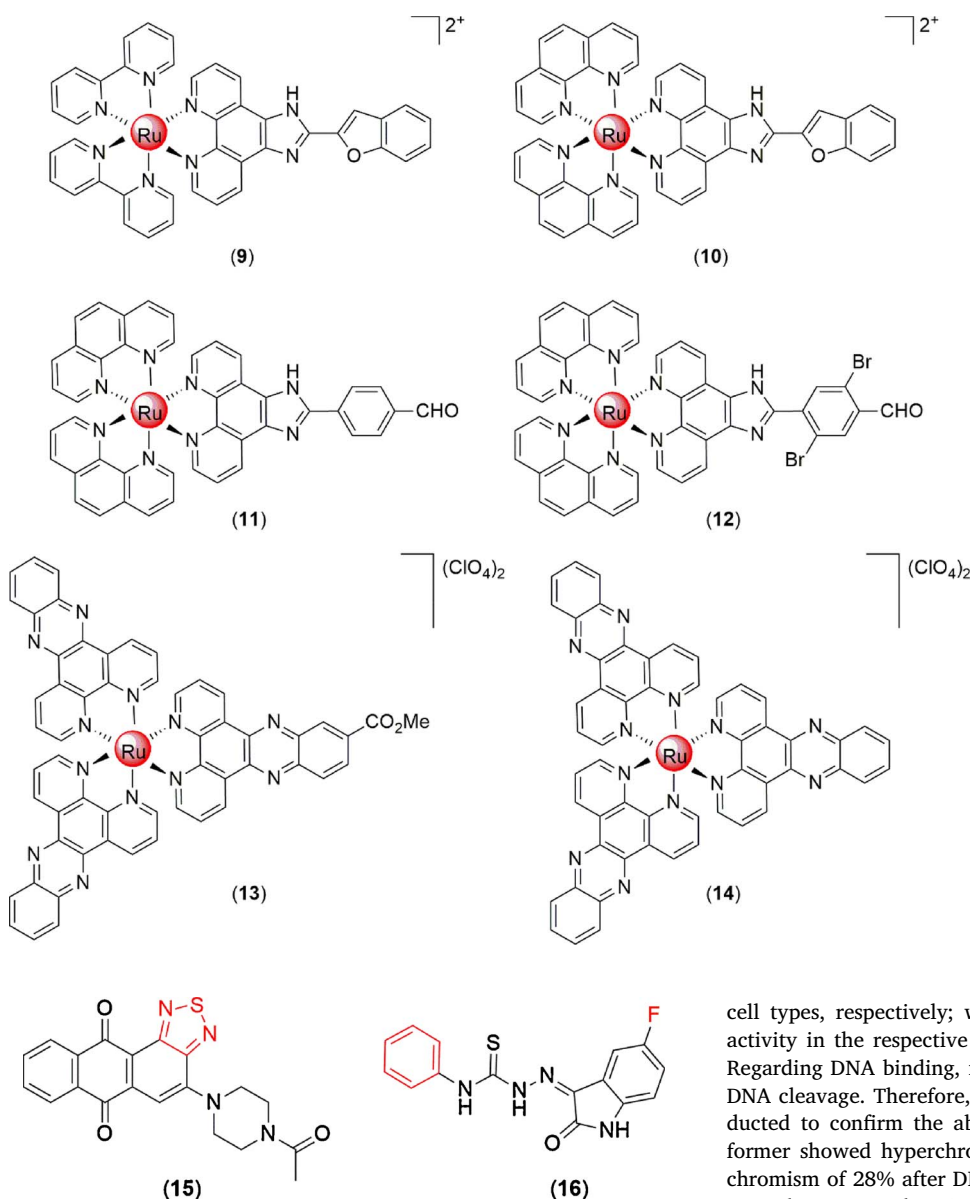
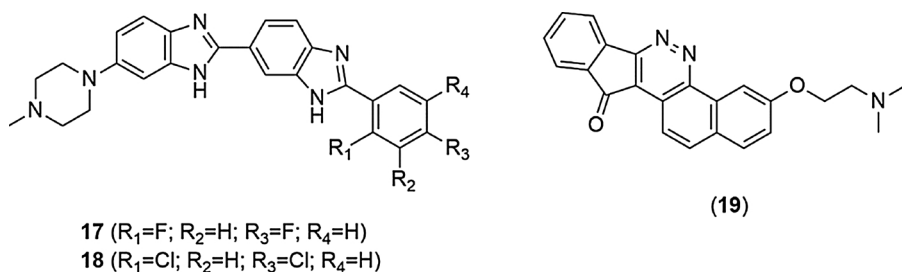


Fig. 7. Thiadiazole-antraquinone and isatin-thiosemicarbazone derivatives that interacted with DNA and presented Topo inhibition.

Topo inhibitor and anticancer agents, compounds **17** and **18** (2-(2,4-difluorophenyl)-5-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]-1*H* benzimidazole and 2-(2,4-dichlorophenyl)-5-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]-1*H*-benzimidazole) (Fig. 8). Both molecules showed potential to inhibit Topo enzyme at a concentration of ~25  $\mu$ M. In antiproliferative assays with HeLa (cervix cells), U87(glioblastoma) and MCF7 (non-metastatic breast), compound **17** was active at concentrations of 1.5  $\mu$ M, 5.5  $\mu$ M and 5.5  $\mu$ M for all three



cell types, respectively; whereas compound **18** presented anticancer activity in the respective concentrations, 0.6  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M and 1.3  $\mu$ M. Regarding DNA binding, it is known that these molecules act through DNA cleavage. Therefore, UV-vis spectroscopy experiments were conducted to confirm the absence of intercalating action, in which the former showed hyperchromism of 20% and the latter showed hypochromism of 28% after DNA interaction. Fluorescence emission, on its turn, demonstrated an increase for both molecules. These results corroborate the initial hypothesis and do not suggest an intercalating bond. Therefore, DNA binding constant was not calculated.

Specificity of anticancer activity for heterocyclic nitrogenous compounds have been correlated to specific region binding in DNA and Topo II inhibition as evidenced for derivatives indeno[1,2-*c*]cinnoline [136]. DNA interaction studies were conducted with sequences of oligonucleotides duplex and quadruplex (G4) which are intermediaries rich in guanine, important in the replication of genome and their break by means of intercalator agents is a therapeutic option used against tumor progression. Compound **19** (5-(2-(dimethylamino)ethoxy)-13*H*-benzo[*h*]indeno[1,2-*c*]cinnoline-13-one) (Fig. 8) inhibited Topo II $\alpha$  at a

Fig. 8. Benzimidazole (**17** and **18**) and indeno-cinnoline (**19**) derivatives, promising for cancer chemotherapeutic.

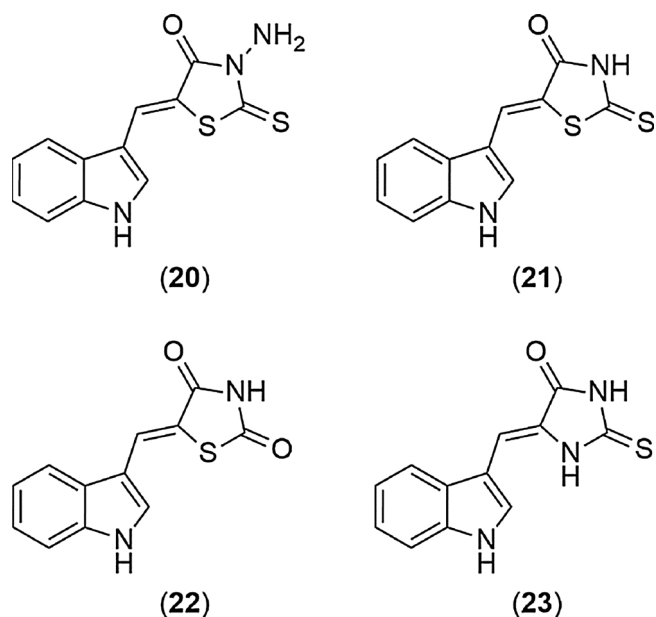


Fig. 9. Thiazolidines and imidazolidines indole-based derivatives which exhibited interaction with DNA via grooves.

concentration of 5.44  $\mu\text{M}$ . However, it did not show satisfying antiproliferative potential against HeLa and MCF7 cell lines. Data from fluorescence and denaturation tests for duplex and G4 sequences suggest that the Topo II $\alpha$  inhibitor under analysis is an intercalator with greater affinity to quadruplex sequences whose binding constant was in the order of  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Table 1).

Great attention has been paid to new indole derivatives for their anticancer properties [100], Topo inhibition [92,137] and DNA interaction [138]. Recent studies have shown Topo I inhibitory activity and antiproliferative activity for new indole derivatives in some cell lines [38]. Although compounds 20, 21, 22 e 23 (Fig. 9) 5-(1H-indol-3-ylmethylene)-3-amino-2-thioxothiazolidin-4-one, 5-(1H-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-thiazolidin-4-one, 5-(1H-indol-3-ylmethylene)-thiazolidin-2,4-dione and 5-(1H-indol-3-ylmethylene)-2-thioxoimidazolidin-4-one have not displayed Topo inhibitory activity, they acted as antiproliferative agents when tested for leukaemia (HL60, K562), and breast cancer (T47D and MCF7) cell lines. UV-Vis and fluorescence spectroscopies were conducted to verify the DNA binding type. The interaction with DNA was confirmed by hyperchromic and hypochromic effects. Fluorescence results from BE displacement test showed decrease in light emission after compounds interaction with DNA. Binding constants ranged from  $4.51\text{--}7.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , suggesting groove binding.

Recently, a series of 18 new dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-chlorophenylpyridines were synthesized and assessed through Topo inhibition screening test [139]. Camptothecin and etoposide were used as positive control as Topo I and II selective inhibitors, respectively. Compounds (Fig. 10) were tested at concentrations of 20 and 100  $\mu\text{M}$ . Derivatives 24 and 25 were the most potent for Topo I inhibition for both concentrations, to which compound 24 showed inhibition of

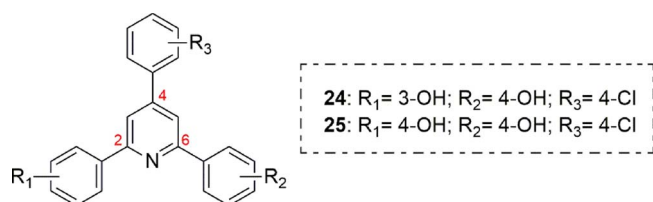


Fig. 10. Dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-chlorophenylpyridine derivatives with antiproliferative, DNA binding and Topo inhibition properties.

28.2% and 70.6% (20 and 100  $\mu\text{M}$ ) and compound 25 showed inhibition of 23.7% and 82.7% (20 and 100  $\mu\text{M}$ ), compared to camptothecin which showed inhibition of 21.6% and 63.0%. Regarding Topo II inhibition, compound 25 was the most potent of the series showing enzymatic inhibition of 57% and 100% when compared to etoposide which presented inhibition of 23.5% and 69.7% at the same concentrations (20 and 100  $\mu\text{M}$ ). All compounds in the series were assessed for three cell lines: breast (T47D), colorectal (HCT15) and cervix (HeLa) showing significant antiproliferative activity. Compound 24 presented values of  $\text{IC}_{50} = 5.35$ , 0.84 and 0.58  $\mu\text{M}$  for lines T47D, HCT15 and HeLa respectively, whereas compound 25 presented values of  $\text{IC}_{50} = 4.89$ , 0.93 and 5.06  $\mu\text{M}$  for lines T47D, HCT15 and HeLa respectively. Due to these results, compound 25 was selected for further investigations. Regarding the type of interaction of the compound, stabilization assay for the cleavage complex pointed that the compound did not induce the formation of linear DNA at concentrations superior to 500  $\mu\text{M}$ , indicating it does not act as Topo II poison. Similarly, in the assay of band depletion, etoposide depleted free Topo II due to its stabilizing action in the covalent complex Topo II $\alpha$ -DNA while treatment with compound 25 showed intense band of free Topo II $\alpha$ . These data suggest that compound 25 acts as Topo II $\alpha$  catalytic inhibitor. EB assay showed that the compound is not a DNA intercalator.

Finally, Topo inhibition and their respective antiproliferative actions were analysed in derivatives of thiosemicarbazones indole-based (compound 26) (Fig. 11) [39]. Antiproliferative activity was tested on glioma (U251), leukaemia (K-562), breast (MCF7) and (NCI-ADR), kidney (786-O), lung (NCI-460), ovary (OVCAR), prostate (PC-3), colon and normal keratinocyte (HaCat) cell lines. Biological assays for these cell lines obtained  $\text{GI}_{50}$  (concentration that inhibit 50% of cell growth) of 0.92  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 6.48  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.38  $\mu\text{M}$ , 0.21  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$  and 0.59  $\mu\text{M}$ , respectively. Regarding DNA binding evaluation, UV-vis spectroscopy and fluorescence tests indicate activity with binding constant of  $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Results indicate the potentiality of nitrogenous heterocyclic for cancer therapy, on account of its interaction to DNA, Topo I and Topo II inhibition or even both. Several chemical modifications were noted in the structure of future candidates to antitumor drugs resulting in satisfactory biological activities. Benzimidazoles derivatives (compounds 17 and 18) presented Topo inhibition at concentration of 25  $\mu\text{M}$ , suggesting their chemical structures, containing various conjugated aromatic rings and atoms that benefit interactions through their electron pairs, are fundamental for the desired biological activities. It is noted that compound 18 is the most promising derivative as it presents the best  $\text{IC}_{50}$  values in antiproliferative studies and DNA interaction with double helix cleavage.

#### 4.3. Acridine derivatives

Acridine derivatives are promising compounds for cancer therapy with biological activity based on DNA binding and Topo inhibition. *m*-AMSA is an anticancer agent that displays activity against refractory acute leukaemia as well as Hodgkin and non-Hodgkin's lymphomas due its DNA-intercalation and inhibition of Topo II [36]. Previous work has elucidated that *m*-AMSA is an interfacial inhibitor [117]. Analysis by ray-X crystallography demonstrated that Top2 cleavage complex was

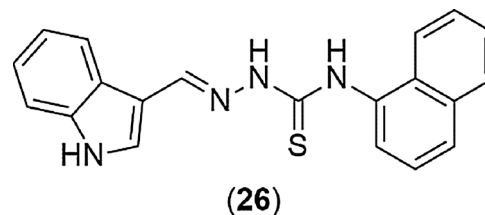


Fig. 11. Indole-thiosemicarbazone derivative which presented antiproliferative activity on HT-29 line, cell cycle arrest on G2/M phase, DNA interaction and Topo II $\alpha$  inhibition.

stabilized by *m*-AMSA through the formation of a pair of 5'-phosphotyrosyl covalent linkages and the presence of a double-strand DNA break was defined in the resulting electron density maps. Results also highlighted that, in addition to DNA intercalation, there are other interactions between the protein and the bound drug required to arrest the drug in the Top2-mediated DNA cleavage site. These extensive networks of protein–drug interactions stabilize the cleavage site-specific binding by hydrogen bond and van der Waals interactions of *m*-AMSA methanesulfonamide moiety (Fig. 2). According the results, the authors formulated three general guidelines for developing isoform-specific targeting agents as follows: (i) A polycyclic aromatic core is required to facilitate drug intercalation into the DNA cleavage site; (ii) Attaching a branching moiety (or moieties) that fits between the protein and DNA minor groove to the aromatic core enhances the affinity of the drug and specificity toward the cleavage site; and (iii) Introducing a branching moiety to the aromatic core that extends toward the DNA major groove aids in mediating isoform-specific interactions. Diverse chemical modifications have been made using acridine ring as main compound for producing new anticancer agents. Generally, these new derivatives are evaluated for their DNA-binding and antiproliferative properties and their correlation is analysed [2,60,61,64,69,140–142].

The versatility of acridine ring is due to the possibilities of replacement with the synthesis of new derivatives by means of binding of lateral groups that increase their anticancer effects, DNA binding and Topo inhibition. Generally, the power of DNA binding inherent to the planar aromatic structure of the acridine ring is kept. Examples are given by the new derivatives of the series acridine-thiosemicarbazone which were synthesized by our group and had their antiproliferative activities and type of DNA binding assessed [67]. Results show that compound 27 ((*Z*)-2-(acridin-9-ylmethylene)-*N*-phenylhydrazinecarbothioamide) (Fig. 12) was active against glioma (U251), leukaemia (K-562), breast (MCF7) and (NCI-ADR), kidney (786-0), lung (NCI-460), ovary (OVCAR), prostate (PC-3), colon and normal keratinocyte (HaCat) cell lines with total growth inhibition (TGI) in the respective concentrations of 8.74  $\mu$ M, 9.26  $\mu$ M, 6.85  $\mu$ M, 6.35  $\mu$ M, 7.99  $\mu$ M, 6.97  $\mu$ M, 4.41  $\mu$ M, 6.30  $\mu$ M, 7.54  $\mu$ M and 4.17  $\mu$ M. Interaction with DNA was confirmed by hyperchromism (92.58%) in UV–vis absorption and fluorescent suppression with indication of DNA intercalation and binding constant of  $3.77 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . This derivative presents Topo inhibitory property (results to be published).

Acridine derivatives also demonstrate Topo I and II dual inhibitory activity [143]. From the produced series, compound 28 (6-chloro-2-methoxy-*N*-(4-methoxybenzyl)acridin-9-amine) (Fig. 12) presented activity against lung (A549) tumor cells in which the concentration of 0.61  $\mu$ M reduced their viability. The derivative intercalated to DNA with binding constant of  $1.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Our research group has been using the strategy of covalently binding the acridine ring to other heterocyclic nuclei such as

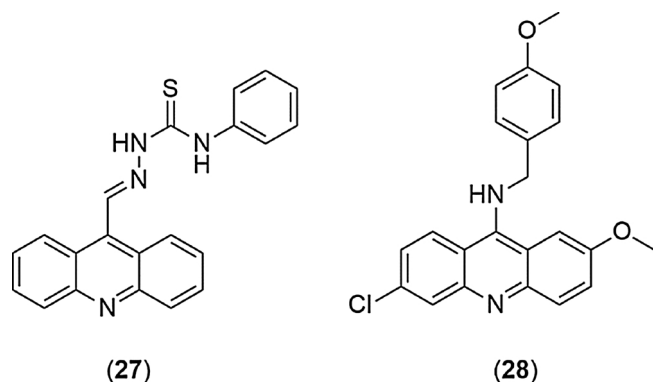


Fig. 12. Acridin-9-thiosemicarbazone (27) and acridin-9-benzylamine (28) derivatives with lateral groups that increased their anticancer effects.

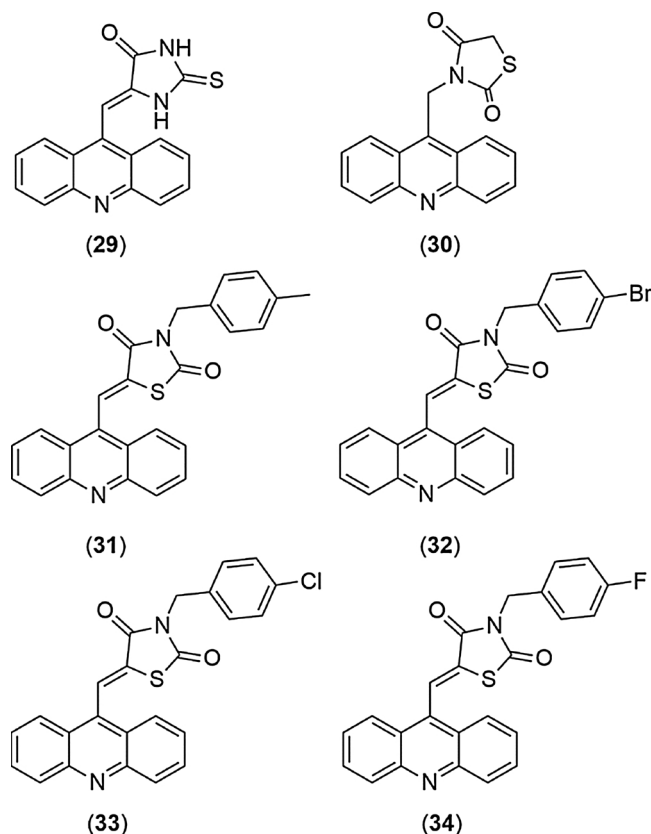
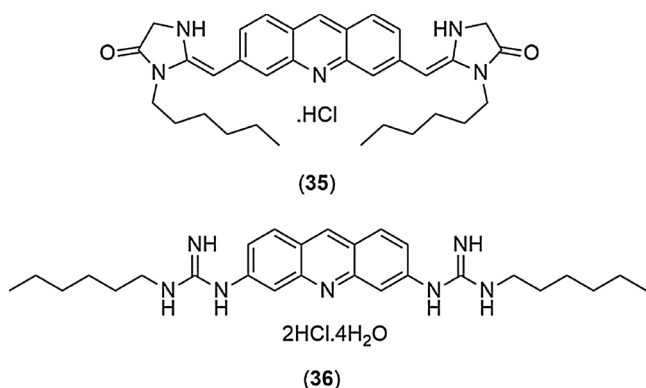


Fig. 13. Thiazacridine and imidazacridine derivatives that presented Topo I inhibition and DNA binding by intercalation or distortion in the double helix.

thiazolidine and imidazolidine generating thiazacridine and imidazacridine derivatives, respectively [63,140,144]. These derivatives keep their DNA interaction properties and have shown to be Topo I inhibitors. Two acridine derivatives 29 and 30 (5-acridin-9-ylmethylene-2-thioxoimidazolidin-4-one and 3-acridin-9-ylmethylthiazolidine-2,4-dione) (Fig. 13), displayed satisfactory inhibition activity for Topo I with DNA binding constants of  $3.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $6.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectively and DNA binding through intercalation [63]. New acridine-thiazolidine derivatives were synthesized by coupling of the acridine ring to the thiazolidine nuclei (compounds 31, 32, 33 e 34) (Fig. 13) [140]. Double stranded DNA interaction (dsDNA) was assessed with biosensors, all derivatives caused distortion in the double helix, consequently exposing DNA bases to oxidation. Cytotoxicity of derivatives was assessed against several tumor cell lines with *m*-AMSA as positive control. Thiazacridine displayed good activity against colon carcinoma and glioblastoma cells, but were not active against leukaemia, breast carcinoma and normal lymphoblastic cells. In spite of less active than *m*-AMSA, the selectivity for solid tumor cells is interesting once *m*-AMSA is not effective in the treatment of these tumors. Subsequent investigations revealed that the same thiazacridine derivatives induced adenocarcinoma colorectal cell (HCT-8) death by apoptosis of keeping DNA binding and Topo I inhibitory activity.

Proflavine derivatives replaced at positions 3 and 6 with imidazolidinone were obtained by functionalization with groups isothiocyanates [61]. New derivatives presented two symmetrical imidazolidinone rings 3,6-bis((1-alkyl-5-oxo-imidazolidin-2-ylidene)imino)acridine hydrochlorides. Results for ctDNA interaction revealed binding constants for the new derivatives in the range of intercalator agents ( $10^4$ – $10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Data from the type of interaction indicate that acridine skeleton inserts itself between the base pairs of DNA through weak interactions. However, binding constants decreased as the substituent alkyl chain increased in both imidazolidinone rings in the order



ethyl > propyl > butyl > pentyl > hexyl. These compounds were tested on HL-60 (human leukemia), L1210 (murine leukemia) and HeLa (human uterus carcinoma) cells. Compound 35 (3,6-bis((1-n-hexyl-5-oxo-imidazolidin-2-ylidene)imino)-acridine hydrochloride) (Fig. 14) was the most active with  $IC_{50}$  value of = 2.44  $\mu$ M for HL-60 cells (seven times the standard *m*-AMSA  $IC_{50}$  = 0.34  $\mu$ M) and against L1210 cells = 4.31  $\mu$ M, more active than 9-aminoacridine with value of  $IC_{50}$  = 45.0  $\mu$ M, but less active than *m*-AMSA ( $IC_{50}$  = 0.05  $\mu$ M). Topo I test showed inhibition at concentration of 40  $\mu$ M even though only the derivatives with greater alkyl chains are capable of penetrating cell membrane and suppressing cell proliferation.

Similar results were obtained for derivatives of the series 3,6-bis(3-alkylguanidino)acridine [64]. Results showed that compound 36 (acridine-3,6-diylidimino)bis[(n-hexylamino)methaniminium]dichloride tetrahydrate) (Fig. 14) was more effective in inhibiting Topo I. The compound was active in antiproliferative test against HeLa cells with 70% inhibition of cell growth after 72 h of treatment. UV-vis spectroscopy, fluorescence and viscosity tests were conducted to verify the type of DNA binding. Spectroscopy data revealed hypochromism at 371 nm and slight bathochromic shift. Denaturation temperature increased 18.5 °C after DNA interaction. These data indicate DNA intercalation with binding constant of  $1.25 \times 10^5$   $M^{-1}$ .

Studies have also investigated the capacity of acridine derivatives to inhibit Topo I enzyme [145]. The compound that presented the best performance in enzymatic inhibition assay was derivative 37 (*N*-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)-2-butylacridin-9-amine) (Fig. 14) at concentration of 50  $\mu$ M. Antiproliferative tests with leukemia (K562) hepatic cell (HepG-2) cell lines demonstrated  $IC_{50}$  values of 2.68  $\mu$ M and 8.11  $\mu$ M, respectively. Chemical modifications did not change the mode of DNA binding of acridine ring which is the intercalation with  $K_b$  de  $1.49 \times 10^5$   $M^{-1}$ . Anti-Topo I mechanism of action and similar profile of antiproliferative activity were found for compound 9-benzoyloxyacridine [146]. DNA interaction studies indicated binding, however the type and the constant were not determined.

The link of the pyridine ring to the lateral chain in the synthesis of new acridine derivatives indicated to be a promising strategy to discover new anticancer compounds whose mechanisms of action are DNA binding and Topo I inhibition. Derivative 38 (*N*-((pyridin-2-yl)methyl)acridine-9-amine) (Fig. 15) presented antiproliferative action against cells K562 and HepG-2 (see Table 1) and total inhibition of Topo I at concentration of 1  $\mu$ M, but the authors failed in determining the type of DNA-derivative binding [2]. Reinforcing the significance of the pyridine ring for the synthesis of new acridine derivatives a new series was synthesized and assessed giving, *N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-methyl-9-oxo-1-((pyridin-4-ylmethyl)amino)-9,10-dihydroacridine-4-carboxamide (compound 39) (Fig. 15) as the most active compound [81]. The compound presented Topo I inhibitory activity and antiproliferative activity against cell lines of NCI-H520, U251, A375, A172, HeLa, CNE-2, U118-MG, HepG2 and MCF-7 with respective  $IC_{50}$  values of 1.03  $\mu$ M, 0.79  $\mu$ M, 0.16  $\mu$ M, 2.20  $\mu$ M, 3.79  $\mu$ M, 0.98  $\mu$ M, 1.08  $\mu$ M, 0.32  $\mu$ M,

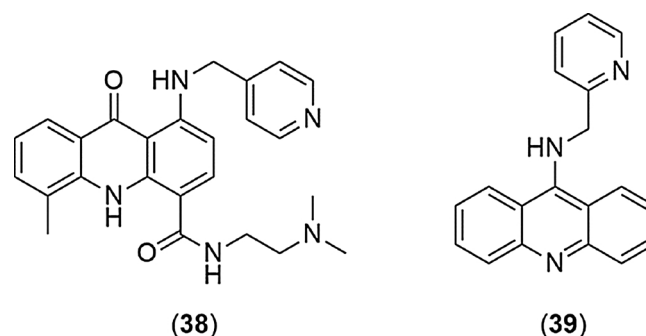
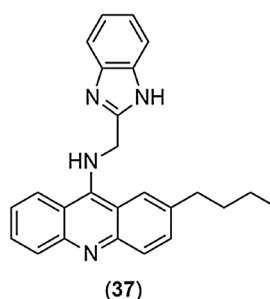


Fig. 15. Acridine-9-pyridine-benzilamines which inhibited Topo I activity at low concentration (1  $\mu$ M).

2.55  $\mu$ M. Besides, the study determined intercalation as the type of DNA binding with constant of  $5.1 \times 10^4$   $M^{-1}$ .

New oxazoles spiroacridines were synthesized and assessed for their DNA interaction and Topo I inhibitory abilities [147]. The combination of hypochromicity and red shift in UV-vis light absorption, fluorescent suppression in EB competitive test with Stern-Volmer constant ( $K_{SV}$ ) from  $0.126 \times 10^4$ – $1.394 \times 10^4$   $M^{-1}$  and spectral analysis of Circular Dichroism (CD) confirmed DNA intercalation for these compounds. Higher constants of fluorescent suppression were attributed to the presence of electron-withdrawing groups ( $-NO_2$  e  $-Br$ ), opposed to the methoxy group ( $-OCH_3$ ) which presented lower constant. Compounds 40, 41, 42 and 43 (Fig. 16) inhibited Topo I at 30  $\mu$ M as indicated by SC shape (super helical) as the main band while NC shape (nicked open circular) and R (relaxed) disappeared. However, other compounds displayed partial Topo I inhibition at the same concentration.

Our group synthesized new spiro-acridine derivatives by introducing cyano-*N*-acylhydrazone group between the acridine and (non- and methoxy-substituted) phenyl rings followed by spontaneous cyclization [37]. These compounds were evaluated for their DNA binding properties as well as for both I and II human Topo inhibition activity, besides the antiproliferative evaluation. Unlike oxazoles spiroacridines derivatives, these derivatives presented Topo II inhibitory activity of the poison type by stabilization of the cleavage complex. The methoxy-substituted derivative (compound 44) (Fig. 16) was active for all cancer cell lines with concentration of total growth inhibition (TGI) < 6  $\mu$ M. UV-vis and fluorescence spectroscopies were used to analyse the type of binding to DNA. The former presented hypochromism of 89.36% and fluorescent suppression indicated intercalation as DNA binding mode and binding constant of  $2.5 \times 10^4$   $M^{-1}$ .

On the other hand, new acridine derivatives with dual Topo inhibitory ability, intercalating properties and DNA groove binding, were synthesized [148]. Compounds 45, 46 and 47 (Fig. 17) presented decrease in absorption (hypochromism of 34.3, 26.6 and 22.1%, respectively) in the presence of DNA with binding constants in the magnitude of  $10^4$   $M^{-1}$ . UV-vis and fluorescence spectroscopy, CD and viscosity

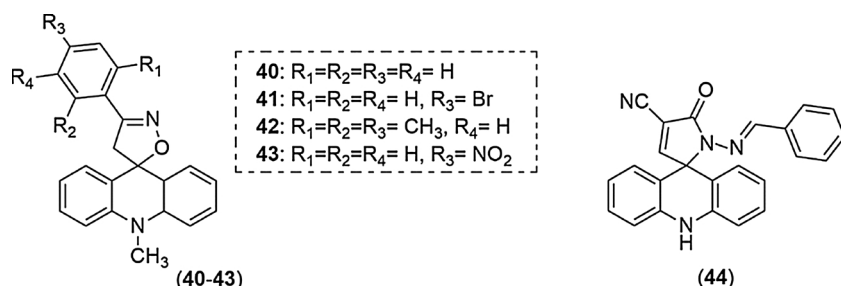


Fig. 16. New spiroacridine derivatives presenting important electron withdrawing groups for their DNA interaction and Topo inhibition.

were used to analyse DNA binding for all three compounds. CD studies confirmed that these derivatives cause DNA uncoiling by intercalation between the base pairs of DNA. However, viscosity studies showed that derivatives 46 and 47 are intercalators while compound 46 interacted with DNA by groove binding. Viscosity results can be correlated to absorption data in which compounds with higher binding constants were the ones with increased viscosity. Relaxation assay for Topo I showed that all three compounds displayed significant DNA relaxation at concentrations 60 and 80  $\mu\text{M}$ . This might be related to the intercalation of the compounds to the Topo enzyme binding site. Therefore, the ternary complex Topo-DNA-Ligand is strongly stabilized in these conditions. Regarding Topo II inhibition, only compound 47 was capable of inhibiting enzyme activity at concentration of 5  $\mu\text{M}$ , probably due to the binding of diphenylamines linked to thiazolidinone ring.

Data presented so far indicate that structural modifications in the acridine ring for the synthesis of new derivatives generate intercalating compounds with binding constants within the expected range. However, binding to some groups as lateral chains such as imidazolidine [61], cause the concomitance of two DNA binding types: intercalation and groove binding. Similar result was achieved in the synthesis of a series of  $\beta$ -carboline-dithiocarbamates derivatives [76]. The synthesized compounds were tested on 4 cancer cell lines: lung (A549), breast (MCF-7), prostate (DU-145), cervix (HeLa). Among all the compounds assessed that presented cytotoxicity for all tested lines ( $< 10 \mu\text{M}$ ), compounds 48 and 49 (Fig. 18) were the most active for prostate cell lines with IC<sub>50</sub> of 1.34 and 0.79  $\mu\text{M}$ , respectively. Compounds with Fluor or trifluoromethyl bonded to the phenyl ring in both series, demonstrated higher cytotoxicity. The best compounds of the series (48 and 49) were selected for DNA interaction and Topo II inhibitory tests. Results demonstrate that compound 49 probably is a Topo II catalytic inhibitor given it did not induce formation of linear DNA. On the other hand, Topo II interfacial inhibition was the mechanism attributed to compound 48. DNA interaction tests showed intercalation and groove binding for both derivatives, however the former was more pronounced for derivative 49 due to the planarity, as corroborated in CD analysis.

The search for acridine derivatives to be more effective as anticancer agents stimulates the proposition of chemical modifications to

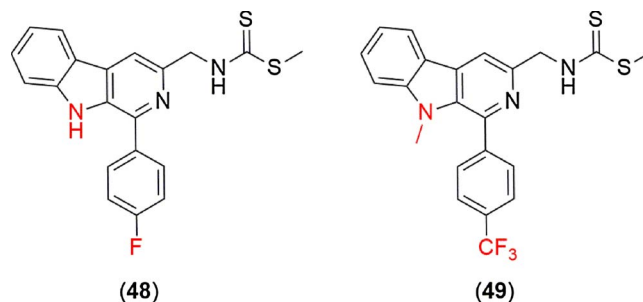


Fig. 18.  $\beta$ -Carboline-dithiocarbamate derivatives (–NH and –NCH<sub>3</sub>) with fluoro or trifluoromethyl linked to the phenyl ring which presented DNA interaction and Topo II inhibition.

develop new compounds with Topo I and II inhibitory activities. New monotacrine (50) and bistacrine (51–53) derivatives (Fig. 19) were synthesized and evaluated for their ctDNA binding capacity and Topo I and II inhibition [32]. The interaction with ctDNA for the derivatives was monitored by UV–vis absorption between 250–400 nm which detected hypochromism and slight bathochromism after compound-DNA contact. The derivatives showed binding constant in the range of  $1.6 \times 10^4$ – $2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Derivative *N*-(piperazinoethyl)-*N*-(1,2,3,4-tetrahydroacridine-9-yl)amine (50) showed higher binding constant values probably due to the greater space between intercalating portions. Fluorescence and viscosity results confirmed that the intercalating power of bistacrine derivatives was lower than those presented by monotacrine derivative. Both inhibited *in vitro* Topo I and II.

Like the acridine derivative molecules above mentioned, new compounds were synthesized and tested for dual Topo inhibition potential and DNA interaction [149]. Results show that compound 54 (6-chloro-2-methoxy-*N*-[2-(piperazine-1-yl)ethyl]acridine-9-ylamine) (Fig. 20) presented more effective Topo I and II inhibitory activity compared to the remaining compounds at concentrations 5 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively. Furthermore, this derivative presented antiproliferative activity against leukemia (HL60) cell lines. UV-Vis and fluorescence spectroscopies, and viscosity tests were conducted to confirm DNA binding type. Intercalation of derivative 54 in the double helix was

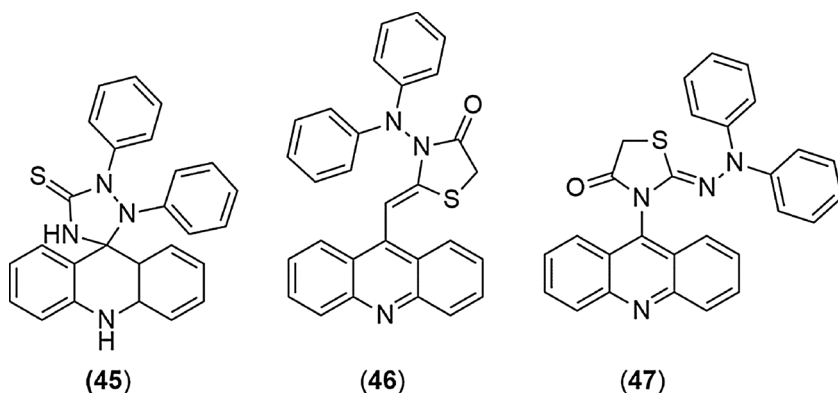


Fig. 17. Acridine derivatives with diphenyl groups (especially, diphenylamine) with inhibitory properties for both Topo I and II, intercalating properties and DNA groove binding.

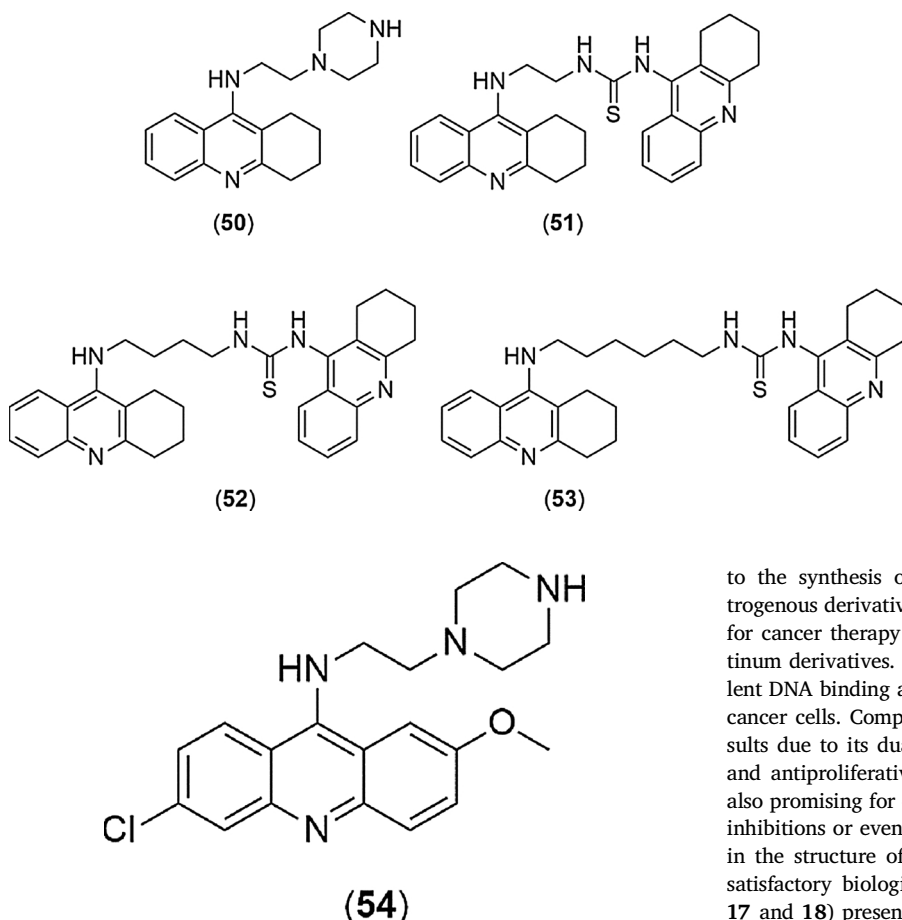


Fig. 20. Compound 6-chloro-2-methoxy-acridine linked to piperazinyl group presented Topo I and II inhibition and DNA intercalation.

confirmed by hypochromism, fluorescent suppression, increase in viscosity and denaturation temperature after interaction with DNA. DNA binding constant was  $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Table 1).

Based on these results, it was noted the inexistence of a clear relation between the observed variables (binding constant, concentration for Topo inhibition and antiproliferative activity as well as DNA binding type). Differences in the activity profiles of these molecules are due to chemical modifications which change physical-chemical properties, and interfere with their biological properties. The most common modifications to chemical structures were linkage of aromatic and heterocyclic to acridine ring for improving their pharmacological properties. The most promising derivatives were spiroacridines (44) and compound 49 as they presented antiproliferative activity at low concentrations, DNA intercalation and Topo II inhibition. Compound 49 was more active as it also inhibits Topo I enzyme. Acridine derivatives are rather promising for anticancer activity as their planar ring structure provides their molecules with stability thus improving their DNA interaction as well as allowing the more effective inhibition of Topo activity. Structural studies with DNA-Topo-compound complexes are still necessary to confirm if these new derivatives are interfacial Topo inhibitors.

## 5. Conclusion

Discovery of new anticancer agents capable of interacting with DNA, as well as inhibiting topoisomerase enzymes is in evidence in oncology. Based on the present review, several chemical modifications were identified to the synthesis of new compounds from nuclei or metals with well-established pharmacological value in medicinal chemistry. Results refer

Fig. 19. Monotacrine e bis-tacrine derivatives, dual Topo I and II inhibitors and DNA binders.

to the synthesis of new organometallic compounds, heterocyclic nitrogenous derivatives and acridine derivatives. Organometallic potential for cancer therapy is due to greater specificity when compared to platinum derivatives. Topo I and II inhibition or both related to non-covalent DNA binding allow a more effective antiproliferative action against cancer cells. Compound 14 containing ruthenium stands out in the results due to its dual Topo inhibition, DNA interaction by intercalation and antiproliferative activity. Heterocyclic nitrogenous derivatives are also promising for cancer therapy due to DNA interaction, Topo I and II inhibitions or even both. Several chemical modifications were observed in the structure of future candidates to anticancer drugs, resulting in satisfactory biological activity. Benzimidazole derivatives (compounds 17 and 18) presented Topo inhibition at concentrations of  $25 \mu\text{M}$ , suggesting their chemical structures containing several conjugated aromatic rings and atoms, allow for interactions through their electron pairs which are essential for biological activities. It is emphasized that compound 18 was the most promising as it presented antiproliferative activity at low concentrations. Furthermore, it was verified the action of this derivative concerning DNA interaction, which led to the cleavage of the double helix. Acridine derivatives, on their turn, are the object of numerous studies to propose new compounds with Topo inhibition properties and DNA interaction through intercalation or groove binding, the latter promoted by lateral groups covalently binding to the acridine ring. The most common modifications of the acridine ring correspond to the covalent binding of aromatic and heterocyclic to improve pharmacological activity. Spiroacridines (44) and compound 49 were the most promising, as they presented antiproliferative activities at low concentrations, DNA intercalating power and Topo II inhibition. Compound 49 was more effective as it also inhibited Topo I. In total, acridine derivatives were significantly promising for anticancer activity as their planar ring structure provide rigidity to their molecules, enabling better interaction with DNA and allowing for more effective inhibition of Topo enzymes. Data on DNA binding constant, binding type, Topo inhibition concentration and antiproliferative activity for all compounds under analysis did not reveal clear correlations, nor it was verified any sort of pattern. However, results indicate that DNA binding and Topo inhibition are widely explored mechanisms and most promising in the proposition of new anticancer candidates.

## 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), FACEPE (Fundo de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brazil) for financial support.

## References

- [1] C. Zhang, Y. Qu, B. Niu, Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 5781–5786.
- [2] B. Li, C.M. Gao, Q.S. Sun, L.L. Li, C.Y. Tan, H.X. Liu, Y.Y. Jiang, Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I inhibitors, *Chin. Chem. Lett.* 25 (2014) 1021–1024.
- [3] S. Park, T.B.T. Magar, T.M. Kadayat, H.J. Lee, G. Bist, A. Shrestha, E.S. Lee, Y. Kwon, Rational design, synthesis, and evaluation of novel 2,4-chloro- and hydroxy-substituted diphenyl benzofuro[3,2-b]pyridines: non-intercalative catalytic topoisomerase I and II dual inhibitor, *Eur. J. Med. Chem.* 127 (2017) 318–333.
- [4] S. Park, T.M. Kadayat, K.Y. Jun, T.B.T. Magar, G. Bist, A. Shrestha, E.S. Lee, Y. Kwon, Novel 2-aryl-4-(40-hydroxyphenyl)-5H-indeno[1,2-b]pyridines as potent DNA non-intercalative topoisomerase catalytic inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 14–28.
- [5] V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, A.R. Mulukova, D.S. Baev, E.K. Khushnudinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev, Stereoselective synthesis of 11-phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid and investigation of its human topoisomerase I and II inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 2405–2408.
- [6] M. Dobbelsstein, Y. Moll, Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 179–196.
- [7] L.D. Via, G. Marzaro, A. Ferrareso, O. Gia, A. Chilin, Pyrroloquinolinone-based dual topoisomerase I/II inhibitor, *Eur. J. Med. Chem.* 77 (2014) 103–109.
- [8] T.M. Kadayat, C. Park, K.Y. Jun, T.B.T. Magar, G. Bist, H.Y. Yoo, Y. Kwon, E.S. Lee, Hydroxylated 2,4-diphenyl indenopyridine derivatives as a selective non-intercalative topoisomerase II $\alpha$  catalytic inhibitor, *Eur. J. Med. Chem.* 90 (2015) 302–314.
- [9] T.M. Kadayat, C. Park, K.Y. Jun, T.B.T. Magar, G. Bist, H.Y. Yoo, Y. Kwon, E.S. Lee, Design and synthesis of novel 2,4-diaryl-5H-indeno[1,2-b]pyridine derivatives, and their evaluation of topoisomerase inhibitory activity and cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 160–173.
- [10] F. Bisceglie, A. Musiari, S. Pinelli, R. Alinovi, I. Menozzi, E. Polverini, P. Tarasconi, M. Tavone, G. Pelosi, Quinoline-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Cu(II) and Ni(II) complexes as topoisomerase II $\alpha$  inhibitors, *J. Inorg. Biochem.* 152 (2015) 10–19.
- [11] M. Ahmad, M. Afzal, S. Tabassum, B. Kalinska, J. Mrozinski, P.K. Bharadwaj, Synthesis and structure elucidation of a cobalt(II) complex as topoisomerase I inhibitor: in vitro DNA binding, nuclease and RBC hemolysis, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 683–693.
- [12] Y.S. Tan, K.K. Ooi, K.P. Ang, A. Akim, Y.K. Cheah, S.N.A. Halim, H.L. Seng, E.R.T. Tiekink, Molecular mechanisms of apoptosis and cell selectivity of zinc dithiocarbamates functionalized with hydroxyethyl substituents, *J. Inorg. Biochem.* 150 (2015) 48–62.
- [13] Y. Shen, W. Chen, B. Zhao, H. Hao, Z. Li, C. Lu, Y. Shen, CS1 is a novel topoisomerase II $\alpha$  inhibitor with favorable drug resistance profiles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453 (2014) 302–308.
- [14] P. Majumdar, C. Bathula, S.M. Basu, S.K. Das, R. Agarwal, S. Hati, A. Singh, S. Sen, B.B. Das, Design, synthesis and evaluation of thiohydantoin derivatives as potente topoisomerase I (Top1) inhibitors with anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* 102 (2015) 540–551.
- [15] S. Tabassum, M. Zaki, M. Afzal, F. Arjmand, Synthesis and characterization of Cu (II)-based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase Ia: in vitro DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 509–523.
- [16] J.P. Zhang, J. Huang, C. Liu, X.F. Lu, B.X. Wu, L. Zhao, N. Lu, Q.L. Guo, Z.Y. Li, C. Jiang, Discovery of a series of pyridopyrimidine derivatives as potential topoisomerase I inhibitors, *Chin. Chem. Lett.* 25 (2014) 1025–1028.
- [17] M.S. Islam, S. Park, C. Song, A.A. Kadi, Y. Kwon, A.F.M.M. Rahman, Fluorescein hydrazones: a series of novel non-intercalative topoisomerase II $\alpha$  catalytic inhibitors induce G1 arrest and apoptosis in breast and colon cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 49–67.
- [18] L.M. Yu, X.R. Zhang, X.B. Li, Y. Yang, H.Y. Wei, X.X. He, L.Q. Gu, Z.S. Huang, Y. Pommier, L.K. An, Synthesis and biological evaluation of 6-substituted indolizinoquinolinediones as catalytic DNA topoisomerase I inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 525–533.
- [19] Z.X. Li, J. Li, Y. Li, K. You, H. Xu, J. Wang, Novel insights into the apoptosis mechanism of DNA topoisomerase I inhibitor isoliquiritigenin on HCC tumor cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464 (2015) 548–553.
- [20] S.T. Chew, K.M. Lo, S.K. Lee, M.P. Heng, W.Y. Teoh, K.S. Sim, K.W. Tan, Copper complexes with phosphonium containing hydrazone ligand: topoisomerase inhibition and cytotoxicity study, *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 397–407.
- [21] N. Wambang, N. Schifano-Faux, A. Aillerie, B. Baldeyrou, C. Jacquet, C. Bal-Mahieu, T. Bousquet, S. Pellegrini, P.T. Ndifon, S. Meignan, J.F. Goossens, A. Lansiaux, L. Pélini, Synthesis and biological activity of ferrocenyl indeno[1,2-c] isoquinolines as topoisomerase II inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 651–660.
- [22] R. Karki, C. Song, T.M. Kadayat, T.B.T. Magar, G. Bist, A. Shrestha, Y. Na, Y. Kwon, E.S. Lee, Topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure–activity relationship study of dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-aryl pyridines, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 3638–3654.
- [23] T.X. Nguyen, M. Abdelmalak, C. Marchand, K. Agama, Y. Pommier, M. Cushman, Synthesis and biological evaluation of nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-hydroxyindenoisoquinolines as potential dual topoisomerase I (top1) – tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (TDP1) inhibitors, *J. Med. Chem.* 58 (7) (2015) 3188–3208.
- [24] D.B. Khadka, H. Woo, S.H. Yang, C. Zhao, Y. Jin, T.N. Le, Y. Kwon, W.J. Cho, Modification of 3-arylisquinolines into 3,4-diarylisquinolines and assessment of their cytotoxicity and topoisomerase inhibition, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 583–607.
- [25] B.L. Yao, Y.W. Mai, S.B. Chen, H.T. Xie, P.F. Yao, T.M. Ou, J.H. Tan, H.G. Wang, D. Li, S.L. Huang, L.Q. Gu, Z.S. Huang, Design, synthesis and biological evaluation of novel 7-alkylamino substituted benzo[a]phenazin derivatives as dual topoisomerase I/II inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 540–553.
- [26] N. Ucuncuoglu, I. Andricioaei, L. Sari, Insights from simulations into the mechanism of human topoisomerase I: explanation for a seeming controversy in experiments, *J. Mol. Graphics Model.* 44 (2013) 286–296.
- [27] H.F. Lin, H.L. Huang, J.F. Liao, C.C. Shen, R.L. Huang, Dicentrine analogue-induced G2/M arrest and apoptosis through inhibition of topoisomerase II activity in human cancer cells, *Planta Med.* 81 (2015) 830–837.
- [28] M.N. Drwal, J. Marinello, S.G. Manzo, L.P.G. Wakelin, G. Capranico, R. Griffith, Novel DNA topoisomerase II $\alpha$  inhibitors from combined ligand- and structure-based virtual screening, *PLoS One* 9 (12) (2014), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114904>.
- [29] M.K. Chan, N.A. Fadzil, A.L. Chew, B.Y. Khoo, New molecular biologist perspective and insight: DNA topoisomerases production by recombinant DNA technology for medical laboratory application and pharmaceutical industry, *Electron. J. Biotechnol.* 16 (2013) 1–10.
- [30] J. Nateewattana, S. Dutta, S. Reabroi, R. Saeeng, S. Kasemsook, A. Chairoungdua, J. Weerachayaphorn, S. Wongkham, P. Piyachaturawat, Induction of apoptosis in cholangiocarcinoma by an andrographolide analogue is mediated through topoisomerase II  $\alpha$  inhibition, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 148–155.
- [31] D.B. Khadka, G.H. Tran, S. Shin, H.T.M. Nguyen, H.T. Cao, C. Zhao, Y. Jin, H.T.M. Van, M.V. Chau, Y. Kwon, T.N. Le, W.J. Cho, Substituted 2-arylquinazolinones: design, synthesis, and evaluation of cytotoxicity and inhibition of topoisomerases, *Eur. J. Med. Chem.* 103 (2015) 69–79.
- [32] J. Janocková, J. Plšíková, J. Koval', R. Jendzelovský, J. Mikeš, J. Kašpárková, V. Brabec, S. Hamuláková, P. Fedorocko, M. Kozurková, Tacrine derivatives as dual topoisomerase I and II catalytic inhibitors, *Bioorg. Chem.* 59 (2015) 168–176.
- [33] C. Bailly, Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3611–3640.
- [34] Y. Pommier, Drugging topoisomerases: lessons and challenges, *ACS Chem. Biol.* 8 (1) (2013) 82–95.
- [35] Y. Pommier, E. Kiselev, C. Marchand, Interfacial inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 3961–3965.
- [36] A.C. Ketron, W.A. Denny, D.E. Graves, N. Osheroff, Amsacrine as a topoisomerase II Poison: importance of drug-DNA interactions, *Biochemistry* 51 (2012) 1730–1739.
- [37] S.M.V. Almeida, E.A. Lafayette, W.L. Silva, V.L. Serafim, T.M. Menezes, J.L. Neves, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I.C. Beltrão, L.B.C. Júnior, M.C.A. Lima, New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 467–475.
- [38] E.A. Lafayette, S.M.V. de Almeida, R.V.C. Santos, J.F. de Oliveira, C.Ad.C. Amorim, R.M.F. da Silva, M.Gd.R. Pitta, Id.R. Pitta, R.O. de Moura, L.B. de Carvalho Júnior, M.J.B. de Melo Rêgo, Md.C.A. de Lima, Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities, *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 511–522.
- [39] J.F. de Oliveira, T.S. Lima, D.B. Vendramini-Costa, S.C.B.L. Pedrosa, E.A. Lafayette, R.M.F. da Silva, S.M.V. de Almeida, R.O. de Moura, A.L.T.G. Ruiz, J.E. de Carvalho, M.C.A. de Lima, Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay, *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 305–314.
- [40] X. Pei, J. Zhang, J. Liu, Clinical applications of nucleic acid aptamers in cancer (review), *Mol. Clin. Oncol.* 2 (2014) 341–348.
- [41] C.M. Alexander, K.L. Hamner, M.M. Maye, J.C. Dabrowiak, Multifunctional DNA-gold nanoparticles for targeted doxorubicin delivery, *Bioconjug. Chem.* 25 (2014) 1261–1271.
- [42] A. Ali, S. Bhattacharya, DNA binders in clinical trials and chemotherapy, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 4506–4521.
- [43] J. Zhu, L. Chen, Y. Dong, J. Li, X. Liu, Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe, *Spectrochim. Acta Part A* 124 (2014) 78–83.
- [44] A. Rescifina, C. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: synthesis, activity, and modeling, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 95–115.
- [45] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug–DNA Interactions and their study by UV-visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry, *J. Photochem. Photobiol. B* 124 (2013) 1–19.
- [46] L. Strekowski, B. Wilson, Noncovalent interactions with DNA: an overview, *Mutat. Res.* 623 (2007) 3–13.
- [47] E. Kuruvilla, J. Joseph, D. Ramaiah, Novel bifunctional acridine-acridinium conjugates: synthesis and study of their chromophore-selective electron-transfer and DNA-binding properties, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 21997–22002.
- [48] E. Grueso, G. López-Pérez, M. Castellano, R. Prado-Gotor, Thermodynamic and structural study of phenanthroline derivative ruthenium complex/DNA interactions: probing partial intercalation and binding properties, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 1–9.
- [49] P. Basu, D. Bhowmik, G.S. Kumar, The benzophenanthridine alkaloid chelerythrine binds to DNA by intercalation: photophysical aspects and thermodynamic

- results of iminium *versus* alkanolamine interaction, J. Photochem. Photobiol. B 129 (2013) 57–68.
- [50] A.K. Williams, S.C. DaSilva, A. Bhatta, B. Rawal, M. Liu, E.A. Korobkova, Determination of the drug–DNA binding modes using fluorescence-based assays, Anal. Biochem. 422 (2012) 66–73.
- [51] H. Lei, X. Wang, C. Wu, Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations, J. Mol. Graphics Model. 38 (2012) 279–289.
- [52] D.K. Jangir, S.K. Dey, S. Kundu, R. Mehrotra, Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques, J. Photochem. Photobiol. B 114 (2012) 38–43.
- [53] D.K. Jangir, S. Charak, R. Mehrotra, S. Kundu, FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA, J. Photochem. Photobiol. B 105 (2011) 143–148.
- [54] N. Shahabadi, L. Heidari, Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods, Spectrochim. Acta A 97 (2012) 406–410.
- [55] B.A.D. Neto, A.A.M. Lapis, Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends, Molecules 14 (2009) 1725–1746.
- [56] P. Anitha, N. Chitrapriya, Y.J. Jang, P. Viswanathamurthi, Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone, J. Photochem. Photobiol. B 129 (2013) 17–26.
- [57] Y. Temerk, M. Ibrahim, H. Ibrahim, M. Kotb, Interactions of an anticancer drug formestane with single and double stranded DNA at physiological conditions, J. Photochem. Photobiol. B 149 (2015) 27–36.
- [58] H.A. El-Asmy, I.S. Butler, Z.S. Mouhri, B.J. Jean-Claude, M. Emmam, S.I. Mostafa, Synthesis, characterization and DNA interaction studies of new complexes containing 2-mercaptobenzothiazole and different dinitrogen or phosphorous aromatic donors, Inorg. Chim. Acta 441 (2016) 20–33.
- [59] D. Hegde, G.N. Naik, R.S. Vadavi, V.S. Kumar, D.A. Barretto, K.B. Gudasi, Transition metal complexes of N0-(2-(hydroxyimino)propanoyl) isonicotinohydrazide: synthesis, characterization, DNA interaction and anticancer evaluation, Inorg. Chim. Acta 461 (2017) 301–315.
- [60] C. Gao, F. Liu, X. Luan, C. Tan, H. Liu, Y. Xie, Y. Jin, Y. Jiang, Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents, Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 7507–7514.
- [61] L. Janovec, M. Kozurkova, D. Sabolova, J. Ungvarsky, H. Paulikova, J. Pliskova, Z. Vantova, J. Imrich, Cytotoxic 3,6-bis(imidazolidinone)iminoacridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling, Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 1790–1801.
- [62] Z. Jannesari, H. Hadadzadeh, T. Khayamian, B. Maleki, H.A. Rudbari, Experimental and molecular modeling studies on the interaction of the Ru(II)-pinoxicam with DNA and BSA, Eur. J. Med. Chem. 69 (2013) 577–590.
- [63] E.A. Lafayette, S.M.V. de Almeida, M.Gd.R. Pitta, E.I.C. Beltrão, T.G. da Silva, R.O. de Moura, Id.R. Pitta, L.B. de Carvalho Júnior, Md.C.A. de Lima, Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives, Molecules 18 (2013) 15035–15050.
- [64] J. Pliskova, L. Janovec, J. Koval, J. Ungvarsky, J. Mikes, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, J. Imrich, P. Kristian, J. Kasparkova, V. Brabec, M. Kozurkova, 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents, Eur. J. Med. Chem. 57 (2012) 283–295.
- [65] H. Ihmels, D. Otto, Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments, Top. Curr. Chem. 258 (2005) 161–204.
- [66] V. Thamilarasan, N. Sengottuvelan, N. Stalin, P. Srinivasan, G. Chakkaravarthi, Synthesis, interactions, molecular structure, biological properties and molecular docking studies on Mn, Co, Zn complexes containing acetylacetone and pyridine ligands with DNA duplex, J. Photochem. Photobiol. B 160 (2016) 110–120.
- [67] S.M.V. de Almeida, E.A. Lafayette, L.P.B.G. da Silva, C.Ad.C. Amorim, T.B. de Oliveira, A.L.T.G. Ruiz, J.E. de Carvalho, R.O. de Moura, E.I.C. Beltrão, Md.C.A. de Lima, L.B. de Carvalho Júnior, Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives, Int. J. Mol. Sci. 16 (2015) 13023–13042.
- [68] C.K. Jain, S. Roychoudhury, H.K. Majumder, Selective killing of G2 decatenation checkpoint defective colon cancer cells by catalytic topoisomerase II inhibitor, Biochim. Biophys. Acta 1853 (2015) 1195–1204.
- [69] Z. Zhang, S. Chen, H. Mei, J. Xuan, X. Guo, L. Couch, V.N. Dobrovolsky, L. Guo, N. Mei, *Ginkgo biloba* leaf extract induces DNA damage by inhibiting topoisomerase II activity in human hepatic cells, Sci. Rep. 5 (2015) 14633.
- [70] C.C. Yu, S.L. Pan, S.W. Chao, S.P. Liu, J.L. Hsu, Y.C. Yang, T.K. Li, W.J. Huang, J.H. Guh, A novel small molecule hybrid of vorinostat and DACA displays anticancer activity against human hormone-refractory metastatic prostate cancer through dual inhibition of histone deacetylase and topoisomerase I, Biochem. Pharmacol. 90 (2014) 320–330.
- [71] K.J. Akerman, A.M. Fagenson, V. Cyril, M. Taylor, M.T. Muller, M.P. Akerman, O.Q. Munro, Gold(III) macrocycles: nucleotide-specific unconventional catalytic inhibitors of human topoisomerase I, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 5670–5682.
- [72] J. Moukharskaya, C. Verschraegen, Topoisomerase I inhibitors and cancer therapy, Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 26 (2012) 507–525.
- [73] Y. Pommier, Y. Sun, S.N. Huang, J.L. Nitiss, Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17 (2016) 703–721.
- [74] B. Pogorelnik, M. Brvar, B. Zegura, M. Filipic, T. Solmajer, A. Perdih, Discovery of mono- and disubstituted 1H-pyrazolo[3,4-pyrimidines and 9H-purines as catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II $\alpha$ , ChemMedChem 10 (2015) 345–359.
- [75] J. Qiu, B. Zhao, W. Zhong, Y. Shen, H. Lin, Synthesis, biological evaluation and modeling studies of terphenyl topoisomerase II $\alpha$  inhibitors as anticancer agents, Eur. J. Med. Chem. 94 (2015) 427–435.
- [76] A. Kamal, M. Sathish, V.L. Nayak, V. Srinivasulu, B. Kavitha, Y. Tangella, D. Thummuri, C. Bagul, N. Shankaraiah, N. Nagesh, Design and synthesis of di-thiocarbamate linked  $\beta$ -carboline derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 5511–5526.
- [77] Y. Xu, C. Her, Inhibition of topoisomerase (DNA) I (top1): DNA damage repair and anticancer therapy, Biomolecules. 5 (2015) 1652–1670.
- [78] X.W. Liu, Y.M. Shen, J.S. Shu, Y. Xiao, S.B. Zhang, J.L. Lu, DNA interaction, photocleavage and topoisomerase I inhibition by Ru(II) complex with a new ligand possessing phenazine unit, J. Fluoresc. 25 (2015) 1527–1535.
- [79] A. Mazza, E.M. Beccalli, A. Contini, A.N. Garcia-Argaez, L.D. Via, M.L. Gelmi, A new scaffold of topoisomerase I inhibitors: design, synthesis and biological evaluation, Eur. J. Med. Chem. 124 (2016) 326–339.
- [80] I. Kümler, N. Brünner, J. Stenvang, E. Balslev, D.L. Nielsen, A systematic review on topoisomerase I inhibition in the treatment of metastatic breast cancer, Breast Cancer Res. Treat. 138 (2013) 347–358.
- [81] C. Zhang, S. Li, L. Ji, S. Liu, Z. Li, S. Li, X. Meng, Design, synthesis and antitumor activity of non-camptothecin topoisomerase I inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 25 (2015) 4693–4696.
- [82] A.D. Salvo, P. Dugois, D. Tandeo, M. Peltekian, P.K.T. Lin, Synthesis, cytotoxicity and DNA binding of oxoazabenz[de]anthracenes derivatives in colon cancer caco-2 cells, Eur. J. Med. Chem. 69 (2013) 754–761.
- [83] Y. Zhou, X. Xu, Y. Sun, H. Wang, H. Sun, Q. You, Synthesis, cytotoxicity and topoisomerase II inhibitory activity of lomefloxacin derivatives, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 2974–2978.
- [84] Y. Seol, H. Zhang, K. Agama, N. Lorence, Y. Pommier, K.C. Neuman, Single-molecule supercoil relaxation assay as a screening tool to determine the mechanism and efficacy of human topoisomerase IB inhibitors, Mol. Cancer Ther. 14 (2015) 2552–2559.
- [85] P.C. Lv, K. Agama, C. Marchand, Y. Pommier, M. Cushman, Design, synthesis, and biological evaluation of O2-modified indenisoquinolines as dual topoisomerase I – tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors, J. Med. Chem. 57 (2014) 4324–4336.
- [86] R. Karki, C. Park, K.Y. Jun, J.G. Jee, J.H. Lee, P. Thapa, T.M. Kadayat, Y. Kwon, E.S. Lee, Synthesis, antitumor activity, and structure-activity relationship study of trihydroxylated 2,4,6-triphenyl pyridines as potent and selective topoisomerase II inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 84 (2014) 555–565.
- [87] R. Karki, C. Park, K.Y. Jun, T.M. Kadayat, E.S. Lee, Y. Kwon, Synthesis and biological activity of 2,4-di-*p*-phenyl-6-2-furanylpyridine as a potent topoisomerase II poison, Eur. J. Med. Chem. 90 (2015) 360–378.
- [88] P.H. Li, P. Zeng, S.B. Chen, P.F. Yao, Y.W. Mai, J.H. Tan, T.M. Ou, S. Huang, D. Li, L.Q. Gu, Z.S. Huang, Synthesis and mechanism studies of 1, 3-benzoxazolyl substituted pyrrolo[2,3-*b*]pyrazine derivatives as non-intercalative topoisomerase II catalytic inhibitors, J. Med. Chem. 59 (1) (2016) 238–252.
- [89] K.R. Vann, Y. Ergün, S. Zencir, S. Oncuoglu, N. Osherooff, Z. Topcu, Inhibition of human DNA topoisomerase II $\alpha$  by two novel ellipticine derivatives, Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016) 1809–1812.
- [90] S. Deng, T. Yan, T. Nikolova, D. Fuhrmann, A. Nemecek, U. Gödtel-Armbrust, B. Kaina, L. Wojnowski, The catalytic topoisomerase II inhibitor dexrazoxane induces DNA breaks, ATF3 and the DNA damage response in cancer cells, Br. J. Pharmacol. 172 (2015) 2246–2257.
- [91] S.H. Kim, E. Lee, K.H. Baek, H.B. Kwon, H. Woo, E.S. Lee, Y. Kwon, Y. Na, Chalcones, inhibitors for topoisomerase I and cathepsin B and L, as potential anti cancer agents, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 3320–3324.
- [92] M. Kashyap, S. Kandeekar, A.T. Baviskar, D. Das, R. Preet, P. Mohapatra, S.R. Satapathy, S. Siddharth, S.K. Guchhait, C.N. Kundu, U.C. Banerjee, Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 934–938.
- [93] Z. Wu, Y. Zhao, Y. Zhang, L. Zhu, HY-2, a novel DNA topoisomerase II inhibitor, induces G2/M cell cycle arrest in HCT-116 cells, J. Chemother. 26 (2014) 342–347.
- [94] T.M. Kadayat, C. Song, S. Shin, T.B.T. Magar, G. Bist, A. Shrestha, P. Thapa, Y. Na, Y. Kwon, E.S. Lee, Synthesis, topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure-activity relationship study of 2-phenyl- or hydroxylated 2-phenyl-4-aryl 5Hindeno[1,2-*b*]pyridines, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 3499–3512.
- [95] A. Siewek, A. Bielawska, E. Maciorkowska, M. Lepiarczyk, K. Bielawski, N. Trotsko, M. Wujec, Cytotoxicity and topoisomerase I/II inhibition activity of novel 4-aryl/alkyl-1-(piperidin-4-yl)-carbonylthiosemicarbazides and 4-benzoylthiosemicarbazides, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 29 (2014) 243–248.
- [96] A.A. Godbole, W. Ahmed, R.S. Bhat, E.K. Bradley, S. Ekins, V. Nagaraja, Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I by m-AMSA, a eukaryotic type II topoisomerase poison, Biochem. Biophys. Res. Commun. 446 (2014) 916–920.
- [97] G. Zagotto, A. Gianoncelli, C. Sissi, C. Marzano, V. Gandin, R. Pasquale, G. Capranico, G. Ribaudo, M. Palumbo, Novel Ametantrone-amsacrine related hybrids as topoisomerase II $\beta$  poisons and cytotoxic agents, Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 347 (2014) 728–737.
- [98] X. Wang, Z. Chen, L. Tong, S. Tan, W. Zhou, T. Peng, K. Han, J. Ding, H. Xie, Y. Xu, Naphthalimides exhibit *in vitro* antiproliferative and antiangiogenic activities by inhibiting both topoisomerase II (topo II) and receptor tyrosine kinases (RTKs), Eur. J. Med. Chem. 65 (2013) 477–486.
- [99] A. Chimento, C. Saturnino, D. Iacopetta, R. Mazzotta, A. Caruso, M.R. Plutino,

- A. Mariconda, A. Ramunno, M.S. Sinicropi, V. Pezzi, P. Longo, Inhibition of human topoisomerase I and II and anti-proliferative effects on MCF-7 cells by new titanocene complexes, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 7302–7312.
- [100] S.M. Chang, W. Christian, M.H. Wu, T.L. Chen, Y.W. Lin, C.S. Suen, H.B. Pidugu, D. Detroja, A. Shah, M.J. Hwang, T.L. Su, T.C. Lee, Novel indolizino[8,7-b]indole hybrids as anti-small cell lung cancer agents: regioselective modulation of topoisomerase II inhibitory and DNA crosslinking activities, *Eur. J. Med. Chem.* 127 (2017) 235–249.
- [101] Q. Zhao, X. Xu, Z. Xie, X. Liu, Q. You, Q. Guo, Y. Zhong, Z. Li, Design, synthesis and biological evaluation of 3-substituted indenoisoquinoline derivatives as topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 1068–1072.
- [102] J. Albert, R. Bosque, M. Crespo, J. Granell, C. López, R. Martín, A. González, A. Jayaraman, J. Quirante, C. Calvis, J. Badía, L. Baldomà, M. Font-Bardia, M. Cascante, R. Messegue, Neutral and ionic platinum compounds containing a cyclometallated chiral primary amine: synthesis, antitumor activity, DNA interaction and topoisomerase I–cathepsin B inhibition, *Dalton Trans.* 44 (2015) 13602–13614.
- [103] B. Zhang, K. Chen, N. Wang, C. Gao, Q. Sun, L. Li, Y. Chen, C. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Molecular design, synthesis and biological research of novel pyridyl acridones as potent DNA-binding and apoptosis-inducing agents, *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 214–226.
- [104] C.L. Chen, F.L. Liu, C.C. Lee, T.C. Chen, W.W. Chang, J.H. Guh, A.A.A. Ali, D.M. Chang, H.S. Huang, Ring fusion strategy for the synthesis of anthra[2,3-d]oxazole-2-thione-5,10-dione homologues as DNA topoisomerase inhibitors and as antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 87 (2014) 30–38.
- [105] H.T.M. Van, H. Woo, H.M. Jeong, D.B. Khadka, S.H. Yang, C. Zhao, Y. Jin, E.S. Lee, K.Y. Lee, Y. Kwon, W.J. Cho, Design, synthesis and systematic evaluation of cytotoxic 3-heteroarylisoquinolinamines as topoisomerases inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) 181–194.
- [106] B. Cao, H. Chen, Y. Gao, C. Niu, Y. Zhang, L. Li, CIP-36, a novel topoisomerase II-targeting agent, induces the apoptosis of multidrug-resistant cancer cells *in vitro*, *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 771–776.
- [107] N. Shankaraiah, N.P. Kumar, S.B. Amula, S. Nekkanti, M.K. Jeengar, V.G.M. Naidu, T.S. Reddy, A. Kamal, One-pot synthesis of podophyllotoxin–thiourea congeners by employing  $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}/\text{NaI}$ : anticancer activity, DNA topoisomerase-II inhibition, and apoptosis inducing agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 4239–4244.
- [108] P. Thapa, K.Y. Jun, T.M. Kadayat, C. Park, Z. Zheng, T.B.T. Magar, G. Bist, A. Shrestha, Y. Na, Y. Kwon, E.S. Lee, Design and synthesis of conformationally constrained hydroxylated 4-phenyl-2-aryl chromenopyridines as novel and selective topoisomerase II-targeted antiproliferative agents, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 6454–6466.
- [109] K.M. Camacho, S. Kumar, S. Menegatti, D.R. Vogus, A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Synergistic antitumor activity of camptothecin-doxorubicin combinations and their conjugates with hyaluronic acid, *J. Control. Release* 210 (2015) 198–207.
- [110] Y.C. Wang, C. Qian, Z.L. Peng, X.J. Hou, L.L. Wang, H. Chao, L.N. Ji, Dual topoisomerase I and II poisoning by chiral Ru(II) complexes containing 2-thiophenylimidazo[4,5-f][1,10] phenanthroline derivatives, *J. Inorg. Biochem.* 130 (2014) 15–27.
- [111] G.W. Wang, C. Lv, X. Yuan, J. Ye, H.Z. Jin, L. Shan, X.K. Xu, Y.H. Shen, W.D. Zhang, Lanostane-type triterpenoids from *Abies faxoniana* and their DNA topoisomerase inhibitory activities, *Phytochemistry* 116 (2015) 221–229.
- [112] M.S. Christodoulou, F. Calogero, M. Baumann, A.N. García-Argáez, S. Pieraccini, M. Sironi, F. Dapiaggi, R. Bucci, G. Brogini, S. Gazzola, S. Liekens, A. Silvani, M. Lahtela-Kakkonen, N. Martinet, A. Nonell-Canals, E. Santamaría-Navarro, I.R. Baxendale, L.D. Via, D. Passarella, Boehmeriasin A as new lead compound for the inhibition of topoisomerases and SIRT2, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 766–775.
- [113] U. Luesakul, T. Palaga, K. Krusong, N. Ngamrojanavanich, T. Vilaivan, S. Puthong, N. Muangsin, Synthesis, cytotoxicity, DNA binding and topoisomerase II inhibition of cassiarin A derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 2845–2850.
- [114] E. Potter, M. Jha, K.S. Bhullar, H.P.V. Rupasinghe, J. Balzarini, A. Jha, Investigation of fatty acid conjugates of 3,5-bisarylmethylene-4-piperidone derivatives as antitumor agents and human topoisomerase-II $\alpha$  inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 411–421.
- [115] L.P. Liu, K. Han, W. Chen, Y.Y. Zhang, L.J. Tong, T. Peng, H. Xie, J. Ding, H.B. Wang, Topoisomerase II inhibitors from the roots of *Stellera chamaejasme* L., *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 4198–4203.
- [116] C. Holohan, S.V. Schaeysbroeck, D.B. Longley, P.G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 714–726.
- [117] C.C. Wu, Y.C. Li, Y.R. Wang, T.K. Li, N.L. Chan, On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 10630–10640.
- [118] L.H. Abdel-Rahman, A. Abu-Dief, R.M. El-Khatib, S.M. Abdel-Fatah, Sonochemical synthesis, DNA binding, antimicrobial evaluation and *in vitro* anticancer activity of three new nano-sized Cu(II), Co(II) and Ni(II) chelates based on tri-dentate NOO imine ligands as precursors for metal oxides, *J. Photochem. Photobiol. B* 162 (2016) 298–308.
- [119] C. Acilan, B. Cevatemre, Z. Adiguzel, D. Karakas, E. Ulukaya, N. Ribeiro, I. Correia, J.C. Pessoa, Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents, *Biochim. Biophys. Acta* 1861 (2017) 218–234.
- [120] Md.A. Hasan, N. Kumari, K. Singh, K. Singh, L. Mishra, Mixed ligand complexes of Cu(II)/Zn(II) ions containing (m-)/(p-) carboxylato phenyl azo pentane 2,4-dione and 2,2' bipyridine/1,10 phenanthroline: synthesis, characterization, DNA binding, nuclease and topoisomerase I inhibitory activity, *Spectrochim. Acta Part A* 152 (2016) 208–217.
- [121] M.S. Camargo, M.M. Silva, R.S. Correa, S.D. Vieira, S. Castelli, I. D'Anessa, R. Grandis, E. Varanda, V.M. Defflon, A. Desideri, A.A. Batista, Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity, *Metallomics* 8 (2016) 179–192.
- [122] A. Zianna, M.S. Ristovic, G. Psomas, A. Hatzidimitriou, E. Coutouli-Argyropoulou, M. Lalia-Kantouri, Cadmium(II) complexes of 5-bromo-salicylaldehyde and a-diimines: synthesis, structure and interaction with calf-thymus DNA and albumins, *Polyhedron* 107 (2016) 136–147.
- [123] W. Zhang, D. Yao, Y. Wei, J. Tang, H.D. Bian, F.P. Huang, H. Liang, Synthesis, characterization, DNA/protein interaction and cytotoxicity studies of Cu(II) and Co(II) complexes derived from dipyrilidyl triazole ligands, *Spectrochim. Acta Part A* 163 (2016) 28–44.
- [124] Z. Shokohi-Pour, H. Chiniforoshan, A.A. Momtazi-borojeni, B. Notash, A novel Schiff base derived from the gabapentin drug and copper (II) complex: synthesis, characterization, interaction with DNA/protein and cytotoxic activity, *J. Photochem. Photobiol. B* 162 (2016) 34–44.
- [125] L. Cui, C. Bi, F. Yuhua, X. Li, X. Meng, N. Zhang, Z. Zhang, Synthesis, crystal structures, DNA interaction and anticancer activity of organobismuth(V) complexes, *Inorg. Chim. Acta* 437 (2015) 41–46.
- [126] R. Gup, C. Gokce, N. Dilek, Synthesis, structural characterization and DNA interaction of zinc complex from 2,6-diacetylpyridine dihydrazone and 4-[(2E)-2-(hydroxyimino)acetyl]phenoxy} acetic acid, *J. Photochem. Photobiol. B* 144 (2015) 42–50.
- [127] P. Sinha, N. Kumari, K. Singh, K. Singh, L. Mishra, Homoleptic bisterpyridyl complexes: synthesis, characterization, DNA binding, DNA cleavage and topoisomerase II inhibition activity, *Inorg. Chim. Acta* 432 (2015) 71–80.
- [128] F. Arjmand, I. Yousuf, T.B. Hadda, L. Toupet, Synthesis, crystal structure and antiproliferative activity of Cu(II) nalidixic acid/DACH conjugate: comparative *in vitro* DNA/RNA binding profile, cleavage activity and molecular docking studies, *Eur. J. Med. Chem.* 81 (2014) 76–88.
- [129] K. Du, J. Wang, J. Kou, G. Li, L. Wang, H. Chao, L. Ji, Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 1056–1065.
- [130] X. He, L. Zeng, G. Yang, L. Xie, X. Sun, L. Tan, DNA binding, photocleavage and topoisomerase inhibitory activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes containing the same ancillary ligand and different main ligands, *Inorg. Chim. Acta* 408 (2013) 9–17.
- [131] X. He, L. Jin, L. Tan, DNA-binding, topoisomerases I and II inhibition and *in vitro* cytotoxicity of ruthenium(II) polypyridyl complexes:  $[\text{Ru}(\text{dppz})_2\text{L}]^{2+}$  (L = dppz-11 CO<sub>2</sub>Me and dppz), *Spectrochim. Acta Part A* 135 (2015) 101–109.
- [132] V. Markovic, A. Janicijevic, T. Stanokovic, B. Kolundzija, D. Sladic, M. Vujcic, B. Janovic, L. Joksovic, P.T. Djurdjevic, N. Todorovic, S. Trifunovic, M.D. Joksovic, Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 228–238.
- [133] G. Dong, Y. Fang, Y. Liu, N. Liu, S. Wu, W. Zhang, C. Sheng, Design, synthesis and evaluation of 4-substituted anthra[2,1-c][1,2,5] thiadiazole-6,11-dione derivatives as novel non-camptothecin topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 1929–1933.
- [134] A.Q. Ali, S.G. Teoh, A. Salhin, N.E. Eltayeb, M.B.K. Ahamed, A.M.S.A. Majid, Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: *in vitro* anti-cancer, DNA binding and cleavage activities, *Spectrochim. Acta Part A* 125 (2014) 440–448.
- [135] M. Singh, V. Tandon, Synthesis and biological activity of novel inhibitors of topoisomerase I: 2-aryl-substituted 2-bis-1H-benzimidazoles, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 659–669.
- [136] G. Zoidis, A. Sosic, S. Da Ros, B. Gatto, C. Sissi, F. Palluotto, A. Carotti, M. Catto, Indenocinnoline derivatives as G-quadruplex binders, topoisomerase IIa inhibitors and antiproliferative agents, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 2625–2634.
- [137] J.P. Zhang, J. Huang, C. Liu, X.F. Lu, B.X. Wu, L. Zhao, N. Lu, Q.L. Guo, Z.Y. Li, C. Jiang, Discovery of a series of pyridopyrimidine derivatives as potential topoisomerase I inhibitors, *Chin. Chem. Lett.* 25 (2014) 1025–1028.
- [138] X. Li, Q. Wang, Y. Qing, Y. Lin, Y. Zhang, X. Qian, J. Cui, Novel DNA intercalators without basic side chains as efficient antitumor agents: design, synthesis and evaluation of benzo-[c,d]-indol-malononitrile derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3279–3284.
- [139] G. Bist, S. Park, C. Song, T. Bahadur, T. Magar, A. Shrestha, Y. Kwon, E. Lee, Dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-chlorophenylpyridines: topoisomerase I and IIa dual inhibitors with DNA non-intercalative catalytic activity, *Eur. J. Med. Chem.* 133 (2017) 69–84.
- [140] F.W.A. Barros, T.G. Silva, M.G.R. Pitta, D.P. Bezerra, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, C. Pessoa, M.A.F.B. Moura, F.C. Abreu, M.C.A. Lima, Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 3533–3539.
- [141] M.G.R. Pitta, E.S. Souza, F.W.A. Barros, M.O. Moraes, C.O. Pessoa, M.Z. Hernandez, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, Synthesis and *in vitro* anticancer activity of novel thiazacridine derivatives, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 3326–3334.
- [142] P. Kumar, R. Kumar, D.N. Prasad, Synthesis and anticancer study of 9- aminoacridine derivatives, *Arabian J. Chem.* 6 (2013) 79–85.
- [143] W. Zhang, B. Zhang, W. Zhang, T. Yang, N. Wang, C. Gao, C. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Synthesis and antiproliferative activity of 9-benzylamino-6-chloro-2-methoxy-acridine derivatives as potent DNA-binding ligands and topoisomerase II inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 116 (2016) 59–70.
- [144] F.W.A. Barros, D.P. Bezerra, P.M.P. Ferreira, B.C. Cavalcanti, T.G. Silva, M.G.R. Pitta, Md.C.A. de Lima, S.L. Galdino, Id.R. Pitta, L.V. Costa-Lotufo,

- M.O. Moraes, R.R. Burbano, T.N. Guecheva, J.A.P. Henriques, C. Pessoa, Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268 (2013) 37–46.
- [145] C. Gao, B. Li, B. Zhang, Q. Sun, L. Li, X. Li, C. Chen, C. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1800–1807.
- [146] X. Lang, Q. Sun, Y. Chen, L. Li, C. Tan, H. Liu, C. Gao, Y. Jiang, Novel synthetic 9-benzyloxyacridine analogue as both tyrosine kinase and topoisomerase I inhibitor, *Chin. Chem. Lett.* 24 (2013) 677–680.
- [147] D. Sabolová, M. Vilková, J. Imrich, I. Potocnák, New spiroacridine derivatives with DNA-binding and topoisomerase I inhibition activity, *Tetrahedron Lett.* 57 (2016) 5592–5595.
- [148] O.M. Salem, M. Vilková, J. Janocková, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, E. Zilecká, J. Kaspárková, V. Brabec, J. Imrich, M. Kozurková, New spiro tria(thia)zolidine–acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 690–700.
- [149] J. Janocková, J. Plšíková, J. Kašpárková, V. Brabec, R. Jendzelovsky, J. Mikeš, J. Koval, S. Hamuláková, P. Fedorocko, K. Kuca, M. Kozurková, Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds, *Eur. J. Pharm. Sci.* 76 (2015) 192–202.