



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E SOROALBUMINA E AVALIAÇÃO
ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-
TIAZOLIDINONAS**

Recife

2023

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E SOROALBUMINA E AVALIAÇÃO
ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-
TIAZOLIDINONAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Ciências Biológicas 1

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Alves, Josival Emanuel Ferreira.

Estudos de interação com o DNA e soroalbumina e avaliação antineoplásica de novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas. / Josival Emanuel Ferreira Alves. – 2023.

185 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Sinara Mônica Vitalino de Almeida.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2023.

Inclui referências.

1. DNA. 2. HSA. 3. Indol - interação. 4. Quimioterápicos. 5. Tiazol - tiazolidinonas. I. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de. (orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-093

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E SOROALBUMINA E AVALIAÇÃO
ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-
TIAZOLIDINONAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Presidente e Orientadora)
Universidade de Pernambuco – *Campus* Garanhuns

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Examinador Interno)
Departamento de Bioquímica

Prof.^a Dr.^a Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque (Examinadora Interna)
Universidade de Pernambuco – *Campus* Garanhuns

Profa. Dr.^a Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha (Examinadora Externa)
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Universidade de Pernambuco – UPE

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Externo)
Departamento de Farmácia - UEPB

A Deus por me conceder a oportunidade, saúde, intelecto, paciência e disposição.

Aos meus incomensuravelmente amados pais Josival Pereira Alves e Maria do Socorro
Ferreira Alves pelo exemplo de amor, cuidado, confiança e base familiar.

Às minhas queridas irmãs Miriã Meyre Ferreira Alves e Haviá Raquel Ferreira Alves pelo
apoio e estímulo a tornar meus sonhos em realidade.

Aos meus excepcionais sobrinhos Vichthor Murilo Ferreira Alves Gomes, Eloá Alves
Salgueiro e Isaque Alves Salgueiro por me proporcionarem o aprazível sentimento de ser tio.

AGRADECIMENTOS

Primeira e principalmente ao Senhor Deus a quem servi, sirvo e sempre servirei pelo ensejo, saúde, intrepidez, vigor e êxitos outorgados por Sua infinita complacência e amor sublime demonstrados cotidianamente por mim. A Ele toda a glória, todo louvor, toda honra pelos séculos dos séculos. Amém!!

A minha estimada e proficiente orientadora Prof^a. Dr^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida, pela confiança, oportunidade, paciência, compreensão, auxílio e pelos valiosos ensinamentos compartilhados a cada encontro.

Aos meus primorosos e amados pais Josival Pereira Alves e Maria do Socorro Ferreira Alves, pelos pilares e virtudes familiares ensinados e solidificados na minha formação pessoal, pela compreensão desse período de distanciamento, pela confiança, incentivo, preocupação e empenho árduo pela primazia da minha educação e, sobretudo, pelo amor incondicional que perpetuamente foi, é e será meu combustível primordial, fortalecendo-me e me fornecendo a pujança necessária à busca de conquistar meus objetivos, no intuito de continuamente os deixar orgulhosos.

As minhas irmãs Miriã Meyre Ferreira Alves e Haviá Raquel Ferreira Alves pelo incentivo, confiança, companheirismo e por sempre anelarem pelo meu triunfo em todos os âmbitos da minha vida.

Aos meus queridos demais familiares que tanto torcem por mim e pelo meu sucesso, aqui representados pela minha amada prima Maria do Socorro Alves de Lima (Coca) a quem tenho tanto afeto por também acreditar na minha capacidade e torcer pelo meu sucesso, em todo o momento.

À Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima (Nena), chefe do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), situado no Departamento de Antibióticos da UFPE, pelo apoio dado no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, por tantos ensinamentos, conselhos e orientações tanto no contexto acadêmico, quanto no tocante à vida secular, agindo como uma “mãe científica” de forma tão singular nos momentos de maior necessidade.

Aos meus companheiros de laboratório Cleberson e Paula, que solícitamente me ajudaram sempre que necessário nos protocolos relativos aos experimentos químicos e pelo coleguismo amistoso demonstrado desde o período do mestrado.

As minhas amáveis e queridas amigas e irmãs científicas “Tops da interação” Amélia, Denise, Iris, Keriolaine (Kel) e Aurenice, por sempre estarem ao meu lado facilitando e colaborando piamente com meu aprendizado técnico-teórico; pelos ricos, inesquecíveis,

apreciáveis e cômicos momentos de descontração e entretenimento que tanto me revigoraram, em especial, nos instantes de adversidade, cujo companheirismo e cumplicidade extrapolaram as paredes dos laboratórios, tornando-se um vínculo fraternal que vou levar para toda a vida. Indubitavelmente, vocês foram fundamentais à realização e conclusão deste trabalho.

Aos exímios professores da Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns, por serem exemplos e inspiração de competência, destreza, profissionalismo e idoneidade; por terem me incentivado nessa jornada acadêmica, por terem contribuído com minha maturidade acadêmica, pelo apoio e auxílio quando precisei e por acreditarem e torcerem pelo meu sucesso profissional, especialmente os professores Vladimir, Rosângela, Elisângela, Marina e Luiza.

As minhas amigas Crislaine e Neta com quem tive a honra de conviver durante a Pós-Graduação *Lato Sensu*, na UPE/Garanhuns; por também fazerem parte do time de pessoas que tanto me aconselharam e me impeliram a superar meus medos e encarar esse novo desafio. Vocês deram o pontapé inicial a tudo isso e serei sempre grato pelo companheirismo, amizade, momentos de estudo e descontração que tivemos nesse período tão proveitoso.

Às minhas exemplares amigas e “chefinhas” Fabiana Maranhão, Anália Josefa e Graciara das Neves que tanto me impulsinaram a trilhar por este caminho, depositando com veemência sua confiança na minha capacidade.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro, tornando esta pesquisa exequível.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com o êxito desta investigação científica e, conseqüentemente, com o meu sucesso acadêmico-profissional.

“O princípio da sabedoria é: Adquire a sabedoria; sim,
com tudo o que possuis, adquire o entendimento.
Estima-a, e ela te exaltará; se a abraçares, ela te honrará;
Dará a tua cabeça um diadema de graça
e uma coroa de glória te entregará.”
(BÍBLIA, 2011, 3-1242)

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo e a quimioterapia continua sendo uma das abordagens terapêuticas mais utilizadas atualmente, sendo o DNA um dos alvos bem estabelecidos para a busca de moléculas com potencial atividade anticâncer. Além disso, a inibição de enzimas participantes de funções biológicas das células, como as topoisomerase (Topos), também é foco para o desenvolvimento de novas moléculas antineoplásicas. Para que fármacos ou candidatos à fármacos atinjam estes alvos, é imprescindível conhecer a capacidade de ligação destas substâncias a proteínas plasmáticas, como a albumina sérica humana (HSA), cujo grau de afinidade pode determinar a distribuição na corrente sanguínea e a eficácia destes compostos. À vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* a interação de novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas com a HSA e corroborar seu modo de ligação ao ctDNA, com o auxílio de sondas intercalativas (LA e BE) e ligantes ao sulco (DAPI). Além disso, a capacidade inibitória da enzima Topoisomerase II α foi analisada e os melhores compostos nesse teste e na interação com o DNA e com a HSA tiveram suas atividades hemolítica e antiproliferativa investigadas. Foi constatado que os derivados apresentaram valores da constante de afinidade (Kb) semelhantes e/ou maiores aos valores apresentados pelo DAPI. Os valores encontrados da constante de supressão fluorescente (Ksv) situaram-se entre $0,24 \times 10^4$ e $6,29 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ no teste com LA e entre $0,60 \times 10^4$ e $7,59 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ no ensaio com DAPI. Testes absorptivos com oligonucleotídeos comprovaram que o derivado JF-252 se liga especificamente em regiões ricas nas sequências A-T do sulco menor do ctDNA. A técnica de ancoramento molecular corroborou a preferência dos derivados com essa região do DNA. Na análise de interação com a HSA, os valores de Kb situaram-se entre $2,36\text{-}3,65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, e os valores de Ksv, entre $0,94\text{-}4,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, interação consolidada também pelos estudos *in silico*. Ensaio de inibição enzimática indicaram que todos os derivados inibiram a atividade da Topo II α em $50 \mu\text{M}$, com destaque para os JF-252 e JF-253. O ancoramento molecular confirmou a interação da enzima com os derivados indólicos, principalmente os portadores do núcleo tiazol. O ensaio hemolítico mostrou uma insignificante propriedade hemolítica, em comparação com a amsacrina (*m*-AMSA). Na atividade antiproliferativa com células de adenocarcinoma mamário (MCF-7), o composto JF-252 foi capaz de inibir 100% do crescimento celular na concentração de $8,97 \mu\text{g/ml}$. Os resultados encontrados indicam uma possível contribuição dos substituintes propostos na interação com o DNA e HSA, bem como na inibição da Topo II α e nas atividades hemolítica e antiproliferativa.

Palavras-chaves: DNA; HSA; Indol; Interação; Quimioterápicos; Tiazol; Tiazolidinonas.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of mortality in the world and chemotherapy remains one of the most used therapeutic approaches today, with DNA being one of the well-established targets for the search for molecules with potential anticancer activity. Furthermore, the inhibition of enzymes that participate in the biological functions of cells, such as topoisomerase (Topos), is also a focus for the development of new antineoplastic molecules. For drugs or drug candidates to reach these targets, it is essential to know the binding capacity of these substances to plasma proteins, such as human serum albumin (HSA), whose degree of affinity can determine the distribution in the bloodstream and the effectiveness of these compounds. In view of this, this work aimed to evaluate *in vitro* and *in silico* the interaction of new indole-thiazole derivatives and indole-thiazolidinones with HSA and to corroborate its mode of binding to ctDNA, with the aid of intercalated probes (LA and BE) and groove binders (DAPI). In addition, the inhibitory capacity of the Topoisomerase II α enzyme was analyzed and the best compounds in this test and in the interaction with DNA and HSA had their hemolytic and antiproliferative activities investigated. It was found that the derivatives presented values of the affinity constant (K_b) similar and/or greater than the values presented by the DAPI. The values found for the fluorescent suppression constant (K_{sv}) were between 0.24×10^4 and $6.29 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ in the LA test and between 0.60×10^4 and $7.59 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ in the DAPI assay. Absorptive assays with oligonucleotides demonstrated that the JF-252 derivative specifically binds to rich regions in the A-T sequences of the ctDNA minor groove. The molecular docking technique corroborated the preference for derivatives with this DNA region. In the interaction analysis with HSA, K_b values were between 2.36 - $3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, and K_{sv} values were between 0.94 - $4.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, interaction also consolidated by *in silico* studies. Enzymatic inhibition assays indicated that all derivatives inhibited Topo II α activity by $50 \mu\text{M}$, with emphasis on JF-252 and JF-253. Molecular anchoring confirmed the interaction of the enzyme with the indole derivatives, mainly those with the thiazole nucleus. The hemolytic assay showed insignificant hemolytic property compared to amsacrine (*m*-AMSA). In antiproliferative activity with breast adenocarcinoma cells (MCF-7), the compound JF-252 was able to inhibit 100% of cell growth at a concentration of $8.97 \mu\text{g/ml}$. The results found indicate a possible contribution of the proposed substituents in the interaction with DNA and HSA, as well as in the inhibition of Topo II α and in the hemolytic and antiproliferative activities.

Keywords: DNA; HSA; Indole; Interaction; Chemotherapy; Thiazole; Thiazolidinones.

LISTA DE FIGURAS

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 – Processo de carcinogênese.....	23
Figura 2 – Processo de tumoração.....	24
Figura 3 – <i>Hallmarks</i> do câncer.....	25
Figura 4 – Novas características do câncer.....	26
Figura 5 – Principais fatores de risco do câncer.....	27
Figura 6 – Estimativa mundial da incidência e mortes por câncer.....	28
Figura 7 – Incidência de casos de câncer no Brasil.....	29
Figura 8 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023, exceto pele não melanoma, no Nordeste.....	30
Figura 9 – Estimativas para o ano de 2023 de taxas brutas e ajustadas da incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer por sexo, para Pernambuco.....	30
Figura 10 – Estruturas químicas de protótipos heterociclos estudados para variadas atividades farmacológicas.....	32
Figura 11 – Estruturas químicas de protótipos heterociclos estudados para a atividade antineoplásica.....	33
Figura 12 – Estruturas químicas do núcleo tiazol, do triptofano, da serotonina e da melatonina.....	34
Figura 13 – Atividades polifarmacológicas do núcleo indol, com seus respectivos fármacos.....	34
Figura 14 – Estruturas químicas dos alcaloides indólicos vincristina, vimblastina e vinorelbina.....	35
Figura 15 – Estruturas químicas de agentes antitumorais portadores do núcleo indol.....	36
Figura 16 – Estrutura química de protótipos portadores do núcleo indol.....	36
Figura 17 – Estruturas químicas do anel tiazol e da tiamina (Vitamina B ₁).....	37
Figura 18 – Estruturas químicas de agentes anticâncer portadores do núcleo tiazol.....	38

Figura 19 – Estruturas químicas de protótipos antitumorais portadores do núcleo indol e tiazol.....	38
Figura 20 – Exemplos de estruturas químicas do núcleo 4-Tiazolidinona.....	39
Figura 21 – Exemplos de protótipos antitumorais portadores dos núcleos indol, tiazol e tiazolidinonas.....	40
Figura 22 – Estruturas químicas de fármacos anticâncer cujo alvo é o DNA.....	41
Figura 23 – Representação dos modos covatente e não-covalente de interação entre ligantes e o DNA.....	42
Figura 24 – Estruturas químicas de agentes intercalantes do DNA.....	43
Figura 25 – Estruturas químicas de compostos que interagem com o DNA via ligação nos sulcos ou por ligações eletrostáticas.....	44
Figura 26 – Estruturas químicas de sondas fluorescentes usadas para decifrar o modo de interação de um ligante com o DNA.....	45
Figura 27 – Efeitos espectroscópicos: hipocromismo, hiperromismo, hipsocromismo e batocromismo.....	46
Figura 28 – Estrutura tridimensional das topoisomerases I e II α	48
Figura 29 – Mecanismos catalíticos de clivagem das topoisomerases I e II α	48
Figura 30 – Estrutura química de fármacos classificados como “venenos” Topo II α	49
Figura 31 – Estrutura química de fármacos classificados como “inibidores catalíticos” Topo II α	50
Figura 32 – Estrutura tridimensional da HSA.....	52
Figura 33 – Estruturas química de fármacos antitumorais usados em estudos de interação com a HSA.....	53

4 NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COMO LIGANTES AOS SULCOS DO DNA

Figura 1 – Espectro de absorção da interação de oligonucleotídeos com DAPI e com o JF-252.....	76
Figura 2 – Gráfico de dispersão da intensidade de fluorescência relativa dos derivados JFs ligados ao complexo LA-ctDNA.....	78

Figura 3 – Espectros de emissão dos complexos LA-ctDNA e DAPI-ctDNA livres e ligados a diversas concentrações do JF-252.....	79
Figura 4 – Gráfico de dispersão da intensidade de fluorescência relativa dos derivados JFs ligados ao complexo DAPI-ctDNA.....	80
Figura 5 – Posições de docking molecular relativas à intercalação e ligação aos sulcos do DNA dos compostos JFs.....	82

5 OBTENÇÃO DE ALBUMINA HUMANA E SEU USO PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO *IN VITRO* COM DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Figura 1 – Espectros de absorção UV-vis da HSA na presença de quantidades crescentes dos JFs 255 e 250.....	98
Figura 2 – Espectros de emissão fluorescente da HSA na ausência e na presença de quantidades crescentes dos JFs 255 e 250.....	104
Figura 3 – Gráfico de dispersão da intensidade de emissão fluorescente relativa dos derivados JFs ao se conjugarem à HSA.....	107
Figura 4 – Espectro de emissão fluorescente da HSA na presença do JF-255, a diferentes temperaturas.....	109
Figura 5 – Espectros da fluorescência síncrona da HSA na presença do JF-255.....	111
Figura 6 – Espectro de emissão fluorescente da HSA na presença do JF-255 e de diferentes sondas sítio-marcadores.....	115
Figura 7 – Ancoramento molecular dos JFs 250 e 255 e do fármaco indometacina com a HSA.....	118
Figura 8 – Sítios de ligação da HSA e as forças de ligação do JF-255 e da indometacina.....	120
Figura 9 – Interações moleculares da HSA com o JF-255 e com a indometacina.....	120

6 ESTUDOS CITOTÓXICOS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α DE DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Figura 1 – Efeitos da <i>m</i> -AMSA, dos derivados JFs e do análogo LT-51 no ensaio de inibição da Topo II α	133
Figura 2 – Confórmeros finais do etoposídeo e da Amsacrina com o sistema DNA-Topo II α	139
Figura 3 – Confórmeros finais do etoposídeo, LT-51 e dos JFs 249 e 252 com o sistema DNA-Topo II α	140
Figura 4 – Confórmeros finais do modelo cristalográfico dos JFs 249 e 252 com o sistema DNA-Topo II α	141
Figura 5 – Confórmeros finais dos JFs 249 e 250 com o sistema DNA-Topo II α	143
Figura 6 – Confórmeros finais dos JFs 251, 252, 255 e 256 com o sistema DNA-Topo II α	144
Figura 7 – Gráficos da atividade hemolítica dos JFs 252, 253, 255, 256 e da amsacrina.....	146
Figura 8 – Gráfico da porcentagem da atividade hemolítica dos JFs e da amsacrina.....	147
Figura 9 – Atividade antiproliferativa dos derivados JFs 252, 253 e 255 contra a linhagem tumoral de mama MCF-7.....	150

LISTA DE ESQUEMAS

4 NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COMO LIGANTES AOS SULCOS DO DNA

Esquema 1 – Rota se síntese dos derivados JFs, segundo Alves, 2019..... 68

LISTA DE TABELAS

4 NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COMO LIGANTES AOS SULCOS DO DNA

Tabela 1 – Características físico-químicas e rendimentos dos derivados JFs.....	68
Tabela 2 – Informações espectroscópicas de absorção UV-vis das sondas fluorescentes livres e conjugadas ao ctDNA.....	74
Tabela 3 – Informações espectroscópicas de emissão fluorescente dos compostos JFs livres e na presença do complexo LA-ctDNA e DAPI-ctDNA.....	77
Tabela 4 – Valores das energias de ligação calculadas para os derivados JFs conforme o modo de interação com o DNA.....	81

5 OBTENÇÃO DE ALBUMINA HUMANA E SEU USO PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO *IN VITRO* COM DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Tabela 1 – Informações espectroscópicas de absorção UV-vis da HSA livre e conjugada aos derivados JFs.....	96
Tabela 2 – Informações espectroscópicas de emissão fluorescente da HSA livre e conjugada aos compostos JFs, a diferentes temperaturas.....	102
Tabela 3 – Informações espectroscópicas da fluorescência síncrona da HSA livre e conjugada aos derivados JFs.....	110
Tabela 4 – Informações espectroscópicas de emissão fluorescente da HSA livre e conjugada aos compostos JFs e das sondas sítio-marcadores.....	113
Tabela 5 – Pontuação de encaixe calculados entre os receptores da HSA com os derivados JFs.....	117
Tabela 6 – Afinidades de ligação da HSA com os derivados JFs 255 e com a indometacina.....	119

6 ESTUDOS CITOTÓXICOS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α DE DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Tabela 1 – Percentual de atividade inibitória Topo II α da <i>m</i> -AMSA, dos derivados JFs e do LT-51.....	136
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2 – Pontuação do ancoramento molecular entre os derivados JFs e o sistema DNA-Topo II α	142
Tabela 3 – Valores de TGI para os compostos JFs 252, 253, 255 e da <i>m</i> -AMSA testados na linhagem tumoral de mama MCF-7.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIPC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

AS – Albumina sérica

BE – Brometo de etídio

ctDNA – DNA de timo bovino

DACA – N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HSA – Soroalbumina humana

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LA – Laranja de acridina

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami

m-AMSA – Amsacrina

OMS – Organização Mundial da Saúde

Tris – Tetrametilhidroxiaminometano

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

Phe – Fenilalanina

UV-vis – Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 CÂNCER: ASPECTOS CONCEITUAIS E EPIDEMIOLÓGICOS	23
3.2 O USO DE HETEROCICLOS NA DESCOBERTA DE NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS.....	31
3.2.1 O núcleo indol.....	34
3.2.2 O núcleo tiazol.....	36
3.2.3 O núcleo tiazolidinona.....	39
3.3 O DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER.....	40
3.4 TOPOISOMERASE II α COMO ALVO PARA A TERAPIA ANTICÂNCER.....	47
3.5 INTERAÇÕES COM A HSA NOS ESTUDOS DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS.....	50
REFERÊNCIAS.....	54
4 NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COMO LIGANTES AOS SULCOS DO DNA.....	64
5 OBTENÇÃO DE ALBUMINA HUMANA E SEU USO PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO IN VITRO COM DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS.....	89
6 ESTUDOS CITOTÓXICOS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE IIα DE DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS.....	127
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157
8 PERSPECTIVAS.....	159
APÊNDICE A – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM OS COMPLEXOS LA-CTDNA E DAPI-CTDNA ATRAVÉS DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE EMISSÃO FLUORESCENTE.....	160
APÊNDICE B – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM A HSA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ABSORÇÃO UV-VIS	163

APÊNDICE C – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM A HSA ATRAVÉS DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA.....	164
APÊNDICE D – ILUSTRAÇÕES DETALHADAS DAS FORÇAS DE LIGAÇÃO ENTRE OS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM OS RESÍDUOS DE AMONÁCIDOS CIRCUNDANTES DA HSA ATRAVÉS DA TÉCNICA <i>IN SILICO</i> DE ANCORAMENTO MOLECULAR.....	174
ANEXOS – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A TESE.....	177

1 INTRODUÇÃO

No século 21, o câncer é uma das principais causas de morte para homens e mulheres com projeções ainda de aumento para todos os países do mundo, além de limitar avanços na expectativa de vida da sociedade. Atualmente, cerca de 18 milhões de casos de vários tipos de câncer são diagnosticados a cada ano. Segundo previsões da OMS, esse número deve chegar a 29,4 milhões em 2040 (OMS, 2023a). Milhões de pessoas sofrem ou morrem de câncer a cada ano, e não há nenhum medicamento plenamente satisfatório disponível no momento, pois efeitos indesejáveis, como toxicidade, resistência aos medicamentos e baixa biodisponibilidade são alguns dos principais problemas encontrados nos agentes quimioterápicos atualmente disponíveis (LUETHI; LIECHTI, 2020).

Conseqüentemente, dois importantes objetivos de pesquisas em curso são o desenvolvimento de quimioterápicos novos e mais específicos e a identificação de novos alvos biológicos que possam ser usados nos estudos terapêuticos antitumorais (LIANG et al., 2019). Entre a variedade de alvos moleculares para terapia de câncer, DNA e proteínas são os alvos principais na ação de fármacos e candidatos a fármacos. Logo, uma grande quantidade de medicamentos adquire sua eficácia terapêutica por meio da ligação ao DNA e/ou a proteínas (ALTURIQI et al., 2020). Estudos têm sinalizado que o DNA é um dos principais alvos dos fármacos e protótipos antitumorais, em função da alta taxa de proliferação destas células e pela sua capacidade de interação com esta biomolécula. A especificidade da ação deve-se também a outros mecanismos que estes ligantes possuam, culminando em danos e consequente morte celular (LIOLI et al., 2020; ALVES et al., 2021a).

Outro alvo reportado nas investigações terapêuticas antitumorais são as enzimas topoisomerases, em virtude de suas funções essenciais no controle topológico do DNA durante processos celulares vitais, como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SINGH et al., 2023). Em especial, a Topoisomerase II α tem sido priorizada nos estudos de inibição enzimática por ser superexpressa tanto em processos fisiológicos de proliferação celular quanto em células transformadas (SHINDE et al., 2022). Em razão disto, agentes que afetam as funções das topoisomerases são considerados atraentes para a terapia do câncer, pois podem causar danos que desencadeiam uma série de eventos celulares, induzindo apoptose e, conseqüentemente, a morte celular (ALMEIDA et al., 2017).

Ainda nessa perspectiva, a literatura tem relatado que a ligação de proteínas plasmáticas a fármacos pode ser útil para fins terapêuticos, uma vez que qualquer alteração no processo de interação proteína-ligante pode alterar as propriedades farmacocinéticas e

farmacodinâmicas de um medicamento (RIBEIRO et al., 2021). Nesse contexto, a albumina de soro humano (HSA) é a proteína plasmática mais abundante no sistema circulatório e, devido à sua capacidade de transportar diferentes compostos endógenos e exógenos na corrente sanguínea (ZHENG et al., 2020), tem sido considerada um alvo importante na avaliação da biodistribuição de fármacos e protótipos pertencentes a diversas atividades farmacológicas, como a antitumoral, tendo em vista sua capacidade de se acumular no microambiente tumoral (ALVES et al., 2021b). Em virtude disto, vários estudos de interação com fármacos clinicamente utilizados no combate ao câncer (MOGHADAM et al., 2019; ALSAIF et al., 2020) e com novos protótipos antitumorais (ASEMAN et al., 2019; BANERJEE et al., 2020) têm sido realizados.

Os heterocíclicos são compostos versáteis com amplas atividades biológicas. Inúmeros derivados portadores dos anéis indol, tiazol e tiazolidinona com atividade anticancerígena têm sido sintetizados, inclusive com o halogênio bromo como substituinte (ALVES et al., 2021a) a fim de intensificar o seu potencial de modular distintos alvos moleculares terapêuticos como o DNA, alterando sua estrutura, função e estabilidade (JIA et al., 2020; SHARMA et al., 2020). Como resultado, processos celulares importantes são prejudicados devido à inibição de enzimas envolvidas no metabolismo do DNA, como as topoisomerasas, por exemplo (ALMEIDA et al., 2017). Além disso, outros estudos têm sido realizados no propósito de investigar a interação de novos agentes antitumorais portadores desses núcleos com a HSA, a fim de averiguar sua afinidade com essa biomolécula na tentativa de descobrir quimioterápicos com propriedades farmacocinéticas plausíveis (RIBEIRO et al., 2021; ALVES et al., 2021b).

Diante dessas evidências, vários derivados portadores dos grupos indol, tiazol e tiazolidinona têm sido obtidos, a exemplo de Alves (2019) que sintetizou e caracterizou oito novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas, cuja capacidade e mecanismo de interação com biomoléculas, como o DNA, foram investigados. No presente trabalho, esses oito compostos (JF249-256) foram estudados de modo mais aprofundado, no intuito de avaliar *in vitro* e *in silico* a capacidade de interagirem com a HSA, corroborar o modo de ligação com o DNA por meio do uso de sondas fluorescentes, além de analisar seu potencial antineoplásico e citotóxico, com investigação do possível mecanismo de ação frente à linhagem tumoral de mama (MCF-7) e células não-transformadas, e capacidade de inibição da enzima Topoisomerase II α .

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ❖ Avaliar o potencial biológico terapêutico de derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas, elucidando o mecanismo de ação e afinidade com diferentes biomacromoléculas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o tipo de interação entre o DNA e oito derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas (JF249-256) por meio de estudos *in vitro* e *in silico*;
- Verificar a habilidade de interação com a albumina sérica humana (HSA) por meio de técnicas espectroscópicas e testes de ancoramento molecular para corroborar os sítios de ligação entre a proteína e os derivados testados;
- Realizar estudos de competição usando marcadores de sítios específicos da HSA, a fim de identificar os prováveis sítios de interação entre os derivados JF e a HSA;
- Avaliar a toxicidade dos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas mediante a análise da atividade hemolítica;
- Avaliar o potencial dos derivados JF em inibir a atividade da enzima topoisomerase II α em comparação com derivado não ciclizado (LT-51);
- Avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* do derivado JF252 contra linhagem tumoral de mama (MCF-7).

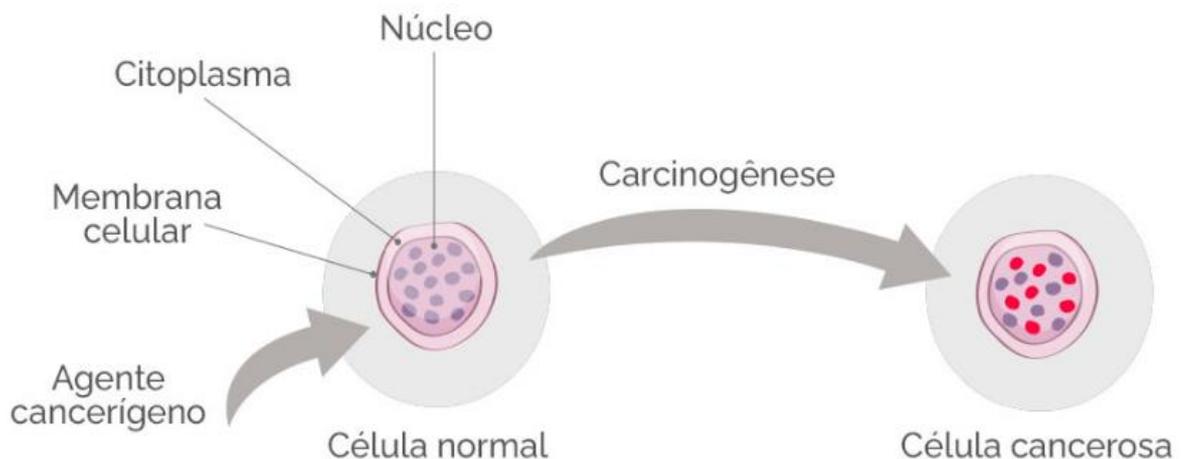
CAPÍTULO I

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CÂNCER: ASPECTOS CONCEITUAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (INCA, 2023). Os diferentes tipos de câncer surgem a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades (Figura 1). As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas, processo resultante de uma função inadequada dos genes supressores de tumor e fatores mutagênicos. Esses fatores envolvem distintas vias oncogênicas bioquímicas e regulatórias (proteínas não-enzimáticas) (BOUSSIUS et al., 2022; GYAMFI et al., 2022).

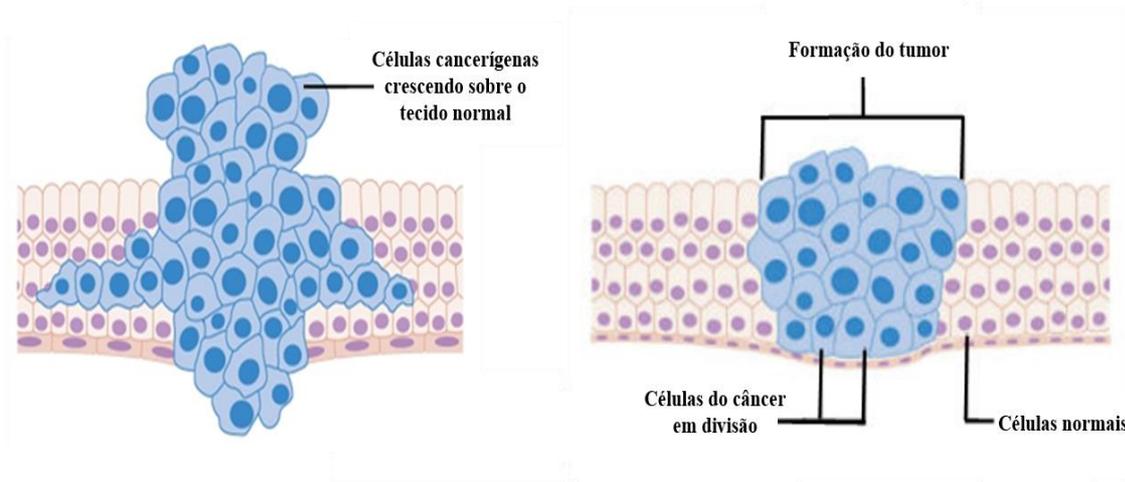
Figura 1. A carcinogênese é determinada pela exposição de células a agentes cancerígenos, em uma dada frequência e em dado período, de acordo com as características individuais do seu portador.



Fonte: INCA (2023)

Dentre as principais características do processo carcinogênico, enfatiza-se o aumento na taxa de proliferação de células tumorais, equilíbrio interrompido, sinalização aberrante, atividade celular anormal, diminuição dos níveis de apoptose e numerosas mutações genéticas e/ou epigenéticas, que prolongam sua vida útil, independentemente da diversidade e heterogeneidade dos tumores (ALMEIDA et al., 2017; TURE et al., 2020). O processo carcinogênico é, muitas vezes, manifestado a partir de uma massa celular local, podendo dispersar-se do local primário para outras partes incontrolavelmente (Figura 2), invadindo órgãos vitais, causando sua falência, podendo levar o indivíduo à óbito (INCA, 2023).

Figura 2. Alterações genéticas fazem com que uma ou mais células comecem a crescer e se multipliquem desordenada e exacerbadamente. O crescimento de massa de células chama-se tumor que cresce também em tamanho.



Fonte: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>

A anormalidade no mecanismo de controle que governa a estimulação ou supressão do crescimento celular é uma marca registrada do câncer (SHARMA et al., 2020). Células normais são constantemente sujeitas a sinais que determinam se estas devem se dividir, diferenciar-se em outra célula ou morrer, todavia, as células cancerosas desenvolvem grau de autonomia em relação a esses sinais, as quais são caracterizadas por três propriedades principais: divisão descontrolada, ampla capacidade de plasticidade e habilidade de invadir tecidos em outros locais do corpo (metástase) (LABIB et al., 2018; SAINI; GUPTA, 2018).

Hanahan e Weinberg (2000) fizeram uma abordagem sobre seis capacidades e/ou características funcionais adquiridas inerentes ao câncer, denominadas “*hallmarks* do câncer”, as quais permitem que as células transformadas sobrevivam, proliferem-se e disseminem-se. Tais funções são adquiridas em diferentes tipos de tumores por meio de mecanismos distintos recorrentes em vários momentos durante o curso da tumorigênese em múltiplas etapas, sendo

elas: a sinalização da proliferação sustentada, a evasão dos supressores de crescimento, a imortalidade replicativa, a ativação de invasão e metástase, a indução à angiogênese e a resistência à morte celular.

Posteriormente, foram adicionadas os “*hallmarks* emergenciais do câncer”, uma vez evidenciada a ação incisiva e propiciadora destes em facilitar o desenvolvimento e progressão de células tumorais em diversos (ou mesmo em todos) tipos de neoplasias, sendo eles: a evasão da ação imune e a desregulação do metabolismo energético. Foram incrementados também a instabilidade genômica e mutação e a promoção de processos inflamatórios (HANAHAN & WEIBERG, 2011), como características ativadoras dos *hallmarks* supracitados (Figura 3).

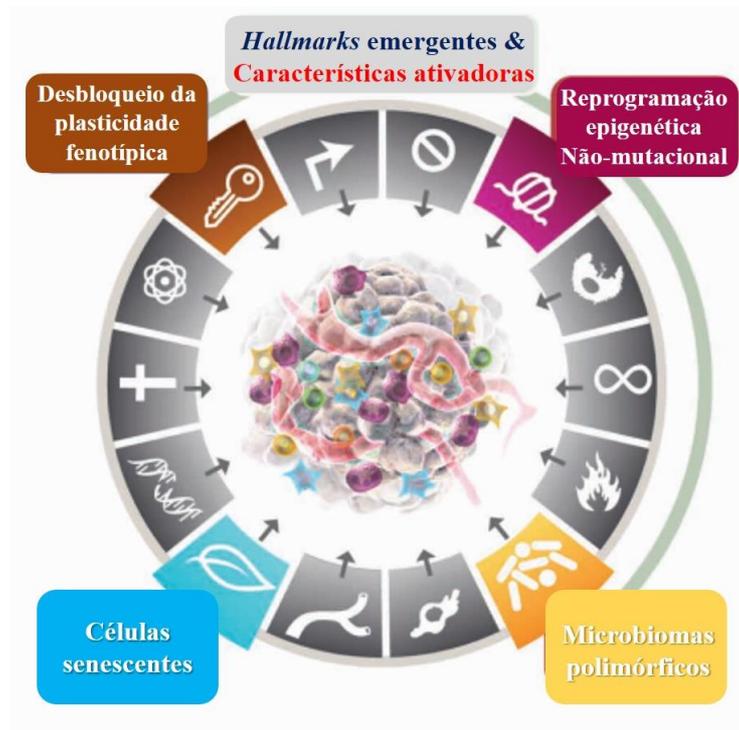
Ademais, à medida que o conhecimento dos mecanismos do câncer progride, outras facetas da doença vão surgindo, dada a complexidade do seu arcabouço genético, celular, patológico e sua resposta às terapias disponíveis. Com base nisso, recentemente, Hanahan (2022) apresentou novos *hallmarks* emergentes e características ativadoras (Figura 4), a saber: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não-mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes.

Figura 3. Características intrínsecas do câncer: *Hallmarks* descobertos a princípio (1-6), *Hallmarks* emergenciais (7 e 8) e as características ativadoras (9 e 10), descobertas posteriormente.



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Figura 4. Novas características ativadoras do câncer, publicadas recentemente.

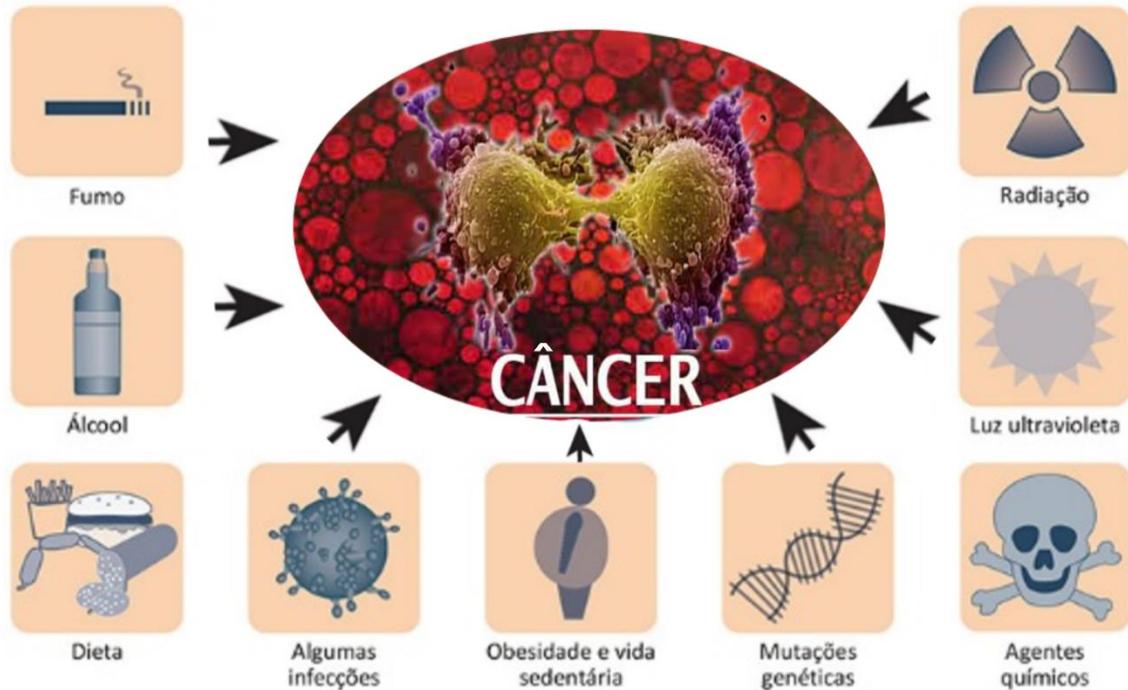


Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Linhas de estudo revelam que as células neoplásicas intrinsecamente transformam as células normais circunvizinhas em cancerosas, mediante a promoção da comunicação celular parácrina, gerando o microambiente tumoral, onde ocorre a maturação de células malignas (MOHAMMED et al., 2018; NILAND et al., 2022).

O câncer é uma doença multifatorial que pode afetar qualquer parte do corpo, podendo invadir o tecido circundante e, por conseguinte, metastizar para locais distintos. Entre os seus principais fatores de risco (carcinógenos) estão inclusos: causas genéticas, exposição a longo prazo a poluentes ambientais e à radiação, tabagismo, infecções, e uma dieta alimentar inadequada. Esses elementos refletem sobre o acúmulo de alterações moleculares nas células, o que contribui para o início do processo carcinogênico (Figura 5) (MUHAMMAD et al., 2022).

Figura 5. Principais fatores de risco que conduzem ao surgimento do câncer.

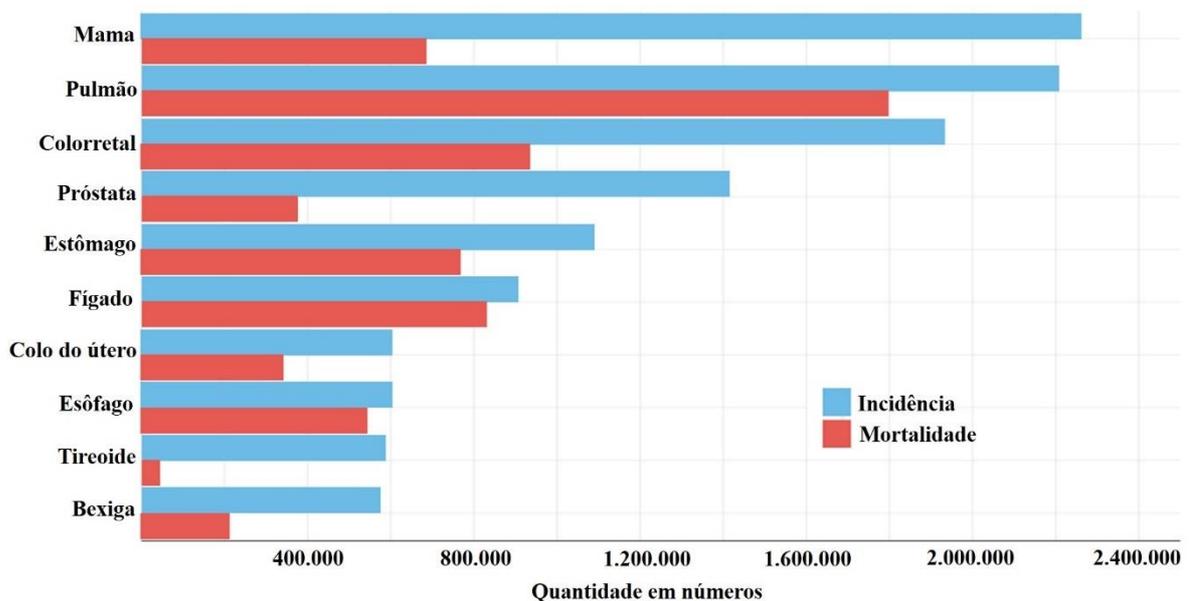


Fonte: <https://www.vencercancer.org.br/cancer/fatores-de-risco/fatores-envolvidos-no-aparecimentodo-cancer/>

As doenças oncológicas são um problema de saúde muito grave. Atualmente, cerca de 18 milhões de casos de vários tipos de câncer são diagnosticados a cada ano. Segundo previsões da OMS, esse número deve chegar a 29,4 milhões em 2040 (OMS, 2023a). De acordo com um relatório da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (AIPC), publicado em 2018, um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolverão câncer durante a vida, e um em cada oito homens e uma em onze mulheres morrerão da doença. O referido documento estima que 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes relacionadas ao câncer ocorreram em 2018. Além disso, a AIPC prevê, para ambos os sexos, de todas as idades, incluso todos os tipos de câncer, uma incidência e mortalidade para mais de 24,1 milhões e 13 milhões até 2030, respectivamente (AIPC, 2020). Nesse panorama, é importante destacar que a prevenção do câncer tornou-se um dos desafios de saúde pública mais significativos do século XXI, com um papel crítico a desempenhar na luta contra o câncer. Com base nas evidências científicas atuais, pelo menos 40% de todos os casos de câncer podem ser evitados com medidas eficazes de prevenção primária, e a mortalidade adicional pode ser reduzida por meio da detecção precoce de tumores (AIPC, 2023).

Uma estimativa dos tipos de neoplasias mundialmente mais frequentes em 2020 foram: mama (2,26 milhões de casos); pulmão (2,21 milhões de casos); cólon e reto (1,93 milhões de casos); próstata (1,41 milhões de casos); pele (não melanoma) (1,20 milhões de casos) e estômago (1,09 milhões de casos). Já as causas globalmente mais comuns de morte por câncer em 2020 foram: pulmão (1,80 milhões de mortes); cólon e reto (916.000 mortes); fígado (830.000 mortes); estômago (769.000 mortes) e mama (685.000 mortes) (OMS, 2023b) (Figura 6).

Figura 6. Estimativa mundial de casos incidentes e mortes por câncer registrados de ambos os sexos, em todas as idades, com exceção do câncer de pele não-melanoma.



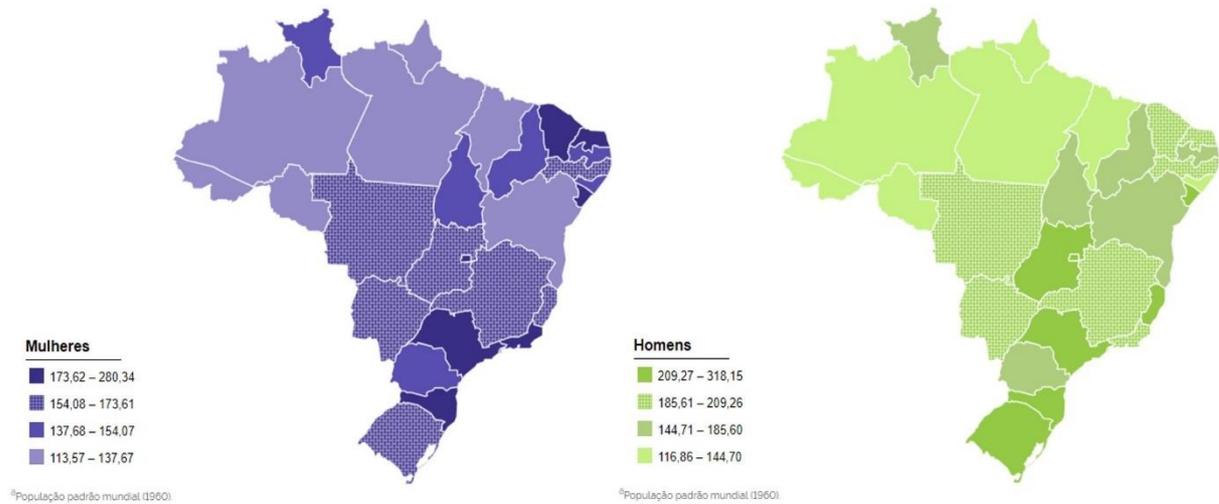
Fonte: Adaptado da OMS (2023b)

No Brasil, são esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025. O tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2022).

Em homens, o câncer de próstata é predominante em todas as regiões, totalizando 72 mil casos novos estimados a cada ano do próximo triênio, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Nas regiões de maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), os tumores malignos de cólon e reto ocupam a segunda ou a terceira posição, sendo que, nas de menor IDH, o câncer de estômago é o segundo ou o terceiro mais frequente entre a população

masculina. Já nas mulheres, o câncer de mama é o mais incidente (depois do de pele não melanoma), com 74 mil casos novos previstos por ano até 2025. Nas regiões mais desenvolvidas, em seguida vem o câncer colorretal, mas, nas de menor IDH, o câncer do colo do útero ocupa essa posição (INCA, 2022) (Figura 7).

Figura 7. Distribuição espacial das taxas ajustadas^a de incidência por 100 mil mulheres e homens, respectivamente, estimadas para o ano de 2023, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, exceto as de pele não melanoma), no Brasil.



Fonte: INCA (2022).

Na região Nordeste, do total de novos casos de câncer estimado para o triênio 2023-2025, o câncer de próstata é o mais incidente, numa proporção de 73,28/100 mil habitantes. Já o de mama feminino (52,20/100 mil) e o de colo de útero (17,59/100 mil) estão em segundo e terceiro lugares, respectivamente. A seguir estão detalhadas as taxas de incidência dos tipos de cânceres para a região Nordeste (Figura 8) e para o Estado de Pernambuco (Figura 9), em consonância com o que foi publicado pelo INCA, em Novembro de 2022.

Figura 8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*, no Nordeste.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	20.650	38,1%	Homens	Mulheres	Mama feminina	15.690	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	3.450	6,4%			Colo do útero	5.280	9,5%
Estômago	3.450	6,4%			Glândula Tireoide	4.060	7,3%
Cólon e Reto	3.100	5,7%			Cólon e Reto	3.930	7,0%
Cavidade Oral	2.350	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	3.120	5,6%
Leucemias	1.770	3,3%			Estômago	2.230	4,0%
Esôfago	1.630	3,0%			Ovário	1.960	3,5%
Fígado	1.600	2,9%			Corpo do útero	1.550	2,8%
Laringe	1.450	2,7%			Leucemias	1.530	2,7%
Sistema Nervoso Central	1.410	2,6%			Sistema Nervoso Central	1.360	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA (2022).

Figura 9. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas^a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo, em Pernambuco.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Mama Feminina	-	-	-	2.880	56,58	46,40	2.880	56,58	46,40
Próstata	2.930	62,35	57,17	-	-	-	2.930	62,35	57,17
Cólon e Reto	500	10,62	10,30	680	13,26	10,20	1.180	12,00	10,18
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	14,49	14,54	640	12,56	10,03	1.320	13,49	12,05
Estômago	560	11,82	10,09	390	7,70	5,26	950	9,68	7,35
Colo do Útero	-	-	-	770	15,18	12,14	770	15,18	12,14
Glândula Tireoide	90	1,96	1,83	580	11,46	6,69	670	6,90	4,67
Cavidade Oral	420	8,91	8,92	160	3,16	1,96	580	5,91	5,17
Linfoma não Hodgkin	180	3,78	3,56	210	4,15	2,87	390	3,97	3,19
Leucemias	260	5,46	4,73	280	5,49	4,04	540	5,47	4,36
Sistema Nervoso Central	290	6,19	5,05	300	5,83	4,00	590	6,00	4,47
Bexiga	210	4,56	4,26	120	2,35	1,56	330	3,41	2,75
Esôfago	300	6,46	6,53	150	2,98	1,71	450	4,65	4,06
Pâncreas	240	5,09	4,68	240	4,81	3,69	480	4,94	4,14
Fígado	360	7,70	7,56	350	6,79	4,41	710	7,23	5,35
Pele Melanoma	120	2,57	2,28	110	2,17	1,59	230	2,36	1,88
Corpo do útero	-	-	-	260	5,12	3,96	260	5,12	3,96
Laringe	230	4,99	5,08	60	1,10	0,82	290	2,97	2,70
Ovário	-	-	-	450	8,92	7,24	450	8,92	7,24
Linfoma de Hodgkin	30	0,63	0,58	40	0,87	0,72	70	0,75	0,64

^aPopulação padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2022).

Em meio a avanços na compreensão biológica dos tumores e benefícios relacionados a prevenção e diagnóstico precoce da doença, a quimioterapia continua sendo uma das abordagens mais utilizadas na terapia clínica do câncer após sua descoberta, mas tal alternativa é frequentemente dificultada pela resistência desenvolvida aos fármacos disponíveis. Mesmo as terapias mais eficazes geralmente deixam de produzir uma resposta tumoral completa e durável e, por fim, geram resistência à terapia e recidiva do tumor (KOSMALSKI et al., 2022). Tal resistência é um problema universal na quimioterapia, sendo uma das principais causas de morbimortalidade no câncer e continua a ser um grande desafio no tratamento desta doença (EFFERTH et al., 2020).

Relatos de resistência aos medicamentos usados no tratamento do câncer cresceram ao longo dos anos. Isso tem impulsionado, cada vez mais, o planejamento de novos fármacos antitumorais capazes de retardar o progresso do tumor ou encerrá-lo, bem como coibir a ocorrência de efeitos indesejáveis nos pacientes (RIBEIRO et al., 2019). Portanto, novos agentes anticâncer capazes de superar a resistência intrínseca ou desenvolvida são urgentemente necessários (KOSMALSKI et al., 2022).

Estudos direcionados às alterações moleculares específicas que ocorrem no tumor são úteis no tratamento e erradicação de cânceres. Um medicamento anticâncer ideal eliminaria as células neoplásicas sem prejudicar tecidos normais. Infelizmente, até o presente momento nenhum dos agentes antitumorais disponíveis atendem a esse critério com um índice terapêutico favorável. Portanto, novos agentes anticâncer que possuam um alvo específico e um mecanismo de ação avançado com índice terapêutico favorável são considerados valiosos no campo da descoberta de medicamentos relacionados à oncologia (SHARMA et al., 2020).

Com base nisso, um objetivo constante da pesquisa oncológica é o desenvolvimento de novos quimioterapêuticos específicos, com identificação de novos alvos biológicos, especialmente para os tumores mais agressivos (LIANG et al., 2019). Ou seja, busca-se uma terapia direcionada ao câncer, na qual medicamentos são usados para bloquear especificamente o crescimento do tumor, interferindo com alvos moleculares e, conseqüentemente, causando menos danos às células normais (SONG et al., 2020).

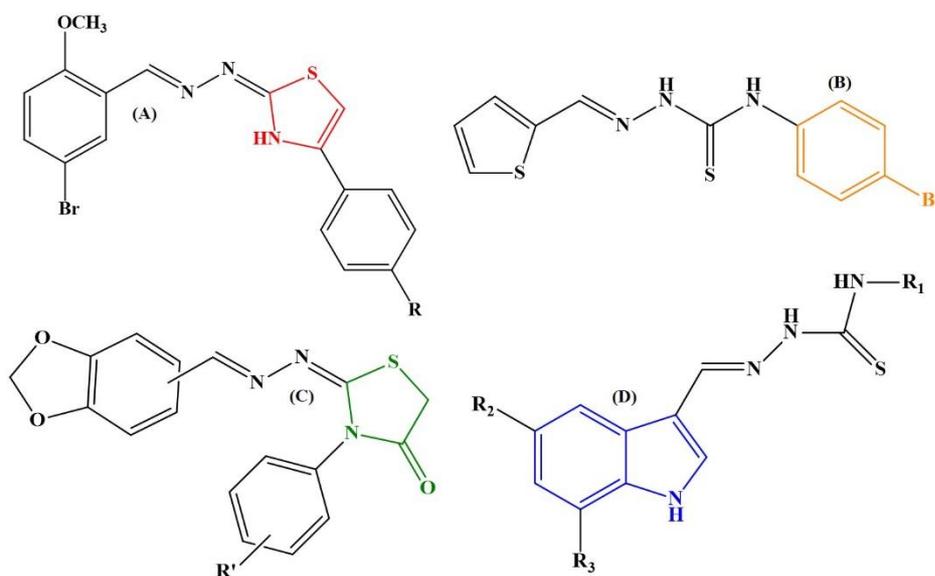
3.2 O USO DE HETEROCICLOS NA DESCOBERTA DE NOVOS ANTITUMORAIS

Diversas moléculas biologicamente ativas contêm heteroátomos como nitrogênio, enxofre e oxigênio, o que sempre chamou a atenção dos especialistas ao longo dos anos, principalmente por causa de sua importância biológica (HIDER et al., 2022). Os compostos heterocíclicos têm papel crucial nos sistemas biológicos e estão presentes em uma grande

diversidade de candidatos a medicamentos, como antibióticos, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, antifúngicos e antidiabéticos (MANJAL et al., 2017). A atividade biológica dos compostos depende principalmente de suas estruturas moleculares. Heterociclos, como azóis, ocupam um lugar de destaque na Química Medicinal devido à sua ampla gama de aplicações nas áreas de desenho e descoberta de medicamentos (SHARMA et al., 2020).

A química heterocíclica é uma das fontes mais valiosas de novas moléculas, com diversas atividades biológicas (Figura 10), principalmente devido à capacidade única dos compostos resultantes de imitar a estrutura de ligantes endógenos e de se ligarem reversivelmente aos alvos de interesse (DHIMAN et al., 2022). A principal vantagem de estruturas heterocíclicas possivelmente depende da capacidade de sintetizar uma dessas bibliotecas com base em um núcleo específico (*scaffolds*), permitindo protocolos de rastreio contra uma variedade de alvos diferentes (HIDER et al., 2022).

Figura 10. Estruturas químicas de protótipos heterociclos estudados para as atividades farmacológicas antibacteriana (A), anti-inflamatória e antinociceptiva (B), esquistossomicida (C) e leishmanicida (D).

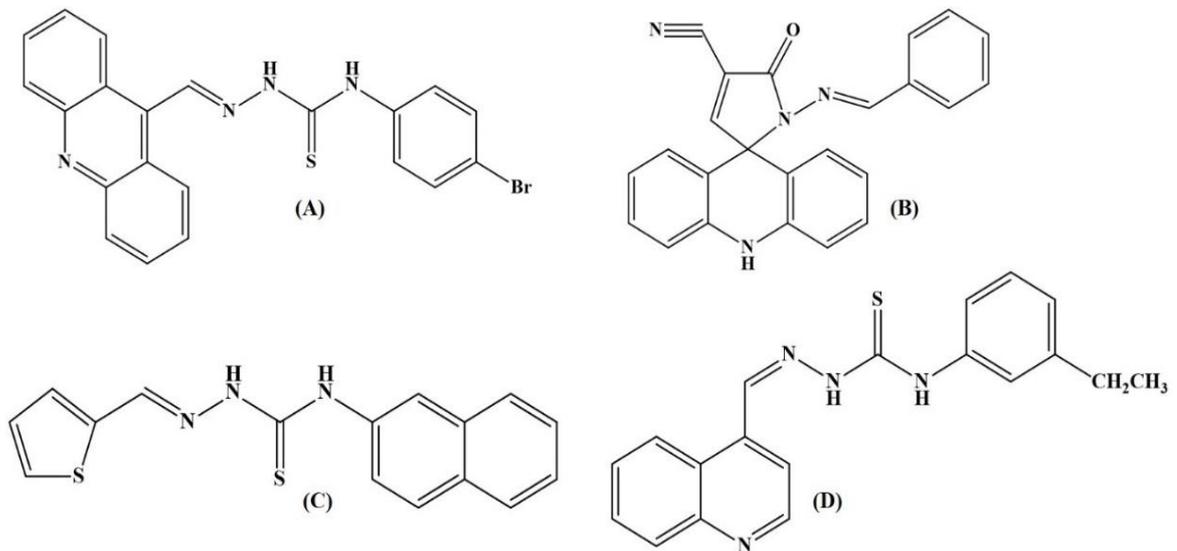


Fontes: Pereira et al., 2019 (A), Oliveira et al., 2016 (B), Silva et al., 2018 (C) e Silva et al., 2020 (D).

Heterociclos podem ser projetados por meio de combinações quase ilimitadas, resultando em novas estruturas químicas bicíclicas ou policíclicas com diversas propriedades físicas, químicas e biológicas. No geral, a fusão de anéis conduz a estruturas estericamente bem definidas, com alta especialização funcional que resulta na capacidade de orientar substituintes no espaço tridimensional como exigidos pelos alvos biológicos (CILLIBRIZI et

al., 2019). Por exemplo, no campo do tratamento do câncer, sistemas de anéis heterocíclicos desempenham um papel significativo na descoberta de novas substâncias bioativas devido aos seus efeitos potentes e probabilidade em causar menos efeitos colaterais, visto que porções heterocíclicas estão amplamente presentes em vários compostos bioativos naturais. Efeitos indesejáveis, toxicidade, resistência aos medicamentos e baixa biodisponibilidade são alguns dos principais problemas conhecidos para agentes anticâncer utilizados na clínica. Portanto, a utilização de heterociclos como *scaffolds* pode ser útil na descoberta de novos agentes anticâncer mais eficientes e seletivos (SINGH; LUXAMI; PAUL, 2020) (Figura 11).

Figura 11. Estruturas químicas de protótipos heterociclos estudados para a atividade antineoplásica.



Fontes: Almeida et al., 2015 (A), Almeida et al., 2016 (B), Oliveira et al., 2015 (C) e Ribeiro et al., 2019 (D).

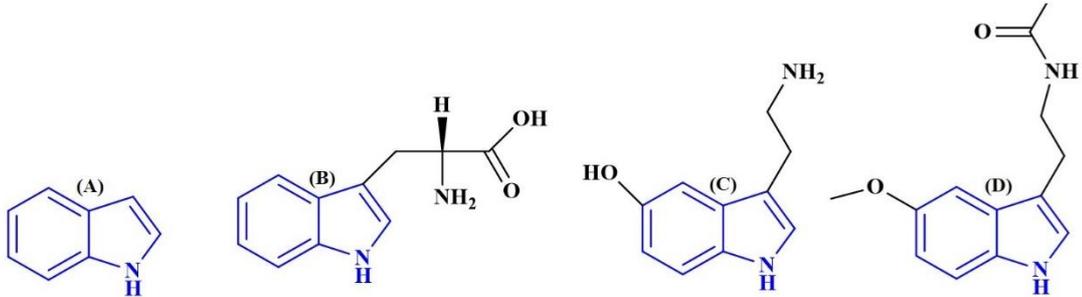
Com base nessas informações, é notável a importância em continuar o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos providos de estruturas químicas heterocíclicas, com a finalidade da obtenção de fármacos e candidatos a fármacos mais eficazes e seletivos, como as pesquisas têm indicado, especialmente para os grupos químicos que serão discutidos a seguir.

3.2.1 O núcleo indol

O indol, também denominado como 1*H*-benzo[b]pirrol, tem fórmula molecular C_8H_7N e é uma molécula bicíclica planar, amplamente distribuída em produtos naturais e moléculas bioativas cruciais, tais como o triptofano, a serotonina e a melatonina (THANIKACHALAM et al., 2019; JIA et al., 2020) (Figura 12). Tal grupo químico é um farmacóforo versátil e um

composto heterocíclico com ampla gama de propriedades farmacológicas (Figura 13), incluindo antibacteriana, anticonvulsivante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica, antiviral, antitumoral (KONUS et al., 2022), entre outras.

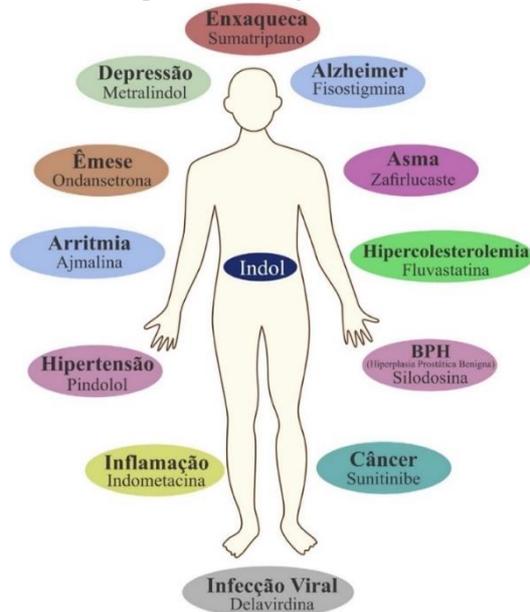
Figura 12. Estruturas químicas do núcleo indol (A), do triptofano (B), da serotonina (C) e da melatonina (D).



Fonte: O autor.

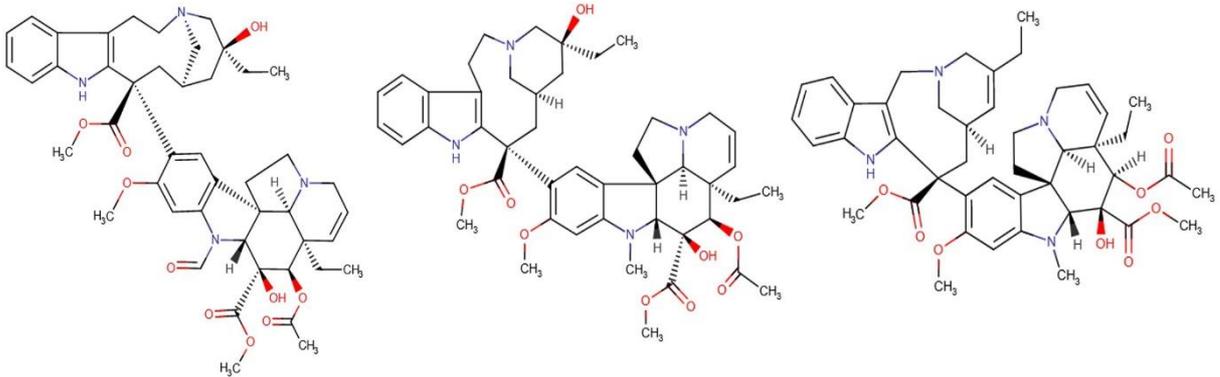
Alcaloides indólicos são abundantes em esponjas, algas, raízes de plantas, cascas, folhas, flores, frutos, fungos e representam uma fonte significativa de compostos farmacologicamente ativos (ROSALES et al., 2019; HOLLAND; KIEFEL; CARROLL, 2020). Até o momento, vários alcalóides indólicos aqui exemplificados pela vincristina, vimblastina e vinorelbina (Figura 14) têm sido usados na prática clínica ou testados em uma série de ensaios clínicos para combater uma variedade de cânceres, incluindo tipos resistentes a medicamentos (JIA et al., 2020).

Figura 13. Exemplos das atividades polifarmacológicas do núcleo indol, com seus respectivos fármacos.



Fonte: Adaptado de Chadha & Silakari (2017).

Figura 14. Estruturas dos alcaloides indólicos Vincristina, Vimblastina e Vinorelbina, respectivamente.

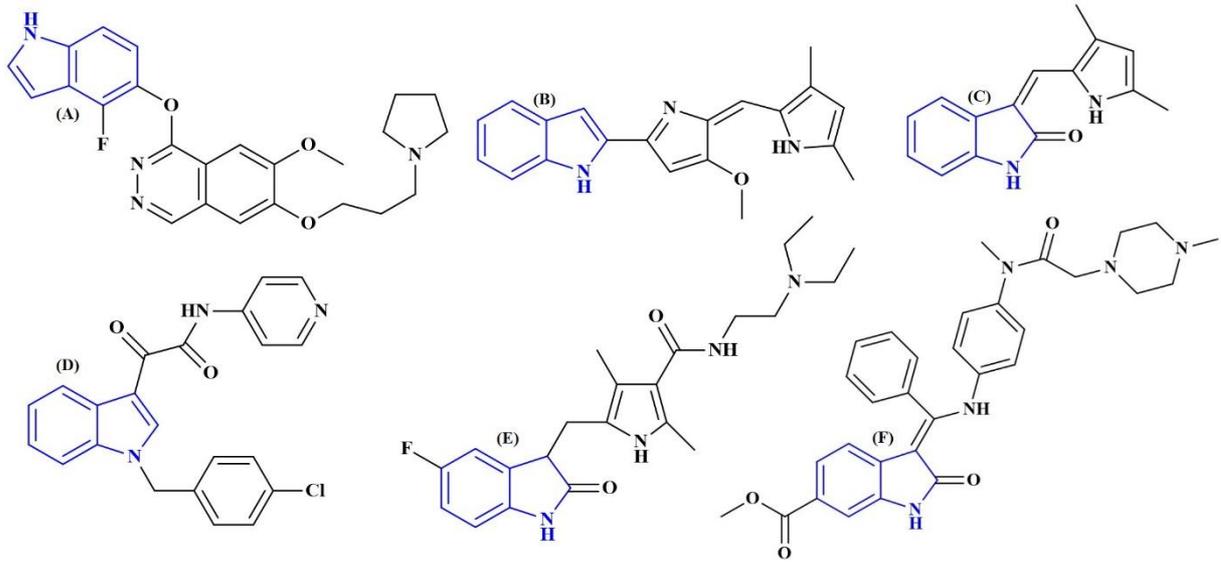


Fonte: <https://go.drugbank.com/>

Nos últimos anos, novos derivados indólicos orgânico-sintéticos foram desenvolvidos como potentes fármacos antitumorais, incluindo cediranibe, obatoclax, D-24851 e sunitinibe (LIU et al., 2020) (Figura 15). Outros compostos contendo o núcleo indol tais como Semaxanibe e Nintedanibe (Figura 15) já foram aplicados na prática clínica para o tratamento de vários tipos de câncer (JIA et al., 2020). Tal ação farmacológica pode ocorrer por meio de uma série de mecanismos, incluindo sua atuação na replicação e transcrição do DNA, por meio da inibição de enzimas importantes nestes processos, como as topoisomerases (ALMEIDA et al., 2017).

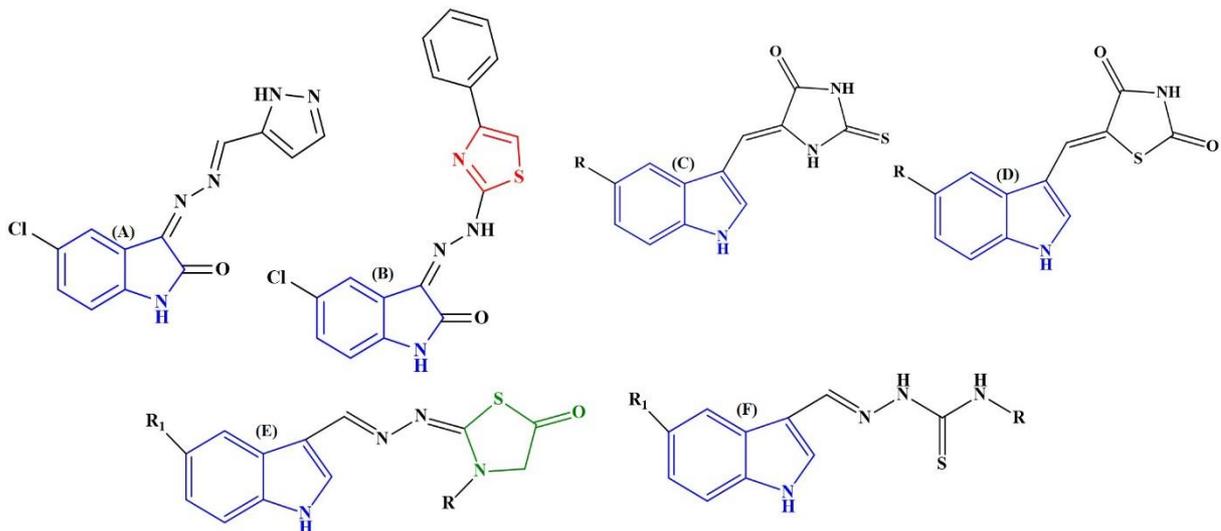
Há várias investigações acerca da ação antineoplásica de derivados indólicos conjugados a outros grupos químicos, com resultados promissores. Como exemplos disto, pode-se fazer menção da atividade antitumoral observada em derivados indol-pirazol e indol-tiazol (ELDEHNA et al., 2018), indol-tiazolidinas e indol-imidazolidinas (LAFAYETTE et al., 2017), indol-tiossemicarbazonas e indol-tiazolidinonas (OLIVEIRA et al., 2017) (Figura 16). Portanto, a porção indol é um grupo farmacofórico útil ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais com atividade potencial contra diversos tipos de câncer (KARADAYI et al., 2020).

Figura 15. Estruturas químicas dos agentes antitumorais indólicos Cediranibe (A), Obatoclax (B), Semaxanibe (C), D-24851 (D), Sunitinibe (E) e Nintedanibe (F).



Fontes: Liu et al., 2020 (A, B, D e E) e Jia et al., 2020 (C e F).

Figura 16. Estruturas químicas de protótipos indólicos conjugados a outros grupos farmacofóricos com propriedades antineoplásicas.



Fontes: Eldehna et al., 2018 (A e B), Lafayette et al., 2017 (C e D) e Oliveira et al., 2017 (E e F).

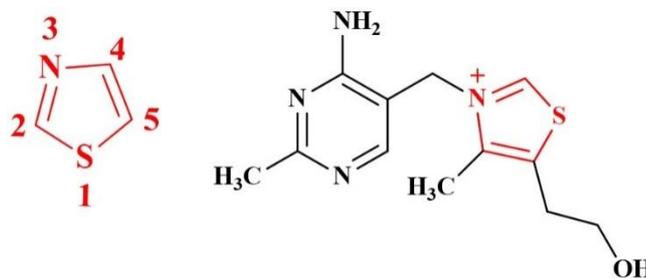
3.2.2 O núcleo tiazol

O tiazol é um composto aromático heterocíclico que contém átomos de enxofre e nitrogênio nas posições 1 e 3 de seu anel de cinco membros (Figura 17). Com fórmula molecular C_3H_3NS , possui um grupo doador (-S-) e um grupo receptor de elétrons (C=N). É

um composto heterocíclico aromático estável (MISHRA; KUMARI; TIWARI, 2015).

A porção tiazol pode ser encontrada em compostos biologicamente ativos de origem natural, como a tiamina (forma biologicamente ativa da vitamina B₁) (DE SOUZA, 2005) (Figura 17), bem como moléculas sintéticas detentoras de uma ampla gama de atividades farmacológicas, como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatório, anticonvulsivante e agentes antineoplásicos como a Bleomicina e Tiazofurina (ALJAMALI et al., 2020; GOMHA et al., 2022; SABRY et al., 2022).

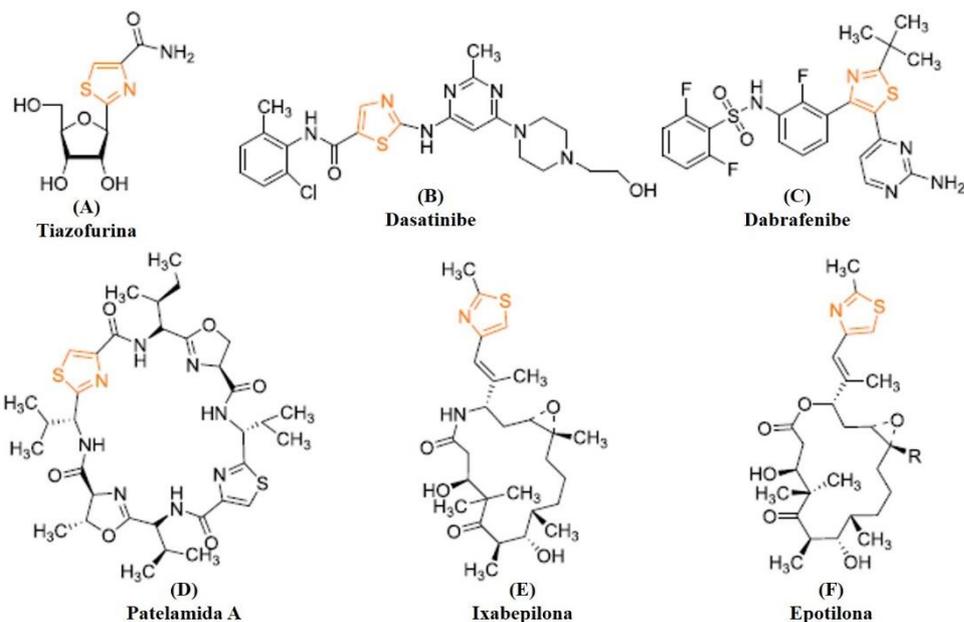
Figura 17. Estruturas químicas do anel tiazol e da tiamina (vitamina B₁), respectivamente.



Fonte: O autor.

Modificações do anel tiazol em várias posições conduziram a uma variedade de novos compostos com amplo espectro de atividades farmacológicas. Além disso, compostos contendo o núcleo tiazol têm sido usados clinicamente como quimioterápicos no tratamento anticâncer. Como exemplos desses fármacos, pode-se citar a tiazofurina (FRANCHETTI et al., 1995), dasatinibe (LI et al., 2009), dabrafenibe (HU-LIESKOVAN et al., 2015), patelamida A (RASHID et al., 1995), ixabepilona (YAO et al., 2014) e epotilona (ALTMANN, 2003) (Figura 18), os quais agem por meio de diversos mecanismos (inibição enzimática, inibição de microtúbulos, etc).

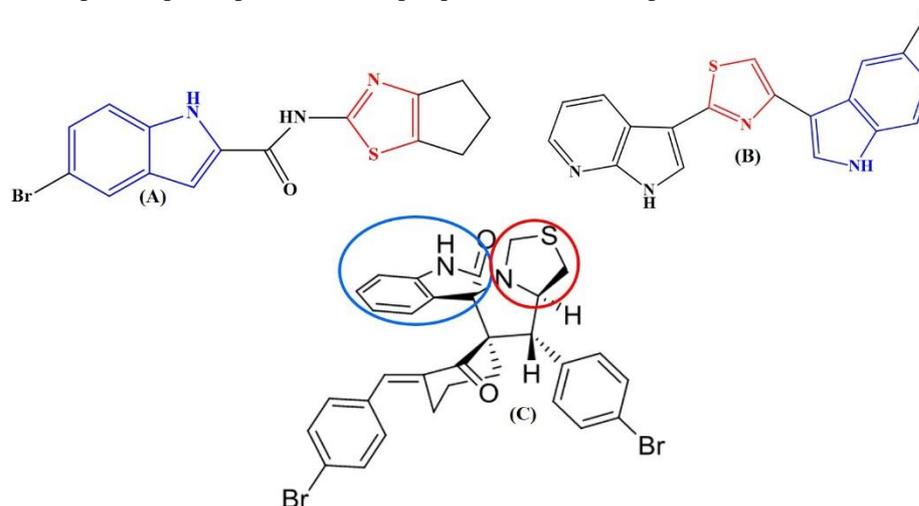
Figura 18. Estruturas químicas de agentes anticâncer portadores do núcleo tiazol.



Fonte: Adaptado de Sharma et al., 2020.

Ademais, estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar a inserção de diversos grupos químicos ao anel tiazol e seus derivados, no intuito de potencializar, reciprocamente, sua ação farmacológica, como é o caso do núcleo indol, cujas atividades farmacológicas são, muitas vezes, aprimoradas quando uma mesma estrutura química é portadora de ambos os núcleos, atuando no fortalecimento, por exemplo, da atividade antineoplásica, como aventado em várias investigações científicas (O'DEA et al., 2018; PARRINO et al., 2015; LOTFY et al., 2017) (Figura 19).

Figura 19. Exemplos de protótipos usados em pesquisas antitumorais portadores dos núcleos indol e tiazol.

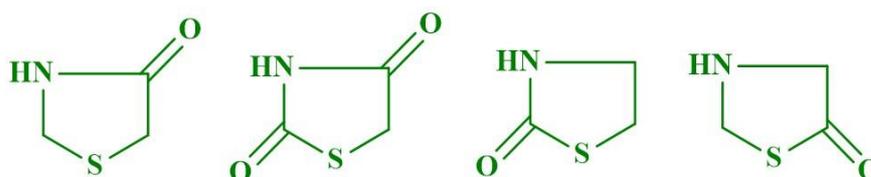


Fontes: O'dea et al., 2018 (A), Parrino et al., 2015 (B) e Lotfy et al., 2017 (C).

3.2.3 O núcleo tiazolidinona

Tiazolidinonas são derivados de tiazolidinas e têm um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonil na posição 2, 4 ou 5. Sobretudo, o “*scaffold*” 4-tiazolidinona (Figura 20) é muito versátil e tem constado em vários fármacos usados clinicamente. Sua presença na penicilina foi o primeiro reconhecimento de sua ocorrência na natureza (AQLAN et al., 2022). Nas últimas duas décadas, o anel tiazolidinona emergiu como um novo núcleo importante em muitos agentes quimioterapêuticos especiais. Existem relatos na literatura que descrevem derivados de tiazolidinona sendo usados em atividades farmacológicas como antifúngico, anticâncer, anti-HIV, anti-inflamatório, antimicrobiano, antidepressivo, por exemplos (ROSZCZENKO et al., 2022; FINIUK et al., 2022).

Figura 20. Exemplos de estruturas químicas do núcleo 4-Tiazolidinona.



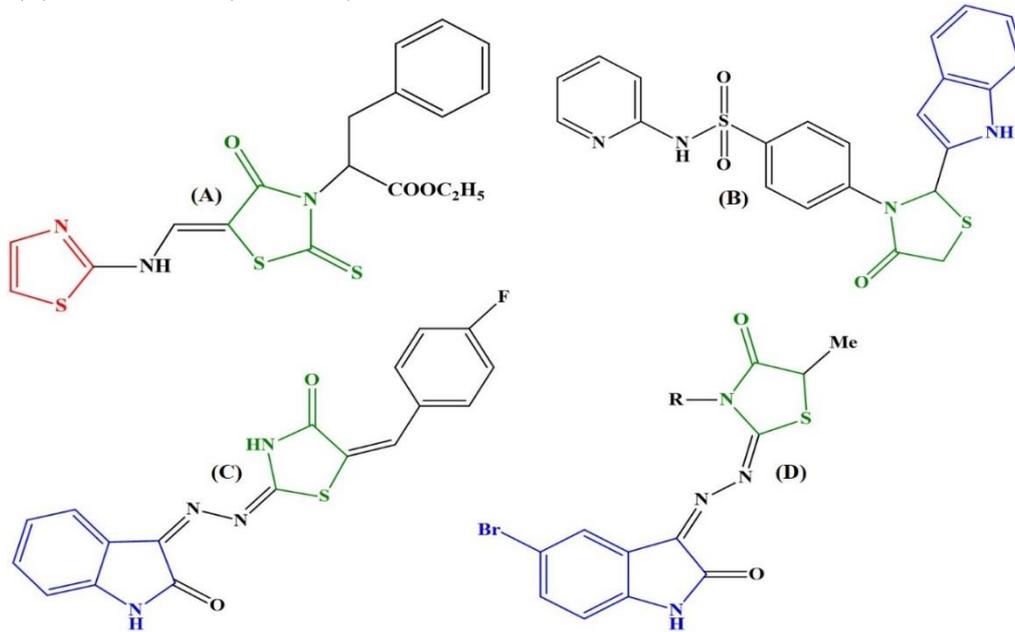
Fonte: O autor.

O anel tiazolidinona foi incorporado em uma gama de compostos biologicamente ativos conhecidos, seja como um grupo substituinte ou como uma substituição de outro anel, inspirando pesquisadores a sintetizar vários compostos contendo esta porção, cujos dados da literatura têm confirmado seu potencial para melhorar perfis farmacológicos, farmacocinéticos e físico-químicos de moléculas (SHARMA et al., 2020). Este núcleo está sendo continuamente explorado para projetar e sintetizar novos compostos. Um grande número de substituições é possível nas posições 2, 3 e 5, o que leva a mudanças nas propriedades dos compostos. Variações nos substituintes ligados ao átomo de nitrogênio e ao átomo de carbono metilênico também são possíveis para projetar novos derivados (MANJAL et al., 2017).

Embasando-se nisto, várias investigações científicas têm abordado a presença de derivados 4-tiazolidinona e outros grupos farmacofóricos em um mesmo protótipo a fim de avaliar suas propriedades antitumorais, cujos resultados encontrados são promissores. A exemplo disto, há estudos com derivados de 4-tiazolidinona com o anel indólico (KARALI; TERZIOGLU; GÜRSOY, 2002; RAMSHID et al., 2010; KAMEL et al., 2010;

ROSZCZENKO et al., 2022) e com o tiazol (HOLOTA et al., 2019) (Figura 21).

Figura 21. Exemplos de protótipos usados em pesquisas antitumorais portadores dos núcleos indol (B, C, D), tiazol (A) e tiazolidinona (A, B, C, D).



Fontes: Holota et al., 2019 (A), Kamel et al., 2010 (B), Ramshid et al., 2010 (C) e Karali; Terzioglu; Gürsoy, 2002 (D).

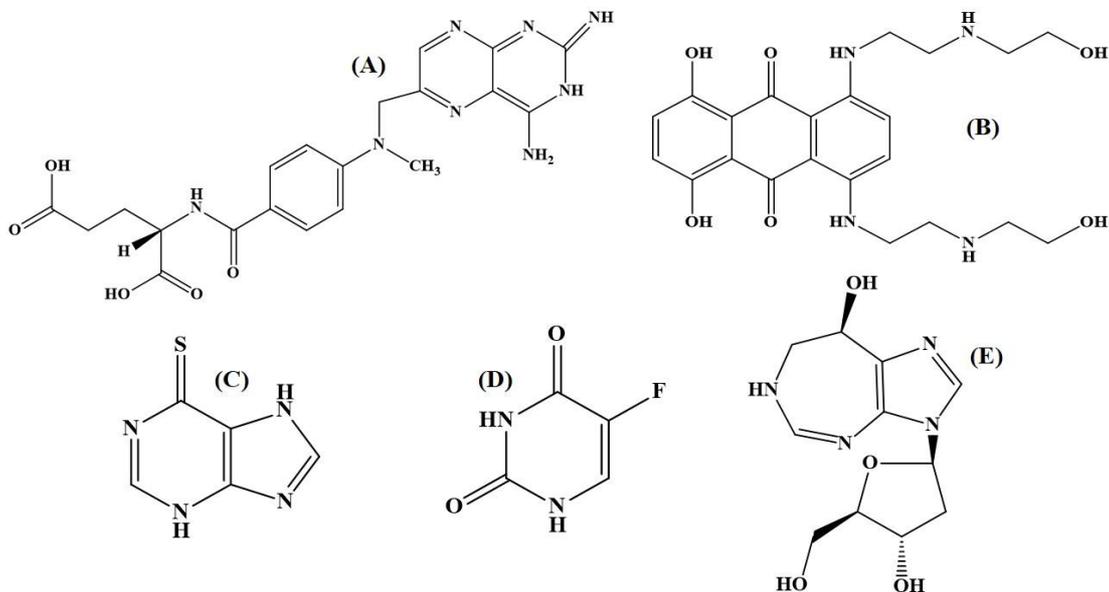
3.3 O DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER

O ácido desoxirribonucléico (DNA) contém todas as informações necessárias para especificar o desenvolvimento biológico dos organismos vivos. Ele controla a informação hereditária transferida para a prole durante a reprodução, após ser replicado e transmitido. Nesse processo, a sequência de pares de bases do DNA define os caracteres dos indivíduos, desde os traços físicos até a suscetibilidade a doenças. Isso pode ser útil para entender o mecanismo de muitas doenças. É também uma biomolécula utilizada no desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas (ALVES et al., 2021a), principalmente aquelas com pequenas moléculas que têm como alvo o DNA, devido à acessibilidade para alguma sequência do genoma (LAN et al., 2023).

Há muito tempo, os cientistas vêm fazendo grandes esforços para desenvolver fármacos anticâncer direcionadas ao DNA. O desenho de moléculas que se ligam e reagem em sequências específicas do DNA são especialmente importantes no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. O DNA é um alvo bem estabelecido para estes medicamentos, pois essas moléculas podem interagir com esta biomolécula para afetar sua replicação e

transcrição, causando-lhe danos nas células neoplásicas, o que resulta em morte celular (DONG et al., 2020; ASMY; BUTLER; MOSTAFA, 2020). Ou seja, pequenas moléculas de ligantes interagem com o DNA e alteram e/ou inibem o seu funcionamento, funcionando como um medicamento quando é necessário modificar a função do DNA para tratar ou controlar doenças (KAHRIMAN et al., 2023; ALTURIQI et al., 2020). Exemplos de medicamentos já usados clinicamente no combate ao câncer cujo alvo farmacológico é o DNA são a mitoxantrona, 5-fluorouracil, metotrexato, mercaptopurina e pentostatina (Figura 22).

Figura 22. Estruturas de fármacos anticâncer cujo alvo é o DNA: metotrexato (A), mitoxantrona (B), mercaptopurina (C), 5-fluorouracil (D) e pentostatina (E).



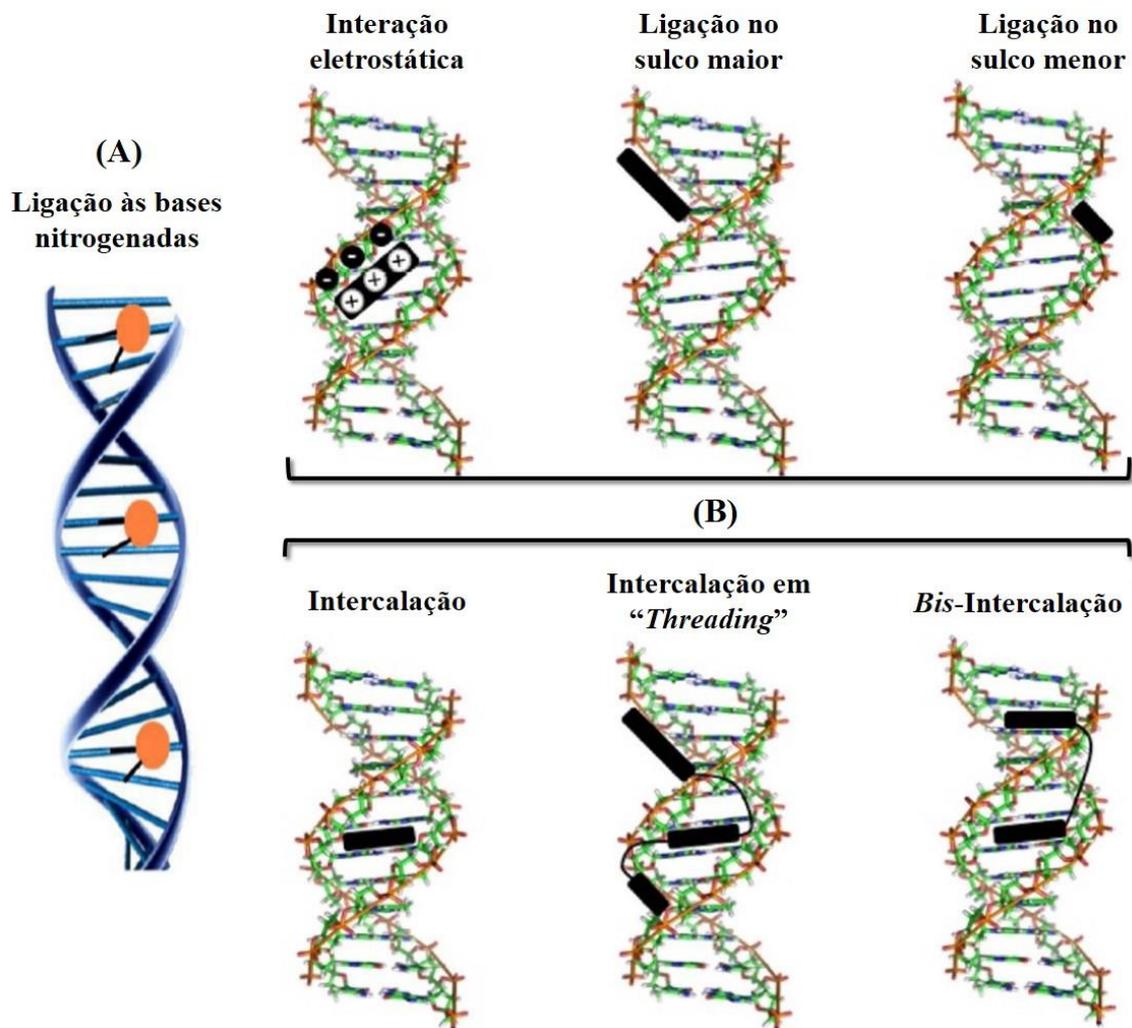
Fonte: O autor.

A eficiência do fármaco cujo alvo é o DNA depende de seu modo de ligação e afinidade. Assim, o estudo da ligação de moléculas ao DNA é essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (KAHRIMAN et al., 2023). Há duas formas possíveis de ligação entre agentes anticâncer e o DNA: covalente e não-covalente (CHAVES et al., 2020). Assim, eles impedem a replicação desenfreada e causam morte celular via apoptose e/ou necrose (BAS et al., 2018). As forças de interação não covalentes, como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas, desempenham um papel importante na ligação da fármacos e candidatos a fármacos tendo o DNA como alvo (SHAHABADI; MAHDAVI; MOMENI, 2020).

Como exemplos de ligantes que interagem covalentemente com o DNA existem os agentes alquilantes (RAHMAN et al., 2017). Este tipo de interação corresponde a uma ligação

irreversível por meio de adutos entre os ligantes do complexo ou mesmo uma possível alquilação de bases nitrogenadas do DNA. Já a interação não covalente é uma interação reversível em que uma molécula interage com biomoléculas via intercalação, forças eletrostáticas ou interação aos sulcos, desencadeando mudanças na conformação do DNA, quebras em sua estrutura ou mesmo inibição da interação proteína-DNA. A ligação intercalativa e de sulco podem acontecer simultaneamente e de variadas formas, perto ou dentro da dupla hélice desta biomolécula, enquanto a ligação eletrostática ocorre na parte externa do DNA (ALMEIDA et al., 2017) (Figura 23).

Figura 23. Representação dos modos covalente (A) e não-covalente (B) de interação entre ligantes e o DNA.

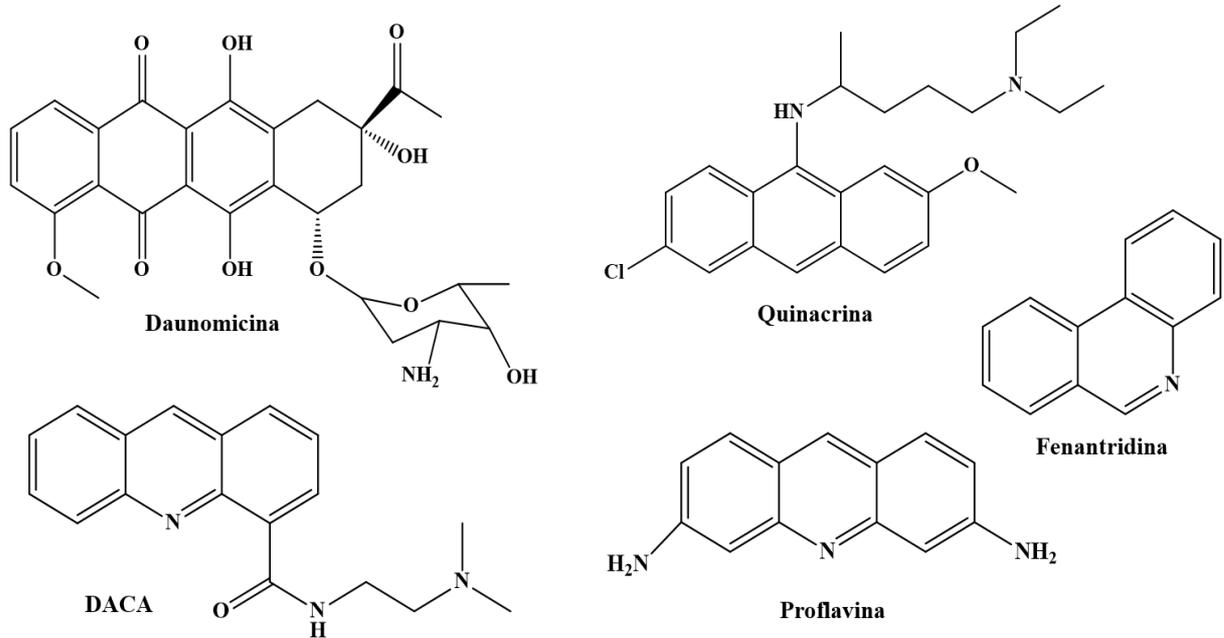


Fontes: Adaptado de Barra; Netto, 2015 (A) e de Almeida et al., 2017 (B).

As interações por intercalação compreendem a inserção do ligante dentro da hélice do DNA, entre os pares de bases, alterando a replicação do DNA e inibindo o crescimento da célula tumoral (base para a concepção de novos fármacos antitumorais), tornando-os mais

eficientes de acordo com a sua afinidade por esta biomolécula (LAFAYETTE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Exemplos de compostos químicos cujo modo de interação com o DNA é por via intercalativa estão representados na Figura 24.

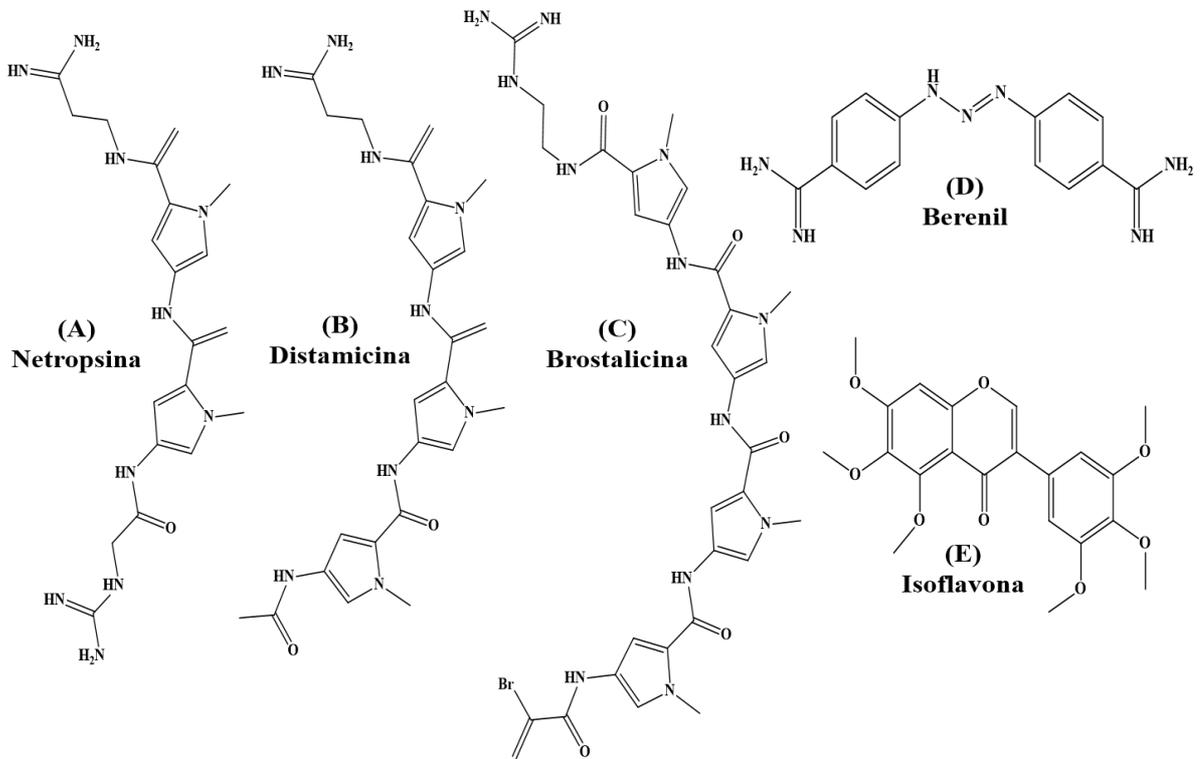
Figura 24. Estruturas químicas de agentes intercalantes do DNA.



Fonte: Adaptado de Rescifina et al., 2014.

Outro tipo de interação ocorre por meio da ligação aos sulcos do DNA, podendo ser uma ligação ao sulco menor ou maior que são predominantemente estabilizados pela interação de van der Waals e ligações de hidrogênio formadas entre pequenas moléculas e as bases nitrogenadas desta biomolécula, causando uma pequena distorção na sua “espinha dorsal”. Ademais, pode ocorrer a formação do complexo DNA-ligante mediante ligações eletrostáticas (ou ligações externas) entre a “espinha dorsal” do fosfato do DNA carregado negativamente com uma pequena carga positiva de uma determinada molécula, como o DNA (QAIS; AHMAD, 2018). Exemplos de compostos para ambos os modos de interação não-covalentes com o DNA acima mencionados estão representados na Figura 25.

Figura 25. Estruturas químicas de compostos que interagem com o DNA via ligação aos sulcos (A-D) e por interações eletrostáticas (E).



Fontes: Mirzaei-Kalar (2018) (A, B e D), Ali; Bhattacharya (2014) (C) e Parveen et al., 2016 (E).

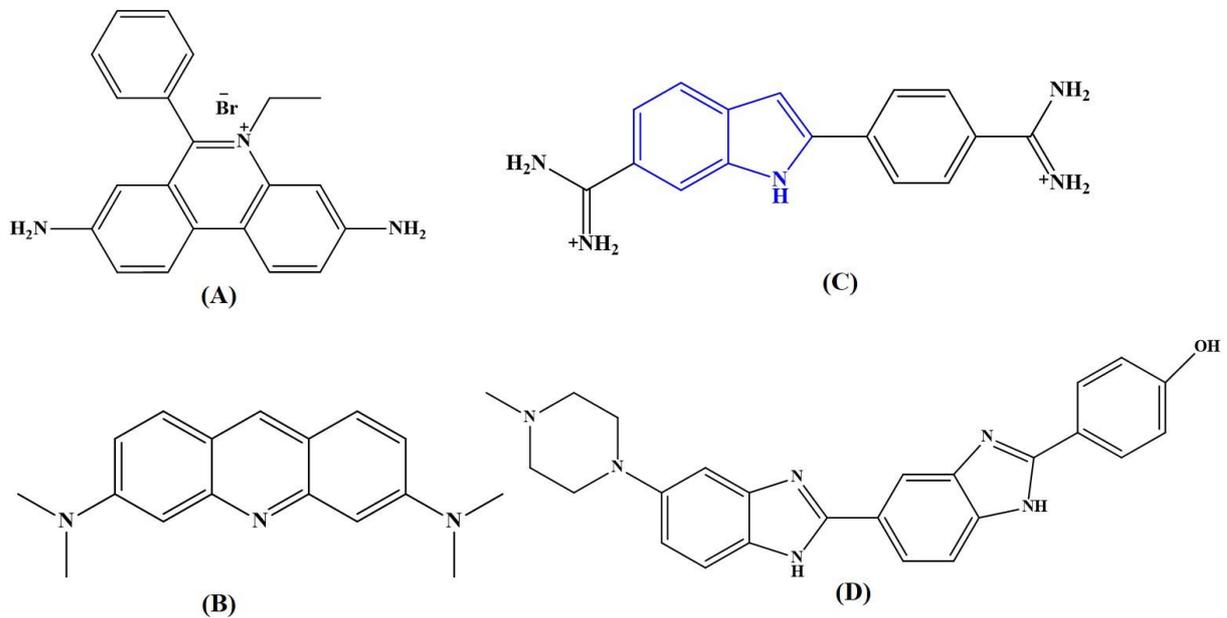
Na literatura são reportadas investigações relativas à interação entre DNA e outras moléculas por meio de técnicas espectroscópicas, como absorção UV-visível (UV-vis) e emissão fluorescente, por exemplo. Como uma das técnicas mais eficazes para explorar o modo de ligação de pequenas moléculas ao DNA, a espectroscopia de absorção UV-vis pode fornecer dados significativos para a natureza do processo de interação de um dado ligante com o DNA (LAN et al., 2023; KAHRIMAN et al., 2023). Esta técnica permite a obtenção da constante de ligação (K_b), uma medida quantitativa da interação entre compostos orgânicos e DNA (MCGHEE; HIPPEL, 1974). O valor é útil para comparar moléculas com diferentes estruturas, bem como para indicar os modos de ligação ao DNA (LAFAYETTE et al., 2013). Constantes de ligação para intercaladores típicos estão no intervalo de 10^4 a 10^6 M^{-1} e são significativamente menores do que constantes de ligação para agentes ligantes em sulcos de DNA que variam de 10^5 a 10^9 M^{-1} (ALMEIDA et al., 2017).

Com relação à espectroscopia de emissão fluorescente, o fenômeno da extinção fluorescente é um método eficaz para estudar a interação entre ligantes e macromoléculas biológicas, a partir do qual é possível calcular a constante de supressão (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006). Em virtude da sensibilidade e especificidade da espectroscopia de fluorescência, essa

técnica tem provado ser uma ferramenta versátil e confiável para a análise de interações entre biomoléculas e fármacos ou candidatos a fármacos (SHINDE et al., 2020).

Cabe ressaltar que a emissão fluorescente do DNA é fraca. Em função disto, sondas fluorescentes são comumente usadas, pois têm sua emissão condicionada à interação com o DNA. Algumas sondas possuem o seu modo de ligação ao DNA já bem definido e são úteis para decifrar o modo de interação de um ligante com esta biomolécula, como o brometo de etídio (BE) (BANERJEE et al., 2020) e a laranja de acridina (LA) (SANI et al., 2018), agentes intercalantes bem estabelecidos, ou o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (ALI et al., 2018) e o Hoechst 33258 (QAIS; AHMAD, 2018), ambos ligantes ao sulco menor do DNA (Figura 26). Nestes experimentos, um determinado ligante, supostamente, interage com o DNA de uma maneira semelhante à sonda utilizada, substituindo-a, uma vez que esta já esteja conjugada ao DNA. Assim, qualquer alteração nas propriedades fluorescentes do complexo sonda-DNA, após a adição do ligante, pode gerar dados norteadores do mecanismo de ligação dos compostos investigados (REHMAN et al., 2015; TIAN et al., 2017).

Figura 26. Estruturas químicas de sondas fluorescentes usadas para decifrar o modo de interação de um ligante com o DNA: Brometo de Etídio (A), Laranja de Acridina (B), DAPI (C) e Hoeschst 33258 (D).

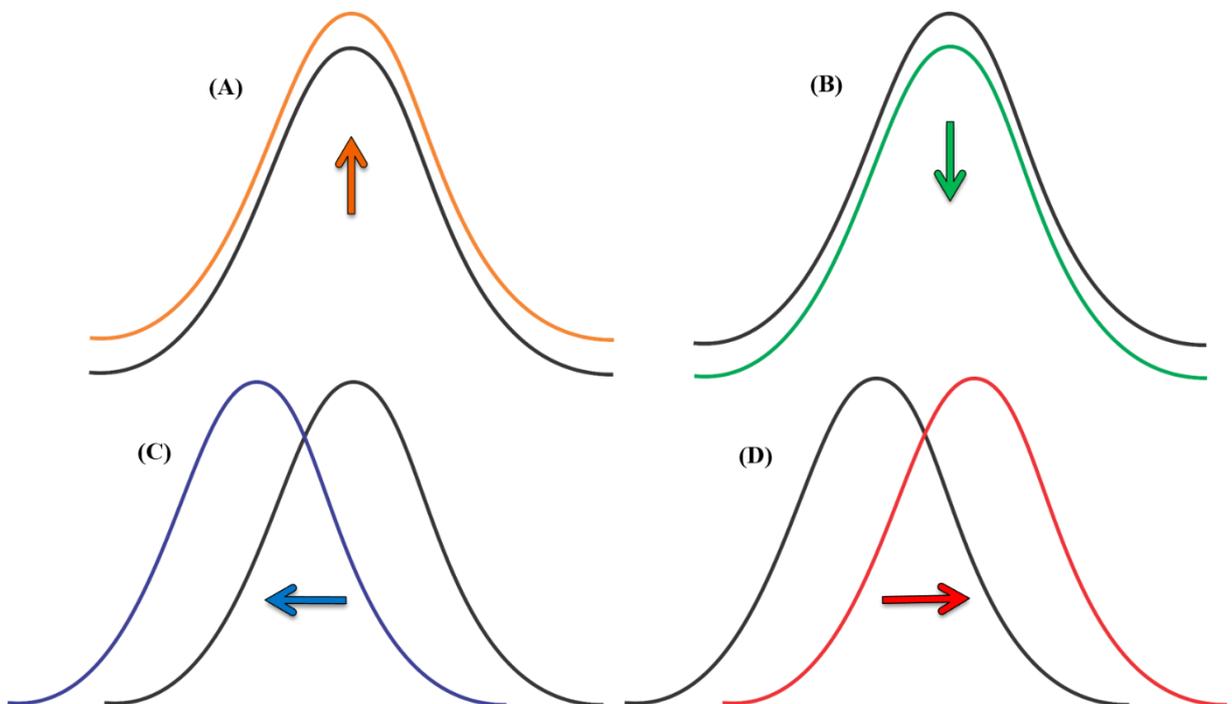


Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Uma vez decorrido o processo de interação do complexo biomolécula-ligante, pode-se verificar alterações nas intensidades e nos picos formados, a partir da análise dos espectros de absorção ou fluorescência, os quais são úteis para se investigar o mecanismo de interação por meio dos seguintes efeitos: efeito hipocrômico, correspondente à uma diminuição da luz

absorvida ou emitida (BAS et al., 2018); efeito hipercrômico, definido como aumento da intensidade de absorção ou emissão de luz (SHAHABADI; MAGHSUDI, 2014); efeito batocrômico, observado pelo deslocamento dos máximos de absorção ou emissão após ligação ao DNA para um comprimento de onda mais longo (deslocamento para a região do vermelho) (PAWAR; OTTOOR, 2018) e efeito hipsocrômico, quando ocorre deslocamento do máximo de absorção ou emissão para comprimentos de ondas menores (deslocamento para o azul) (CANOVIC et al., 2017). A Figura 27 representa os efeitos que podem ser detectados em estudos de interação entre ligantes e biomoléculas, como o DNA, a partir do uso das técnicas espectroscópicas supracitadas.

Figura 27. Representação dos seguintes efeitos espectroscópicos: hiperromismo (A), hipocromismo (B), hipsocromismo (C) e batocromismo (D), obtidos a partir do aumento, diminuição ou desvio do pico máximo obtido para a esquerda ou direita, respectivamente.



Fonte: O autor.

Os efeitos acima mencionados são importantes para se identificar a formação de um complexo entre um ligante e uma biomolécula e os possíveis mecanismos manifestados durante o processo de interação, a exemplo da ligação aos sulcos do DNA (ALVES et al., 2021a) ou da ocorrência de alterações no microambiente dos aminoácidos de proteínas plasmáticas, em função da formação do sistema biomolécula-ligante (ALSAIF et al., 2020).

Outra forma de analisar o processo de interação do DNA com um ligante é mediante os estudos *in silico*, como o “*docking*” (acoplamento/encaixe) molecular, que é muito utilizado na descoberta de novos fármacos (DONG et al., 2020). Esta abordagem é muito preditiva para modelar a interação entre um dado ligante e uma biomolécula-alvo, a fim de verificar a possível formação de um complexo estável a nível atômico e para encontrar a melhor orientação com energia mínima geral, o que nos permite determinar o modo de ligação e afinidade entre as moléculas constituintes no reconhecimento molecular e compreender os mecanismos de interação com o intuito de projetar novas moléculas terapêuticas, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (ABBAS; FISAL; ORABI, 2020).

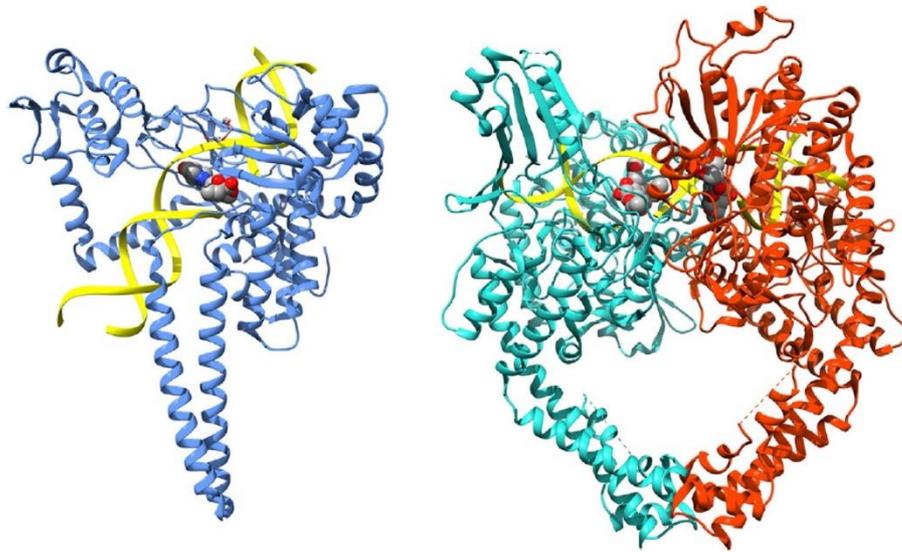
3.4 TOPOISOMERASE II α COMO ALVO PARA A TERAPIA ANTICÂNCER

Entre a variedade de alvos moleculares para terapia de câncer, as enzimas topoisomerasas são alvos bem caracterizados devido ao fato de serem ubíquas e terem funções essenciais no controle e modificação da topologia do DNA durante a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SINGH et al., 2023). Essas proteínas são capazes de relaxar a dupla cadeia de DNA por meio de um mecanismo de clivagem, permitindo o processo de replicação mediante rupturas transitórias na cadeia de DNA, o qual é girado e suas fitas previamente rompidas são religadas (POMMIER et al., 2016).

A presença das topoisomerasas e seu funcionamento adequado é um dos elementos-chave da maioria dos processos celulares, os quais requerem acesso às informações armazenadas na dupla fita do DNA, havendo, para isso, a necessidade de quebrar transitoriamente uma ou até mesmo suas duas fitas (SHINDE et al., 2022), uma vez que estes processos necessitam do desenrolamento da hélice do DNA, o que resulta em tensão helicoidal no resto da molécula (SHOK et al., 2020). Como exemplo disto, as topoisomerasas permitem a liberação de cromossomos replicados antes do particionamento e divisão celular (BUZUN et al., 2020).

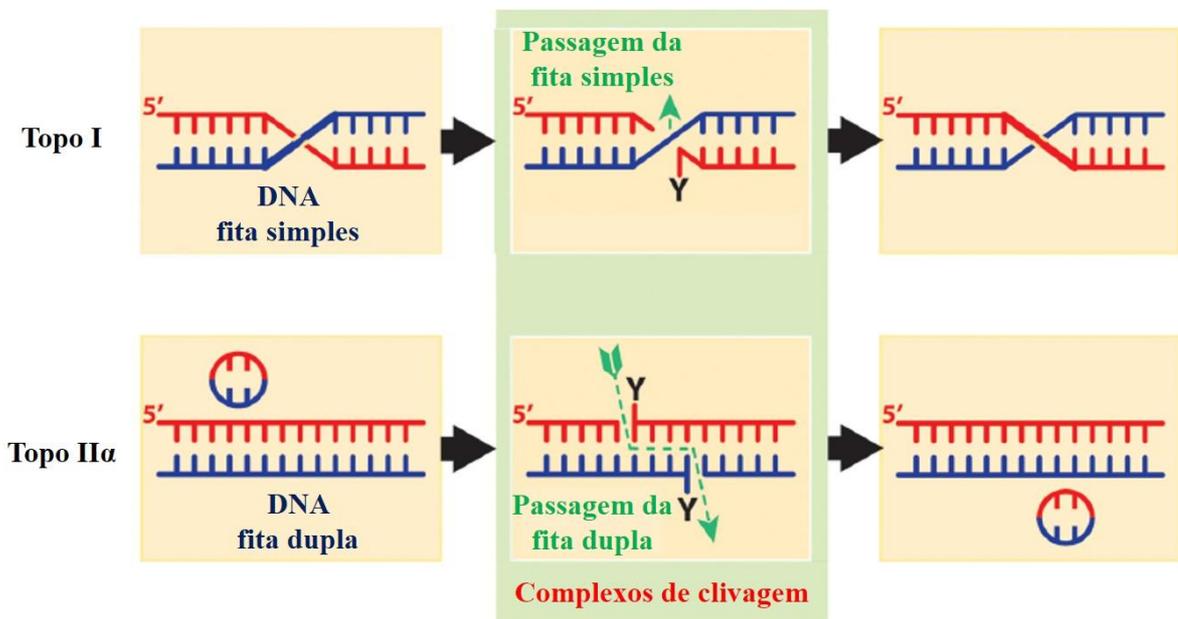
Estas enzimas se ligam covalentemente ao grupo fosfato do DNA, divide a(s) fita(s) de DNA e, finalmente, a(as) religa. As topoisomerasas são geralmente classificadas em tipo I e II (Figura 28), com base em sua função catalítica, mecanismo de reação, sequência de aminoácidos e estrutura. As topoisomerasas do tipo I clivam uma única fita de DNA, enquanto as do tipo II, ambas as fitas (SHINDE et al., 2022) (Figura 29).

Figura 28. Estrutura tridimensional das topoisomerases humanas I (à esquerda) e II α (à direita) complexadas ao DNA (em amarelo).



Fonte: Hevener et al., 2018.

Figura 29. Mecanismos catalíticos diferenciais das enzimas Topo I e Topo II α . As reações são representadas da esquerda para a direita. Ambas as enzimas clivam o DNA ao se conjugarem covalentemente à sua extremidade 5'. A Topo I cliva um segmento da fita simples e permite a outra fita simples passar pela quebra, enquanto a Topo II α cliva ambas as fitas, permitindo a passagem de outra fita dupla pela quebra previamente estabelecida, religando-as em seguida.



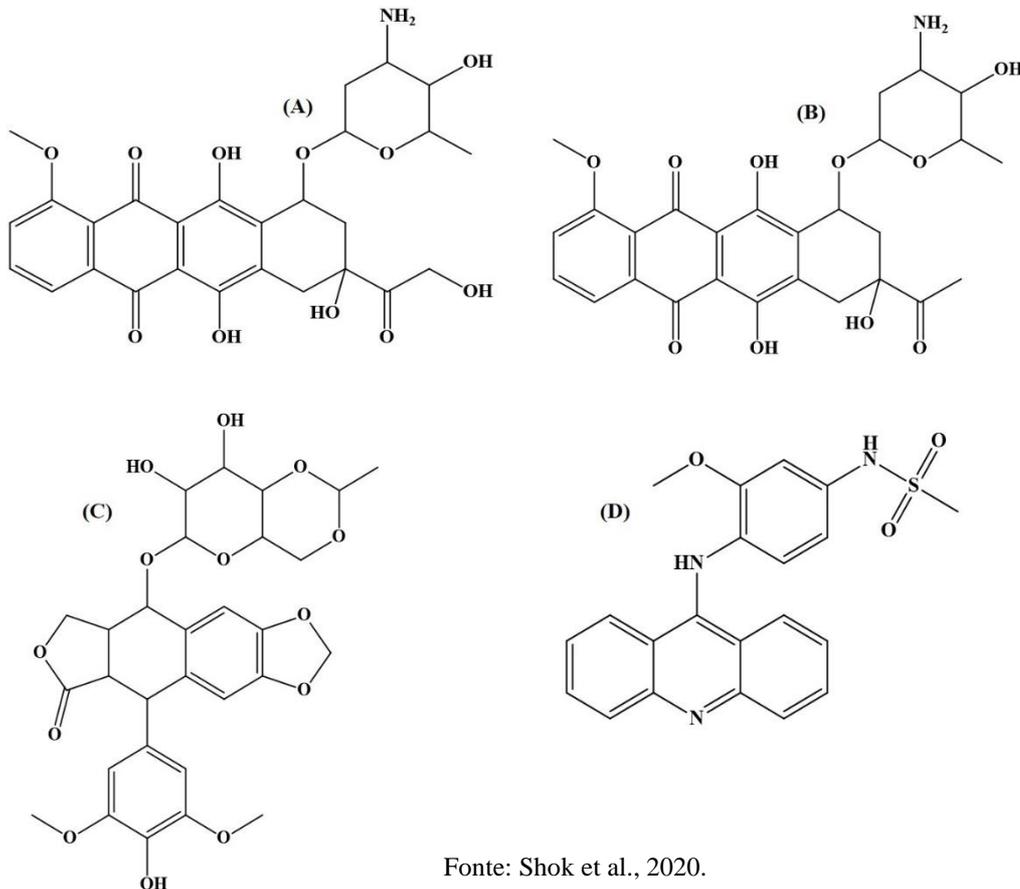
Fonte: Adaptado de Pommier, 2013.

A Topo II é mais importante para a proliferação celular do que a Topo I. Em virtude disto, a primeira tem sido considerada como um alvo melhor no que concerne à concepção de agentes antineoplásicos. Existem duas isoformas de Topo II em células humanas: Topo II α e

Topo II β . A Topo II α é superexpressa em células em proliferação e serve como um biomarcador para a proliferação celular, enquanto a expressão de Topo II β é uniformemente distribuída em todas as células. Portanto, o Topo II α é considerada responsável pelos efeitos antineoplásicos dos inibidores de Topo II (SHOK et al., 2020).

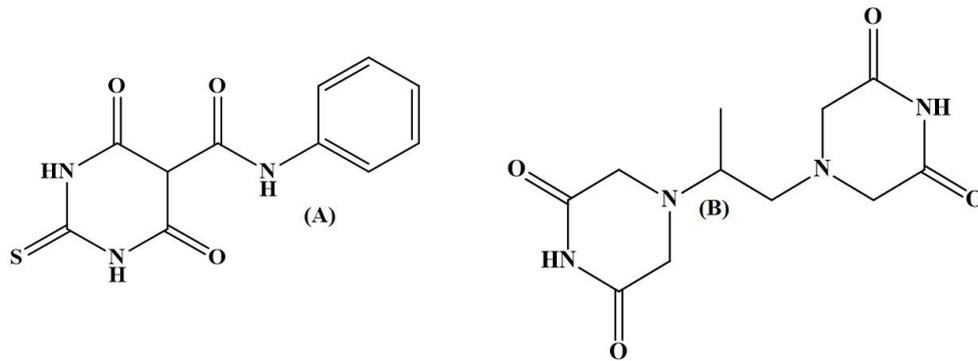
A atividade prolongada da inibição destas enzimas leva a rupturas permanentes nas fitas do DNA, resultando em genotoxicidade e citotoxicidade significativas. Eles são classificados em duas categorias diferentes: Inibidores da topoisomerase de classe I ou venenos interfaciais de topoisomerase, os quais inibem a rotação da cadeia ou religação da reação enzimática e, deste modo, estabilizam os complexos covalentes de topoisomerase-DNA (Figura 30), enquanto que a classe II de inibidores da topoisomerase ou inibidores catalíticos da topoisomerase agem bloqueando dois passos essenciais no ciclo catalítico enzimático: ligação ao substrato ou complexo de clivagem durante a formação da ligação covalente. Outrossim, a literatura tem mostrado que os tipos de inibidores da referida enzima também podem ser intercaladores de DNA ou ligantes de sulcos menores ou ambos (HU et al., 2018; SINGH et al., 2023) (Figura 31).

Figura 30. Estruturas químicas dos fármacos antitumorais Doxorrubicina (A), Daunorrubicina (B), Etoposídeo (C) e Amsacrina (D), classificados como “venenos” Topo II α .



Fonte: Shok et al., 2020.

Figura 31. Estruturas químicas dos fármacos antitumorais Merbarone (A) e Dexrazoxane (B), classificados como “inibidores catalíticos” Topo II α .



Fonte: Shok et al., 2020.

3.5 INTERAÇÕES COM A HSA NOS ESTUDOS DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS

No organismo vivo, moléculas ativas precisam alcançar o alvo terapêutico celular, por isso, o estudo de interação entre os compostos ativos e as proteínas plasmáticas deve ser realizado durante a proposição de novos fármacos para várias doenças, incluindo câncer (FILHO et al., 2019). Portanto, um dos primeiros passos na rota de investigação do mecanismo de ação de fármacos ou protótipos com ação anticâncer no corpo é o estudo de sua ligação à albumina de soro humana (HSA) dada a sua abundância sérica e função no transporte de substâncias endógenas e exógenas (ALSAIF et al., 2020; RIBEIRO et al., 2021).

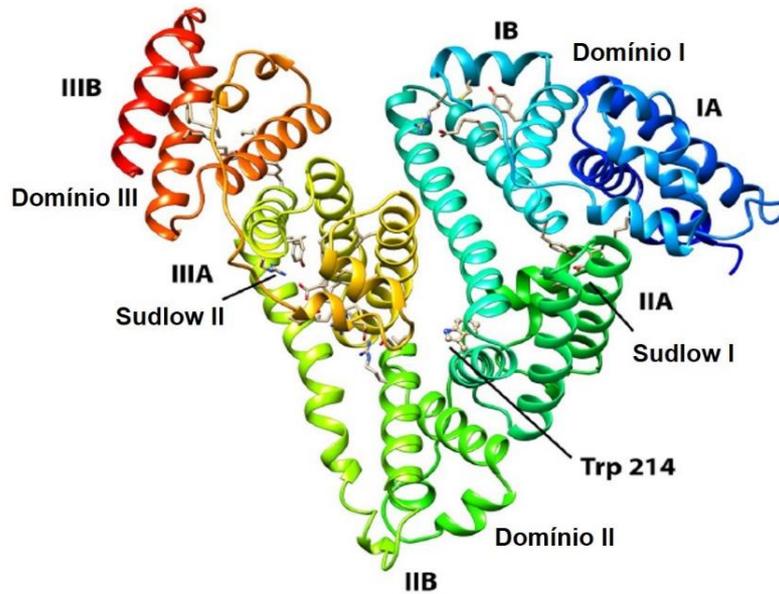
Dessa forma, há um interesse crescente em investigar a interação entre compostos químicos e HSA, devido ao fato desta biomolécula ser a principal proteína plasmática do sangue humano, constituindo cerca de 55-60% de todas as proteínas plasmáticas (equivalente a uma concentração de 42 g/L⁻¹) (RAO et al., 2020), bem como à sua estrutura bioquímica, transporte de medicamentos, metais e ácidos graxos, que se ligam a sítios de ligação específicos (FILHO et al., 2019), mantendo a pressão osmótica do sangue estável (BANERJEE et al., 2020). A interação de ligantes com a HSA ocorre, sobretudo, por meio da formação de complexos não-covalentes em sítios de ligação específicos. Ou seja, a afinidade de ligação de qualquer substância à HSA é um dos principais fatores que determinam a sua distribuição na corrente sanguínea (ERKMEN et al., 2023).

As propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), estabilidade e toxicidade de substâncias químicas são afetadas pelo seu nível de afinidade com a HSA (ALINAGHI et al., 2020; RIBEIRO et al., 2021). Se a interação ocorrer devido a uma baixa afinidade pelo ligante, o passo inicial da farmacocinética (absorção do fármaco)

não é viável. No caso de a interação acontecer mediante uma afinidade moderada pelas substâncias bioativas com a HSA, a absorção e a distribuição de medicamentos a vários tecidos são viáveis. Por outro lado, quando a interação apresenta uma alta afinidade, a absorção do medicamento é viável, mas sua distribuição para os tecidos é limitada devido à estabilidade do complexo, que por sua vez afeta adversamente a farmacocinética do fármaco (ERKMEN et al., 2023). Logo, estudos de interação entre potenciais medicamentos e biomacromoléculas, como a HSA, tem contribuído significativamente para um entendimento preliminar da biodistribuição e disponibilidade de pequenos compostos em fluidos (MOKABERI et al., 2019). Ademais, a interação de fármacos à HSA promove um aumento na meia-vida circulante e distribuição destes ligantes, evitando sua perda rápida na circulação, o que poderia limitar o seu potencial terapêutico (ERKMEN et al., 2023).

Do ponto de vista estrutural, a HSA consiste em 585 aminoácidos e um peso molecular de 65 kDa. Sua sequência de aminoácidos contém 18 resíduos de tirosina (Tyr), 1 resíduo de triptofano (Trp-214), 17 pontes dissulfeto e apenas um tiol livre (resíduo de cisteína - Cys-34). A HSA possui três domínios homólogos (I, II e III) que se agrupam para formar uma molécula em forma de coração. Cada domínio contém dois subdomínios (A e B) (CHAVES et al., 2020). Análises da estrutura cristalina da HSA mostraram que os principais locais de ligação de medicamentos são as bolsas hidrofóbicas situadas nos subdomínios IIA e IIIA, designados como Sudlow I e II, respectivamente (Figura 32). Estudos sobre a interação de medicamentos à HSA pode exercer um impacto significativo na compreensão das características estruturais que definem a atividade terapêutica dos fármacos usados na clínica e no desenho de novos protótipos para diversas atividades farmacológicas, inclusive anticâncer (ALVES et al., 2021b).

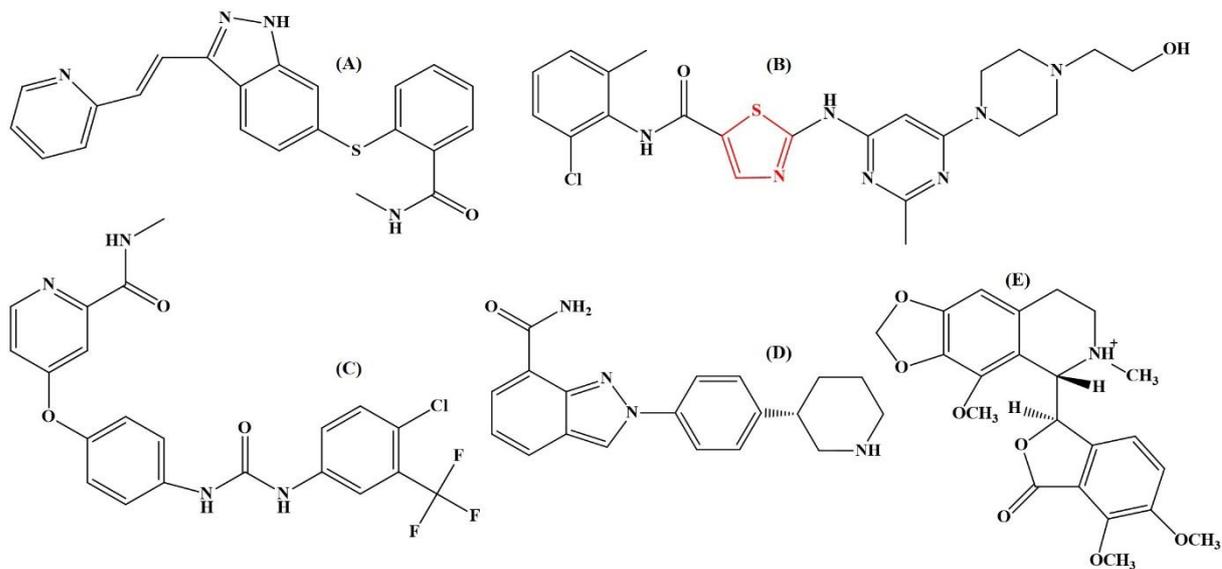
Figura 32. Estrutura tridimensional da HSA, enfatizando os domínios, subdomínios, os sítios de ligação e o único resíduo de triptofano (Trp-214).



Fonte: Adaptado de Marcovic et al., 2018.

Hidrofobicidade e tamanhos moleculares são as propriedades que influenciam no transporte de fármacos. Em particular, a HSA é a transportadora mais abundante e proteína modelo, além de ter a capacidade de se acumular no microambiente tumoral. Normalmente, as células tumorais absorvem uma quantidade maior de moléculas de HSA, em comparação com células normais. Por isso, esta proteína pode ser explorada para formação de um conjugado transportador para uma série de medicamentos que combatem o câncer (RIBEIRO et al., 2021; ERKMEN et al., 2023). Exemplos de fármacos antitumorais utilizados em estudos de interação com a HSA são mostrados na Figura 33, abaixo.

Figura 33. Estruturas químicas dos fármacos antitumorais Axitinibe (A), Dasatinibe (B), Sorafenibe (C), Niraparibe (D) e Noscapine (E), usados em pesquisas de interação com a HSA.



Fontes: Tayyab et al., 2016 (A), Naik & Seetharamappa, 2019 (B), Alsaif et al., 2020 (C), Gan et al., 2018 (D) e Chugh et al., 2019 (E).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. M.; FISAL, S. R.; ORABI, A. S. Novel β -lactam antibiotic derivative and its complexes: DFT, frontier energy levels, DNA interaction, docking, physicochemical and antimicrobial properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1218, 128487, 2020.
- AIPC, 2018. Disponível em <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2023.
- AIPC, 2020. Disponível em <https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=500000&print=0>. Acesso em 10 de janeiro de 2023.
- AIPC, 2023. Disponível em <<https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2023.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA Binders in Clinical Trials and Chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506–4521, 2014.
- ALI, M. S. et al. Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: a multi spectroscopic and molecular modelling study. **RSC Advances**, v. 8, p. 9083–9093, 2018.
- ALINAGHI, M. et al. A Pd(II) complex derived from pyridine-2-carbaldehyde oxime ligand: Synthesis, characterization, DNA and BSA interaction studies and *in vitro* anticancer activity. **Journal of Molecular Structure**, v.1219, 128479, 2020.
- ALJAMALI, N. M. et al. Review on chemical-biological applications of thiazole derivatives. **Forefront Journal of Engineering & Technology**, v. 2, p. 9-22, 2020.
- 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.
- 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. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 13023–13042, 2015.
- ALSAIF, N. et al. Multi-spectroscopic investigation, molecular docking and molecular dynamic simulation of competitive interactions between flavonoids (quercetin and rutin) and sorafenib for binding to human serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, Part B, p. 2451-2461, 2020.
- ALTMANN, K. H. Epothilone B and its analogs – a new family of anticancer agents, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v .3, n. 2, p. 149-158, 2003.

ALTURIQI, A. S. et al. Synthesis, structural identification, DNA interaction and biological studies of divalent metal(II) chelates of 1,2- ethenediamine Schiff base ligand. **Journal of Molecular Structure**, v. 1219, 128542, 2020.

ALVES, J. E. F. Estudos de Interação com o DNA e a albumina sérica bovina de novos derivados indol-tiazólicos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, p. 149, 2019.

ALVES, J. E. F. et al. Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 622–635, 2021.

ALVES, J.E.F. et al. A simple method for obtaining human albumin and its use for *in vitro* interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 126–137, 2021.

ANSARI, A. et al. Facile one-pot multicomponent synthesis and molecular docking studies of steroidal oxazole/thiazole derivatives with effective antimicrobial, antibiofilm and hemolytic properties. **Steroids**, v. 134, p. 22-36, 2018.

ANSARI, M. et al. New thiazole-2(3H)-thiones containing 4-(3,4,5-trimethoxyphenyl) moiety as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 185, 111784, 2020.

AQLAN, F. M. et al. Thiazolidinone: A structural motif of great synthetic and biological importance. **Journal of Molecular Structure**, v. 1250, 131771, 2022.

ASEMAN, M. D. et al. Cycloplatinated (II) Derivatives of Mercaptopurine Capable of Binding Interactions with HSA/DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 58, p. 16154–16170, 2019.

ASMY, H. A. E.; BUTLER, I. S.; MOSTAFA, S. I. DNA Interaction and Anticancer Evaluation of New Adenine Complexes in Presence of N,N-Donors as Secondary Chelate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1223, 128976, 2020.

BANERJEE, A. et al. Synthesis, structure and characterization of new dithiocarbazate based mixed ligand oxidovanadium(IV) complexes: DNA/HSA interaction, cytotoxic activity and DFT studies. **New Journal of Chemistry**, v. 44, p. 10946-10963, 2020.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BAS, H. et al. Synthesis, DNA interaction, topoisomerase I, II inhibitory and cytotoxic effects of water soluble silicon (IV) phthalocyanine and naphthalocyanines bearing 1- acetylpiperazine units. **Dyes and Pigments**, v. 160, p. 136–144, 2018.

BOUSSIOS, S. et al. BRCA Mutations in Ovarian and Prostate Cancer: Bench to Bedside. **Cancers**, v. 14, 3888, 2022.

BUZUN, K. et al. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1781-1799, 2020.

CANOVIC, P. et al. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium (II) complexes: synthesis, structure, DNA / protein binding, lipophilicity and anticancer activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 1007–1028, 2017.

CHAVES, O. A. et al. Biological assays of BF₂-naphthyridine compounds: Tyrosinase and acetylcholinesterase activity, CT-DNA and HSA binding property evaluations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 1114–1129, 2020.

CHUGH, H. et al. Interaction of noscapine with human serum albumin (HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, v. 372, p. 168–176, 2019.

CILIBRIZZI, A. et al. iVS analysis to evaluate the impact of scaffold diversity in the binding to cellular targets relevant in cancer. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 44-50, 2019.

DE SOUZA, M. V. N. Synthesis and biological activity of natural thiazoles: An important class of heterocyclic compounds. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 26, p. 429-449, 2005.

DHIMAN, A. SHARMA, R. SINGH, R. K. Target-based anticancer indole derivatives and insight into structure–activity relationship: A mechanistic review update (2018-2021). **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12 (7), p. 3006-3027, 2022.

DONG, J. et al. Synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface analysis, DNA binding, DNA cleavage activity and molecular docking of a new Schiff base nickel(II) complex. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020 DOI: 10.1080/07391102.2020.1784789.

DRUGBANK. Disponível em <<https://go.drugbank.com/>>. Acesso em 22 de novembro de 2020.

EFFERTH, T. et al. Collateral sensitivity of natural products in drug-resistant cancer cells. **Biotechnology Advances**, v. 38, 107342, 2020.

ELDEHNA, W. M. et al. Synthesis and biological evaluation of certain hydrazonoindolin-2-one derivatives as new potent anti-proliferative agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 867-878, 2018.

ERKMEN, C. et al. Exploring molecular interaction of cefpirome with human serum albumin: In vitro and in silico approaches. **Journal of Molecular Structure**, v. 1275, 134723, 2023.

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

FINIUK, N. Novel hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 238, 114422, 2022.

FRANCHETTI, P. et al. Furanfuran and Thiophenfurin: Two Novel Tiazofuran Analogues. Synthesis, Structure, Antitumor Activity, and Interactions with Inosine Monophosphate Dehydrogenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 3829-3837, 1995.

GAN, N. et al. Determination of interactions between human serum albumin and niraparib through multi-spectroscopic and computational methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 126–134, 2018.

GOMHA, S. M. et al. Synthesis, Molecular Docking Study, and Cytotoxic Activity against MCF Cells of New Thiazole–Thiophene Scaffolds. **Molecules**, v. 27, 2022.

GYAMFI, J.; KIM, J.; CHOI, J. Cancer as a Metabolic Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 1155, 2022.

HAIDER, K. A comprehensive review on pyrazoline based heterocyclic hybrids as potent anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 5, 100042, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12 (1), p. 31–46, 2022.

HOLLAND, D. C.; KIEFEL, M. J.; CARROLL, A. R. Structure Revisions of the Sponge-Derived Dibrominated Bis-indole Alkaloids, Echin sulfone A and the Echin sulfonic Acids A to D. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 85, p. 3490–3496, 2020.

HOLOTA, S. et al. Synthesis of 5-enamine-4-thiazolidinone derivatives with trypanocidal and anticancer activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 126–136, 2019.

HU, W. et al. Discovery of Novel Topoisomerase II Inhibitors by Medicinal Chemistry Approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 8947–8980, 2018.

INCA, 2022. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acesso em 12 de janeiro de 2023.

INCA, 2023. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2023.

JASIEWICZ, B. et al. Synthesis, antioxidant and cytoprotective activity evaluation of C-3 substituted indole derivatives. **Nature Scientific Reports**, v. 11, 15425, 2021.

JASIEWICZ, B. et al. Indole Derivatives Bearing Imidazole, Benzothiazole-2-Thione or Benzoxazole-2-Thione Moieties-Synthesis, Structure and Evaluation of Their Cytoprotective, Antioxidant, Antibacterial and Fungicidal Activities. **Molecules**, v. 28, 708, 2023.

JIA, Y. et al. Current scenario of indole derivatives with potential anti-drug resistant cancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 200, 112359, 2020.

KAMEL, M. M. et al. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 572–580, 2010.

KARADAYI, F. Z. et al. Design, synthesis and anticancer/antiestrogenic activities of novel indole-benzimidazoles. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, 103929, 2020.

KARALI, N.; TERZIOGLU, N.; GÜRSOY, A. Synthesis and Primary Cytotoxicity Evaluation of New 5-Bromo-3-substituted-hydrazono-1*H*-2-indolinones. **Arch Pharm Chemistry in Life Sciences**, v. 335, p. 374-380, 2002.

KAHRIMAN, N. et al. Diastereoselective Synthesis, Characterization, Investigation of Anticancer, Antibacterial Activities, In Silico Approaches and DNA/BSA Binding Affinities of Novel Pyrimidine-Sugar Derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1277, 134821, 2023.

KONUS, M. et al. Synthesis and biological activity of new indole based derivatives as potent anticancer, antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, 133168, 2022.

KOSMALSKI, T. et al. The Oxime Ethers with Heterocyclic, Alicyclic and Aromatic Moiety as Potential Anti-Cancer Agents. **Molecules**, v. 27, 1374, 2022.

LABIB, M. B. et al. Azole-hydrazone derivatives: Design, synthesis, in vitro biological evaluation, dual EGFR / HER2 inhibitory activity, cell cycle analysis and molecular docking study as anticancer agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 67–80, 2018.

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**, v. 136, p. 511–522, 2017.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 15035–15050, 2013.

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

LAN, H. et al. Synthesis, Biological Evaluation, DNA Binding, and Molecular Docking of Hybrid 4,6-Dihydrazone Pyrimidine Derivatives as Antitumor Agents. **Molecules**, v. 28, 187, 2023.

LI, X. et al. Characterization of Dasatinib and Its Structural Analogs as CYP3A4 Mechanism-Based Inactivators and the Proposed Bioactivation Pathways. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 6, p. 1242–1250, 2009.

LIANG, X. et al. A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 129-168, 2019.

LUETHI, D. LIECHTI, M.E. Designer drugs: mechanism of action and adverse effects. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1085–1133, 2020.

LIOLI, E. et al. Synthesis, characterization, DNA binding and cytotoxicity studies of two novel Cu(II)-2-(2'-pyridyl) quinoxaline complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 208, 111077, 2020.

LIU, K.; DING Y.; KANG, C. Synthesis and antiproliferative activity of new *n*-acylhydrazone derivatives containing benzothiazole and indole based moiety. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 4, 2020.

LOFTY, G. et al. Synthesis of new spirooxindole-pyrrolothiazoles derivatives: Anti-cancer activity and molecular docking. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1514-1523, 2017.

MANJAL, S. K. et al. Synthetic and Medicinal Perspective of Thiazolidinones : A Review. **Bioorganic Chemistry**, 2017.

MARKOVIC, O. S. et al. Human serum albumin binding of certain antimalarials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 128–139, 2018.

MCGHEE, J. D.; HIPPEL, P. H. VON. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions : Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, n. 2, p. 469–489, 1974.

MIRZAEI-KALAR, Z. In vitro binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 101–109, 2018.

MISHRA, C. B. et al. Thiazole: A promising heterocycle for the development of potent CNS active agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 1-34, 2015.

MOGHADAM, N. H. et al. In vitro cytotoxicity and DNA/HSA interaction study of triamterene using molecular modelling and multi-spectroscopic methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, 2019.

MOHAMMED, Y. H. E. et al. The Novel 4-Phenyl-2-Phenoxyacetamide Thiazoles modulates the tumor hypoxia leading to the crackdown of neoangiogenesis and evoking the cell death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1826–1839, 2018.

MUHAMMAD, N. et al. The Role of Natural Products and Their Multitargeted Approach to Treat Solid Cancer. **Cells**, v. 11, 2209, 2022.

MOKABERI, P. et al. New insights into the binding behavior of lomefloxacin and human hemoglobin using biophysical techniques: binary and ternary approaches. **New Journal of Chemistry**, v. 43, 8132, 2019.

NAIK, R.; SEETHARAMAPPA, J. Spectral and computational attributes: Binding of a potente anticancer agent, dasatinib to a transport protein. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, 111492, 2019.

NILAND, S.; RISCANEVO, A.X.; EBLE, J.A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 146, 2022.

O'DEA, A. et al. A series of indole-thiazole derivatives act as GPER agonists and inhibit breast cancer cell growth. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 9, p. 901–906, 2018.

OLIVEIRA, J. F. DE et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 388–392, 2016.

OLIVEIRA, J. F. DE 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. DE 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.

OMS (Organização Mundial da Saúde), 2023a. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-cancer-setting-priorities-investing-wisely-and-providing-care-for-all>>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

OMS (Organização Mundial da Saúde), 2023b. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.

PARRINO, B. et al. 3-[4-(1H-Indol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridines, Nortopsentin Analogues with Antiproliferative Activity. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1901–1924, 2015.

PARVEEN, M. et al. Structure elucidation and DNA binding specificity of natural compounds from *Cassia siamea* leaves: A biophysical approach. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 159, p. 218–228, 2016.

PAWAR, S.; OTTOOR, D. Spectroscopic and molecular docking study to understand the binding interaction of rosiglitazone with bovine serum albumin in presence of valsartan. **Journal of Luminescence**, v. 197, p. 200–210, 2018.

PEREIRA, P. S. et al. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3797–3804, 2019.

POMMIER, Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. **ACS Chemical Biology**, v. 8, p. 82–95, 2013.

POMMIER, Y. et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, p. 703–721, 2016.

PUBCHEM. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 22 de janeiro de 2023.

QAIS, F. A.; AHMAD, I. In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 193–205, 2018.

QUEIROZ, C. M. et al. Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, 2050–2065, 2020.

RAHMAN, Y. et al. Unravelling the interaction of pirenzepine, a gastrointestinal disorder drug, with calf thymus DNA: An in vitro and molecular modelling study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 625–626, p. 1–12, 2017.

RAMSHID, P. K. et al. Synthesis and In Vitro Evaluation of Some Isatin-Thiazolidinone Hybrid Analogues as Anti-Proliferative Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 306–312, 2010.

RAO, H. et al. Mechanistic and conformational studies on the interaction of human serum albumin with rhodamine B by NMR, spectroscopic and molecular modeling methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 316, 113889, 2020.

RASHID, M. A. et al. Patellamide F, a new cytotoxic cyclic peptide from the colonial ascidian *Lissoclinum pattela*. **Journal of Natural Product**, v. 58, n. 4, p. 594–597, 1995.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49–60, 2015.

RESCIFINA, A. 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.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 111592, 2019.

RIBEIRO, A. G. et al. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Medicinal Chemistry Research**, v. 30, p. 1469–1495, 2021.

ROSALES, P. F. et al. Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity *in silico* and molecular modelling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 66–74, 2019.

ROSZCZENKO, P. et al. 4-Thiazolidinone-Bearing Hybrid Molecules in Anticancer Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 13135, 2022.

SABRY, M. A. New thiazole-based derivatives as EGFR/HER2 and DHFR inhibitors: Synthesis, molecular modeling simulations and anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 241, 114661, 2022.

SAINI, D.; GUPTA, M. Hydrazones as potential anticancer agents: An update. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 116–122, 2018.

SANI, F. D. et al. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of Luminescence**, v. 203, p. 599–608, 2018.

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of antihypertensive drug; methyldopa with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, n. 10, p. 338–347, 2014.

SHAHABADI, N.; MAHDAVI, M.; MOMENI, B. Z. Multispectroscopic analysis, atomic force microscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of the interaction between [SnMe₂Cl₂(Me₂phen)] complex and ct-DNA in the presence of glucose. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020 DOI:10.1080/07391102.2020.1784793.

SHARMA, P. C. et al. Thiazole-containing compounds as therapeutic targets for cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 188, 112016, 2020.

SHINDE, Y. et al. Keto-enol tautomerism of hydroxynaphthoquinoneoxime ligands: Copper complexes and topoisomerase inhibition activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1262, 133081, 2022.

SHOK, Z. et al. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 884–904, 2020.

SILVA, L. M. M. G. et al. New 1, 3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 20–29, 2018.

SILVA, P. R. et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of *in vitro* leishmanicidal activity and ultrastructural studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, 108899, 2020.

SINGH, V. et al. Recent development of multi-targeted inhibitors of human topoisomerase II enzyme as potent cancer therapeutics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 473–484, 2023.

SINGH, I.; LUXAMI, V; PAUL, K. Synthesis, cytotoxicity, pharmacokinetic profile, binding with DNA and BSA of new imidazo[1,2-a]pyrazine-benzo[d]imidazol-5-yl hybrids. **Scientific Reports**, v. 10, n. 6534, 2020.

SONG, F. et al. Indole/isatin - containing hybrids as potential antibacterial agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, 2000143, 2020.

SOUZA-MELO, W. O. et al. Phytochemistry, antifungal and antioxidant activity, and cytotoxicity of byrsonima gardneriana (A. Juss) extract. **Archives of Oral Biology**, v. 123, 104994, 2021.

TAYYAB, S. et al. Binding of an anticancer drug, axitinib to human serum albumin: Fluorescence quenching and molecular docking study. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 162, p. 386–394, 2016.

THANIKACHALAM, P. V. et al. An insight into the medicinal perspective of synthetic analogs of indole: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 562-612, 2019.

TIAN, Z. et al. Study on the interaction between cannabiniol and DNA using acridine orange as a fluorescence probe. **Journal of Molecular Recognition**, p. 1–7, 2017.

TURE, A. et al. Design, synthesis, and anticancer activity of novel 4-thiazolidinone-phenylaminopyrimidine hybrids. **Molecular Diversity**, 2020 <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10087-1>.

YAO, Y. et al. 5-FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA-MB-453 triple-negative breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 7, p. 541-547, 2014.

ZHENG, H. et al. Investigating the interaction between DNA-templated gold nanoclusters and HSA by spectroscopy. **New Journal of Chemistry**, v. 44, p. 14060-14066, 2020.

CAPÍTULO II

4 DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COMO LIGANTES AOS SULCOS DO DNA

Parte dos resultados descritos neste capítulo foram publicados em 2021, no periódico International Journal of Biological Macromolecules (Anexo C).

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1



ISSN: 0141-8130

International Journal of Biological
Macromolecules

Título do artigo: Derivados Indol-Tiazóis e Indol-Tiazolidinonas como ligantes aos sulcos do DNA

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.153>

Josival Emanuel Ferreira Alves^a, Jamerson Ferreira de Oliveira^b, Tulio Ricardo Couto de Lima Souza^c, Ricardo Olímpio de Moura^d, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^a, Maria do Carmo Alves de Lima^e, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{a,f,*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Brasil

^bUniversidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), 62790-970 Redenção, CE, Brasil

^cUnidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE 56909-535, Brasil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba e Bodocongó, Campina Grande, PB 58429-500, Brasil

^eLaboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Brasil

^fLaboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE 55290-000, Brasil

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo e a quimioterapia continua sendo a abordagem terapêutica mais utilizada atualmente. O DNA é considerado um dos alvos promissores de moléculas com potencial atividade anticâncer, devido ao seu papel indispensável na multiplicação intensa das células tumorais. Na análise da interação com o ctDNA por absorção UV-vis, foram usadas as sondas intercalativas Brometo de Etídio (BE) e Laranja de Acridina (LA) e a sonda ligante no sulco menor 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI). Foi constatado que os derivados apresentaram valores da constante de afinidade (K_b) semelhantes e/ou maiores aos valores apresentados pelo DAPI. No ensaio de emissão fluorescente apenas a LA e o DAPI foram usados. Os valores encontrados da constante de supressão fluorescente (K_{sv}) situaram-se entre $0,24 \times 10^4$ e $6,29 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ no teste com LA e entre $0,60 \times 10^4$ e $7,59 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ no ensaio com DAPI. A técnica de ancoramento molecular corroborou a preferência dos derivados JFs em interagirem no sulco menor do DNA. Esses resultados provaram que os compostos interagem com o ctDNA via ligação do sulco, o que foi confirmado pelo ensaio de sequência de oligonucleotídeos ricos em A-T com o composto JF-252, sugerindo a importância do anel fenil acoplado ao C-4 do núcleo tiazol C-4 e do núcleo indol não-substituído com bromo.

Palavras-chave: DNA, Indol, Interação, Sondas, Tiazol, Tiazolidinona.

INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucléico (DNA) contém todas as informações necessárias para especificar o desenvolvimento biológico de todos os corpos vivos. Ele controla a informação hereditária transferida para a prole durante a reprodução quando o DNA é replicado e transmitido. Nesse processo, a sequência dos pares de bases de DNA define os caracteres dos indivíduos, desde características físicas até a suscetibilidade a doenças. Isso pode ser útil para entender o mecanismo de muitas doenças. É também uma biomolécula utilizada no desenvolvimento de novas estratégias quimioterapêuticas (VENMATHY et al., 2018), especialmente para aqueles conhecidos como pequenas moléculas que visam o DNA devido à acessibilidade para alguma sequência do genoma (RAHMAN et al., 2017). O arranjo espacial de pares de bases leva à formação de sulcos maiores e menores no DNA. O sulco maior

fornece acesso fácil para moléculas volumosas. No entanto, o sulco menor tem a vantagem de estar geralmente desocupado, o que o torna susceptível a ataques de pequenas moléculas de fármacos e candidatos a fármacos. Por esta razão, muitos desses ligantes são relatados como ligantes dos sulcos menores (KHAN et al., 2012).

Pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas ligam-se ao DNA e influenciam numerosos processos biológicos, como transcrição e replicação (RESCIFINA et al., 2014; ALMEIDA., 2017). Assim, pequenas moléculas podem modificar, inibir ou ativar o funcionamento do DNA, atuando como uma abordagem terapêutica para o tratamento e prevenção de doenças (FROEHLICH et al., 2011). Extensos estudos químicos e bioquímicos caracterizaram uma variedade de moléculas que interagem com o DNA, sendo classificadas como agentes antibióticos, antitumorais, antivirais ou antiprotozoários (ALEKSIC et al., 2014). Portanto, é importante investigar a interação entre fármacos ou protótipos com o DNA para entender seu mecanismo de ação a nível molecular (GUPTA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019).

Os heterocíclicos são compostos altamente versáteis com amplas atividades, e incluem em suas estruturas os anéis indol, tiazol e tiazolidinona. Compostos com esses núcleos interagem com o DNA e alteram sua estrutura, função e estabilidade. Como resultado, vários processos celulares importantes são prejudicados devido à inibição de enzimas envolvidas no metabolismo do DNA, como as topoisomerasas, por exemplo (ALMEIDA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019). Além disso, novos compostos têm sido sintetizados para investigar o potencial farmacológico de derivados com os núcleos tiazol, indol e tiazolidinona na tentativa de descobrir estruturas químicas com melhor atividade antitumoral (O'DEA et al., 2018; DOUADI et al., 2020).

Uma característica que pode potencializar a atividade biológica de novos compostos é a presença dos halogênios mais pesados (Cl, Br e I), o que reforça sua importância na química medicinal, uma vez que esses elementos contribuem para suas propriedades, incluindo reatividade, lipofilicidade e eletronegatividade (GUTIÉRREZ et al., 2016; HO et al., 2017). A aplicabilidade desses átomos no projeto de novos fármacos tem sido estudada (HERNANDES et al., 2010) e ainda há muito a explorar (CAVALLO et al., 2016). Por exemplo, o uso extensivo de bromo no desenvolvimento de novos medicamentos para alcançar várias atividades farmacológicas, como a ação antineoplásica (LI et al., 2018).

Alguns trabalhos avaliaram a atividade biológica de derivados indólicos substituídos e não-substituídos com bromo com diferentes anéis de tiazolidina ou imidazolidina como cadeias laterais (LAFAYETTE et al., 2017) ou apresentando tiossemicarbazona e 4-

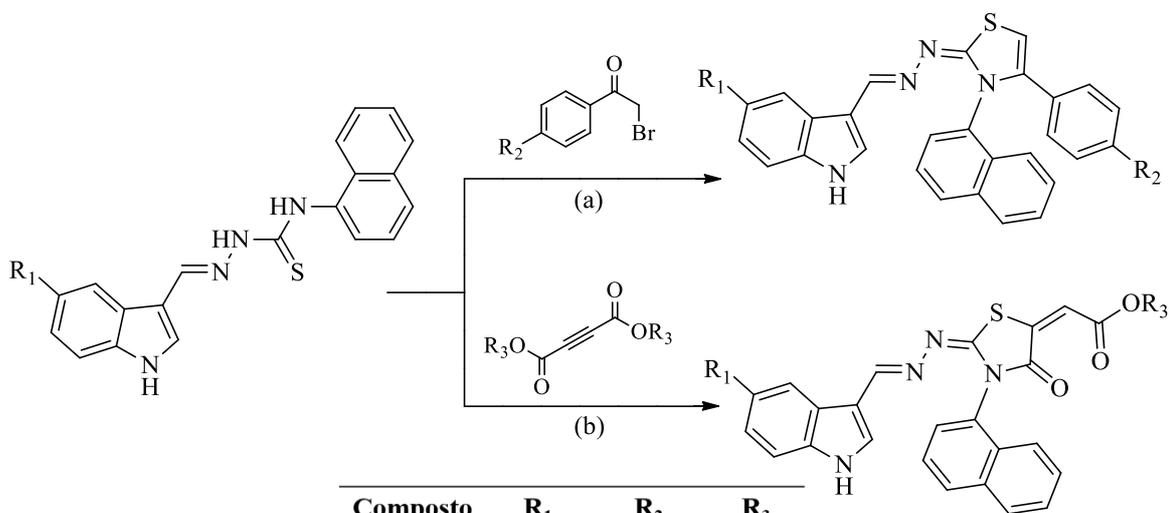
tiazolidinonas como unidade de ligação para diferentes substituintes laterais. Dados da análise de citotoxicidade e interação com o DNA indicam o indol não substituído como melhor para ambas as atividades. Um dos derivados mais promissores apresentados, além do indol, possuía o naftaleno como grupo lateral, (E)-2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(naftalen-1-il) hidrazinacarbotoamida, com atividade antiproliferativa contra células de adenocarcinoma colorretal (HT-29) e leucemia (K562) (OLIVEIRA et al., 2017). Para investigar melhor o papel do bromo como substituinte no anel indol, bem como a interferência do naftaleno ou contribuição para o processo de interação do DNA, propusemos a síntese de diferentes tipos de indol substituídos e não-substituído com bromo, com tiazol e tiazolidinona com anel naftaleno, além de substituintes laterais com grupos fenil ou éster. O grupo éster foi escolhido devido à possibilidade de ser um forte aceitador de ligações de hidrogênio ($>C=O$), contribuindo para a capacidade de formação de ligações de hidrogênio dos novos derivados durante sua interação com o DNA, em seu sulco menor (PANDYA et al., 2010).

Os novos derivados indol-tiazóis e indol-tiazolidinonas foram sintetizados e caracterizados por Alves (2019), o qual utilizou técnicas *in vitro* espectroscópicas de Absorção UV-vis, Emissão Fluorescente com uso da sonda fluorescente Brometo de Etídio (BE), Dicroísmo Circular e a técnica hidrodinâmica de Viscosidade, cujos resultados indicaram que os derivados são ligantes nos sulcos do DNA. Aqui neste trabalho os JFs foram testados com técnicas *in silico* e *in vitro*, a fim de corroborar seu modo de interação ao DNA, usando diversas sondas fluorescentes: BE, DAPI e LA (Laranja de Acridina). Por fim, o melhor derivado (JF-252) foi avaliado em um ensaio com oligonucleotídeo rico em sequências A-T, confirmando os novos derivados indólicos como ligantes dos sulcos do DNA.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS-TESTE, INSUMOS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e métodos utilizados na síntese e caracterização dos oito derivados indol-tiazólicos (JFs 251, 252, 255 e 256) e indol-tiazolidinonas (JFs 249, 250, 253 e 254) utilizados neste trabalho, bem como as etapas de obtenção dos referidos compostos foram descritos durante o mestrado (ALVES, 2019). As respectivas estruturas químicas, características físico-químicas e rendimentos apresentados a seguir podem ser visualizados a partir do esquema 1 e da Tabela 1, a seguir.

Esquema 1. Diagrama de síntese dos derivados indol-tiazólicos (a) e indol-tiazolidinonas (b).

Composto	R ₁	R ₂	R ₃
JF-249	H	-	Metil
JF-250	H	-	Etil
JF-251	H	Br	-
JF-252	H	H	-
JF-253	Br	-	Metil
JF-254	Br	-	Etil
JF-255	Br	Br	-
JF-256	Br	H	-

Fonte: Adaptado de Alves, 2019.

Tabela 1. Características físico-químicas e rendimentos dos derivados indol-tiazólicos (JFs 251, 252, 255 e 256) e indol-tiazolidinonas (JFs 249, 250, 253 e 254).

Composto	Rend. (%)	PF °C	Aspecto	Rf / Eluente
JF-249	65%	249-251	Sólido amarelo	0,63 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
JF-250	84%	261-263	Sólido amarelo	0,59 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
JF-251	72%	249-250	Sólido amarelo	0,64 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
JF-252	95%	264-265	Sólido marrom claro	0,41 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 6:4)
JF-253	85%	238	Sólido laranja	0,50 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 6:4)
JF-254	88%	232-233	Sólido amarelo	0,60 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
JF-255	60%	285-286	Sólido verde claro	0,47 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 6:4)
JF-256	60%	297	Sólido verde claro	0,55 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 6:4)

Fonte: Alves, 2019.

O DNA de timo bovino (ctDNA), o Brometo de Etídeo (BE), a Laranja de Acridina (LA), o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), a enzima Topoisomerase II α e o plasmídeo pUC19 foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O oligonucleotídeo 5'-d (CCTAATTAGG) foi adquirido da Invitrogen (Waltham, MA, EUA).

Os espectros UV-vis foram adquiridos a partir do Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO e do Espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Waltham, MA, Estados Unidos). Os espectros de emissão fluorescente foram obtidos a partir do Espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão).

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CTDNA

O insumo ctDNA foi dissolvido em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) e deixado durante 24 h, à temperatura de 8 °C, para sua estabilização. Após este período, a solução foi sonicada durante 30 minutos e sua concentração determinada utilizando o coeficiente de extinção molar 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987). A razão dos valores de absorvância em 260 e 280 nm foi utilizada para verificar o grau de pureza da solução do ctDNA. Após o preparo da solução, esta foi armazenada em refrigeração, a uma temperatura de -20 °C, com o propósito de ser reutilizada posteriormente. As soluções-teste usadas nestes experimentos foram preparadas nas mesmas condições de tamponamento supracitadas, em duplicata.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS COM O CTDNA E SONDAS FLUORESCENTES

As soluções-estoque das sondas BE, LA, DAPI e do ctDNA foram preparadas a uma concentração de 1 mM. No preparo das soluções estoque dos compostos-teste foi usado DMSO como solvente e, posteriormente, foram diluídas numa razão molar de 1:4 em tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,6). Os experimentos foram feitos em duplicata. A concentração das sondas foi fixada em 25 μ M, as quais foram expostas a quantidades crescentes de ctDNA nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ M. As soluções-teste contendo as sondas e o ctDNA foram homogeneizadas e deixadas em repouso, à temperatura ambiente por 10 minutos para estabilização no sistema tamponado e, em seguida, submetidas a análise absorvativa. Após a análise, os valores encontrados foram comparados com os resultados obtidos do derivado destaque do trabalho de Alves (2019), o JF-252.

As amostras foram analisadas no espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO, utilizando uma cubeta de quartzo retangular com comprimento de 1 cm óptico de percurso. Nesta análise da interação das sondas com o ctDNA, os espectros de absorbância foram registrados por varredura na faixa de comprimento de onda entre 200-600 nm. Alterações nos picos máximos absorptivos ($\lambda_{\text{máx}}$) verificados nos espectros gerados pelas sondas livres e ligadas ao ctDNA foram também analisadas.

A partir dos dados espectroscópicos, foram calculados os valores relativos às constantes de ligação, revelando uma maior ou menor afinidade da biomolécula pela respectiva sonda. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida através da equação de (MCGHEE; HIPPEL, 1974):

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

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

onde ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da $[\text{Sondas}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{Sondas}]$ e $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ 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. Os percentuais relativos aos efeitos hipocrômico ou hiperocrômico observados foram calculados a partir de uma relação entre os valores dos picos máximos absorptivos das sondas livres e ligadas ao ctDNA obtida em função da maior concentração utilizada no experimento. Os coeficientes de correlação (R^2) foram obtidos a partir do gráfico de regressão da $[\text{Sondas}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{Sondas}]$.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS COM OLIGONUCLEOTÍDEOS E O DERIVADO JF-252

Um oligonucleotídeo de sequência rica em bases A-T, 5'-d(CCTAATTAGG), foi usado para comprovar a complexação e especificidade de sequência de ligação existente entre o derivado JF-252 ao ctDNA. Neste ensaio, a solução-estoque do oligonucleotídeo foi fixada numa concentração de 5 μM e exposta a uma concentração de 50 μM do composto JF-252, cujo complexo resultante foi submetido à análise espectrofotométrica. O DAPI foi usado na mesma concentração do JF-252, como controle positivo. As soluções foram homogeneizadas e deixadas por 10 minutos a 25 °C para estabilizar o oligonucleotídeo e o ligante em tampão

Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6). Posteriormente, eles foram submetidos à absorção de UV-vis, numa faixa de 200 a 400 nm, no Espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Waltham, MA, Estados Unidos). O processo de ligação foi monitorado a partir da análise da absorbância em 260 nm. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO FLUORESCENTE COM SONDAS FLUORESCENTES E O CTDNA

Inicialmente, as emissões fluorescentes de LA e DAPI foram analisadas na ausência e na presença de ctDNA. A concentração das sondas foi fixada em 3 µM e do ctDNA em 30 µM. Após 10 minutos de incubação, a 25 °C, as medições foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de 1 cm de percurso, no espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão). Os espectros de fluorescência gerados a partir da interação dos JF's com o complexo LA-ctDNA foram obtidos usando um comprimento de onda de excitação de 480 nm. A varredura do perfil emissivo foi realizada numa faixa de 500 a 600 nm.

Concernente aos espectros de fluorescência gerados através da interação dos JF's com o complexo DAPI-ctDNA, o comprimento de onda de excitação usado foi de 364 nm e a varredura da emissão de 400 a 600 nm. As soluções que continham os complexos LA-ctDNA e DAPI-ctDNA foram analisadas na presença de concentrações variadas dos derivados (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 µM), em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6). Os ensaios foram realizados em duplicata. As soluções foram homogeneizadas e deixadas para estabilizar por 10 minutos no sistema tamponado e, posteriormente, submetidas a análise de fluorescência. O comportamento de supressão de emissão foi analisado usando a equação de Stern-Volmer (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006):

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

onde F₀ e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença dos derivados. K_{sv} é a constante de supressão linear. [Q] representa a concentração do composto. O gráfico da intensidade emissão relativa (F₀/F) versus [Q] foi utilizado para obtenção da constante com base na regressão linear do gráfico. Os dados de ligação foram obtidos a partir do software de SigmaPlot 10.0. As alterações nos picos máximos emissivos (λ_{máx}) verificados nos espectros gerados pelos complexos LA-ctDNA ou DAPI-ctDNA livres e ligados aos

derivados JFs foram também analisadas. Os percentuais relativos ao efeito hipocrômico observado foram calculados a partir de uma relação entre os valores dos picos máximos emissivos dos complexos LA-ctDNA e DAPI-ctDNA livres e ligados ao ctDNA obtida em função da maior concentração utilizada no experimento.

ESTUDOS *IN SILICO* DE ACOPLAMENTO MOLECULAR DOS DERIVADOS JFS COM O DNA

As estruturas 3D foram construídas com o software Avogadro 1.2.0 (HANWELL et al., 2012) e totalmente otimizadas com o método semi-empírico PM6 implementado no MOPAC2016 (STEWART, 2007; MOPAC, 2016). Os ligantes otimizados foram, em seguida, salvos como arquivos PDB. Com o uso de AutoDockTools-1.5.6, hidrogênios não polares foram mesclados com os carbonos correspondentes, as cargas parciais dos átomos foram calculadas usando o procedimento de Gasteiger implementado no pacote AutoDockTools. As ligações rotativas dos ligantes foram definidas, as estruturas foram salvas como pdbqt e usadas para os estudos de acoplamento.

As estruturas cristalográficas do DNA usadas para intercalação (hexâmero d(CGATCG) 2 complexado com elipticina, PDB ID: 1Z3F) e ligação ao sulco menor (dodecâmero d(CGCGAATTCGCG) 2, PDB ID: 1BNA) foram obtidos do Protein Data Bank (PDB). Com o uso de Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer (v16.1.0.15350) (BIOVIA, 2016), moléculas de água (e a elipticina intercalante presente em 1Z3F) foram removidas e hidrogênios polares foram adicionados às macromoléculas. Usando o AutoDockTools, cargas de Gasteiger foram adicionadas e as estruturas foram salvas como pdbqt para os estudos de acoplamento molecular.

A grade 3D foi criada pelo algoritmo Autogrid para gerar o arquivo de parâmetros da grade. O espaçamento da grade foi de 0,0375 nm em cada dimensão. Para 1BNA, a estrutura do DNA foi colocada dentro de uma caixa consistindo em 80 x 90 x 120 pontos de grade. Para 1Z3F, a caixa de grade foi centralizada no agente intercalante cocrystalizado que continha 40 x 50 x 40 pontos de grade. O algoritmo genético Lamarckiano no AutoDock4.2.6 foi aplicado para buscar a melhor conformação e orientação dos ligantes. A otimização global foi iniciada com uma população de 150 indivíduos posicionados aleatoriamente com um máximo de 2.500.000 avaliações de energia e um máximo de 27.000 gerações. Durante cada experimento de encaixe, 100 corridas foram realizadas, gerando 100 conformações. As posições de encaixe resultantes foram analisadas usando AutoDockTools e Discovery Studio

Visualizer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO UV-VIS COM SONDAS FLUORESCENTES E O CTDNA

É reportado na literatura que sondas fluorescentes ligantes do DNA são úteis para decifrar o modo de interação entre um fármaco ou candidato à fármaco e essa biomolécula. A ligação dessas substâncias ao DNA já é bem estudada e seu modo de ligação comprovadamente bem estabelecido (SARWAR et al., 2017). Como exemplo disto, BE e LA são sondas fluorescentes portadoras de cromóforos aromáticos planares, o que confere a estes compostos um mecanismo intercalativo de interação, pois podem se inserir entre pares de bases em uma hélice de DNA (SANI et al., 2018). Investigações acerca dessas intercalações têm sido usados em vários estudos espectroscópicos (QAIS; AHMAD, 2018). Por sua vez, DAPI é uma sonda que interage nos sulcos menores do DNA (RAHMAN et al., 2017) e bastante usada como marcador para identificar processos de interação de um ligante nessa região do DNA (ALI et al., 2018).

Com relação à análise espectroscópica por absorção UV-vis realizada por Alves (2019) entre os derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas com o ctDNA, foi depreendido que todos os compostos formaram um complexo com esta biomolécula, cujo mecanismo de interação conjecturado foi via ligação aos sulcos do ctDNA.

No intuito de corroborar os achados do referido autor e melhor comparar os resultados para as sondas clássicas usadas em estudos relativos à elucidação dos mecanismos de interação DNA-ligante, o perfil absorptivo da interação das sondas fluorescentes BE, LA e DAPI e do composto JF-252 (melhor na interação com o ctDNA) em contato com quantidades crescentes de ctDNA foi analisado. Os dados espectroscópicos de absorção UV-vis gerados a partir da análise das referidas sondas com o ctDNA estão mostrados na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Informações espectroscópicas de absorção UV-vis das sondas e do derivado JF-252 livres e conjugados ao ctDNA.

Sonda/ Derivado	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercro mismo (%) ^a	Hipocro mismo (%) ^b	Kb (M ⁻¹)	R ^{2c}
BE	482	482	-	-	10.47	5.98 x 10 ⁴	0,9971
LA	491	494	03	-	22.67	5.74 x 10 ⁴	0,9982
DAPI	342	347	05	24.21	-	4.13 x 10 ⁵	0,9989
JF-252	367	366	01	23.63	-	6.99 x 10 ⁶	0,9966

^aHipercromismo resultante da interação das sondas fluorescentes fixadas em 25 μM com o ctDNA em variadas concentrações (10-100 μM), em comparação com as sondas livres.

^bHipocromismo resultante da interação das sondas fluorescentes fixadas em 25 μM com o ctDNA em variadas concentrações (10-100 μM), em comparação com as sondas livres.

^cCoefficiente de correlação.

Conforme mostrado na tabela acima, os comprimentos de onda relacionados aos picos máximos de absorção observados para o BE, LA e DAPI e o JF-252 livres foram de 482, 491, 342 e 367 nm, respectivamente. Após o processo de interação, nota-se que o pico máximo do BE não sofreu nenhuma deslocalização, permanecendo em 482 nm. Contudo, o pico máximo absorptivo da LA foi deslocado para a região do vermelho (efeito batocrômico) em 3 nm.

Semelhantemente, foi constatado, a partir da análise espectral do perfil absorptivo do DAPI com o ctDNA, um efeito batocrômico de 5 nm. Logo, comparando-se as duas sondas intercalativas (BE e LA) e a sonda ligante no sulco menor (DAPI), observa-se que esta última apresentou um maior deslocamento do pico máximo de absorção, em comparação com as demais. Similarmente, em estudos anteriormente descritos, a maioria dos derivados ao interagirem com o ctDNA através da técnica absorptiva UV-vis, apresentaram desvio para o vermelho (batocromismo) ou para o azul (hipsocromismo) (ALVES, 2019).

Também é possível observar que as sondas intercalativas usadas no referido ensaio apresentaram hipocromismo (diminuição do pico máximo) de 10.47% e 22.67% para o BE e LA, respectivamente. Enquanto o DAPI foi a única sonda que mostrou um hipercromismo (aumento do pico máximo) de 22.67%. Com exceção do composto JF-251, que apresentou um hipocromismo de 4.72% (porém, apresentou um hipsocromismo de 6 nm), todos os demais derivados apresentaram hipercromismo numa faixa percentual de 21.71% a 65.82%, como o JF-252 (Tabela 2). Alguns deles chegaram a superar o percentual hipercrômico obtido da análise absorptiva interacional com o DAPI, como o JF-255 (65.82%), corroborando a hipótese dos derivados JF's se ligarem nos sulcos menores do DNA, como o DAPI.

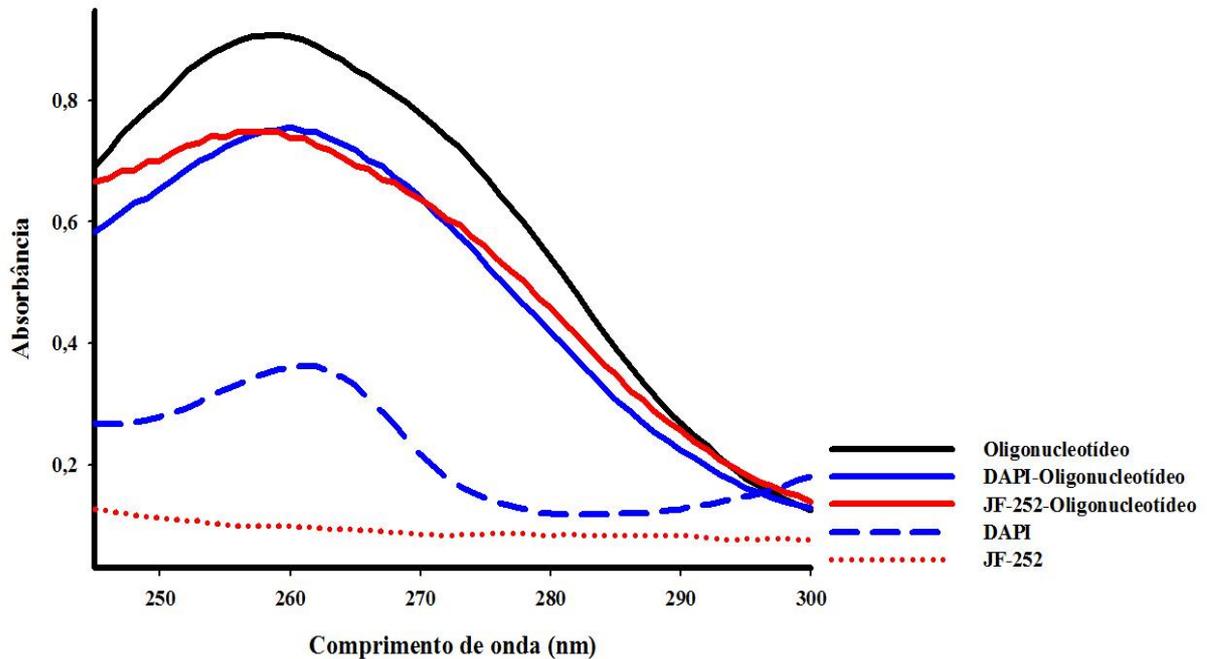
No que diz respeito à constante de afinidade (Kb) averiguada, as sondas intercalantes BE e LA obtiveram valores na magnitude de 10^4 (5.98×10^4 e $5.74 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, nessa ordem), enquanto o DAPI apresentou um valor de Kb na ordem de 10^5 ($4.13 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Tais resultados indicam uma maior afinidade do ctDNA com o DAPI, em comparação com as outras sondas. Analogamente, todos os derivados JF's apresentaram valores semelhantes ou superiores à constante de ligação do DAPI, atingindo magnitudes de 10^5 e 10^6 , com destaque para o composto JF-252, cujo valor de Kb foi o maior entre todos os derivados ($6.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (ALVES, 2019).

Com respaldo nos dados espectroscópicos de absorção acima discutidos, é evidente que os resultados verificados robustecem e consolidam a hipótese de que os derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas descritos pelo estudo supracitado interagem no sulco menor do ctDNA, como ocorre com o DAPI.

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO UV-VIS COM OLIGONUCLEOTÍDEOS E O DERIVADO JF-252

O ensaio de ligação de oligonucleotídeos de DNA pode ser usado para confirmar o modo e a especificidade da sequência de ligantes do DNA (PANDYA et al., 2010). Com base nisto, para confirmar experimentalmente o modo, bem como a possível sequência do DNA em que um composto se liga, um oligonucleotídeo contendo uma sequência específica de bases A-T foi usado para monitorar a interação com o derivado JF-252 (composto destaque da interação com o ctDNA do trabalho de Alves, 2019) e com o DAPI nas mesmas condições de ensaio. Os resultados podem ser visualizados na Figura 1, a seguir.

Figura 1. Espectro de absorção de oligonucleotídeo na presença e ausência de DAPI (controle) e do derivado JF-252, na razão molar de 1:10, em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6), a 25 °C.



A formação do complexo oligonucleotídeo-ligante foi monitorada na região absorptiva característica do DNA, em 260 nm (ALINAGHI et al., 2020). Nesta região, o DAPI livre apresentou uma leve absorção. Por outro lado, o JF-252 não apresentou absorbância nesta região e, como esperado, o oligonucleotídeo sozinho apresentou pico máximo em 260 nm.

Após a exposição ao oligonucleotídeo, na mesma concentração (50 μ M), tanto o DAPI quanto o derivado JF-252 formaram um complexo com a referida biomolécula com perfil de absorção similar, como constatado na Figura 31. Esse resultado comprova o mesmo modo de interação por ligação aos sulcos menores do DNA, na região específica da sequência A-T, semelhante ao controle usado. Considerando que o DAPI é uma sonda cujo modo de ligação ao DNA já é bem estabelecido como um ligante na sequência A-T em seu sulco menor (ZAITSEV; KOWALCZYKOWSKI, 1998), o modo de interação e a sequência na qual o composto JF-252 se liga foram comparativa e qualitativamente inferidos, respaldando as conclusões de Alves (2019).

ESTUDOS FLUORESCENTES DE COMPETIÇÃO DOS DERIVADOS JF'S COM LA E DAPI

O uso de sondas fluorescentes pode determinar a forma de interação entre ligantes e o DNA, pois a intensidade de emissão fluorescente desta biomacromolécula isolada é fraca

(SANI et al., 2018). Como previamente discutido, a LA é uma sonda sensível que se liga ao DNA por intercalação. A intensidade de fluorescência do complexo LA-DNA é notavelmente mais forte do que da LA sozinha. Porém, quando pequenas moléculas substituem a LA, após a intercalação entre os pares de bases do DNA, a intensidade de fluorescência do sistema LA-DNA diminui consideravelmente (HUSAIN et al., 2017).

Por sua vez, o DAPI é uma sonda fluorescente ligante nos sulcos menores do DNA, ligando-se preferencialmente nas regiões ricas em A-T. A formação do complexo DAPI-DNA produz um sistema tão estável, que a intensidade fluorescente manifestada é aproximadamente 20 vezes maior do que a fluorescência do DAPI sozinho (ALI et al., 2018). Ambos os fluoróforos citados (LA e DAPI) foram usados neste estudo. Os dados espectroscópicos de emissão dos complexos LA-ctDNA e DAPI-ctDNA na ausência e na presença dos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas são detalhados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados de emissão fluorescente dos complexos LA-ctDNA and DAPI-ctDNA na ausência e na presença dos derivados JFs.

JF	LA-ctDNA				DAPI-ctDNA			
	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	Hipocromismo (%) ^b	K_{sv} (M ⁻¹) ^c	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^d	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^d	Hipocromismo (%) ^b	K_{sv} (M ⁻¹) ^c
249	527	526	5.0	0.24 x 10 ⁴	457	457	24.38	0.60 x 10 ⁴
250	527	526	13.20	0.93 x 10 ⁴	457	457	54.54	2.58 x 10 ⁴
251	527	526	29.32	4.02 x 10 ⁴	457	456	38.81	4.02 x 10 ⁴
252	527	526	11.90	1.17 x 10 ⁴	457	456	63.85	4.59 x 10 ⁴
253	527	526	24.95	6.29 x 10 ⁴	457	458	45.73	7.59 x 10 ⁴
254	527	526	5.16	0.73 x 10 ⁴	457	457	17.37	2.65 x 10 ⁴
255	527	526	45.85	2.66 x 10 ⁴	457	456	26.55	2.13 x 10 ⁴
256	527	526	17.40	3.71 x 10 ⁴	457	458	55.25	2.72 x 10 ⁴

^aDados relativos ao perfil emissivo do complexo LA-ctDNA na presença de diferentes concentrações dos compostos-teste (3-30 μM).

^bHipocromismo resultante da interação entre os derivados JF's com os complexos LA-ctDNA ou DAPI-ctDNA em comparação com os complexos sozinhos.

^cConstante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) obtida com base nos dados de fluorescência com o ctDNA.

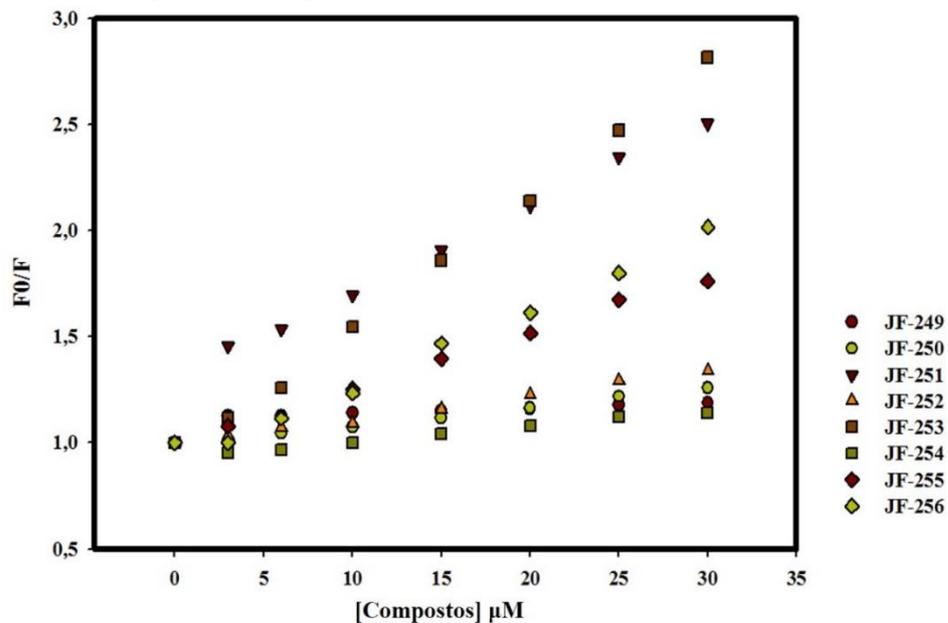
^dDados relativos ao perfil emissivo do complexo DAPI-ctDNA na presença de diferentes concentrações dos compostos-teste (3-30 μM).

A emissão da LA livre atingiu um pico máximo num comprimento de onda em 527 nm, apresentando uma baixa fluorescência. No entanto, após a intercalação com o DNA, sua emissão aumentou significativamente. A intensidade de fluorescência do complexo LA-ctDNA atingiu o pico máximo em 527 nm, o qual foi deslocado para a região espectral do

azul (efeito hipsocrômico) em 1 nm (526 nm), uma vez decorrido o processo de interação entre os JFs e o citado complexo. Considerando os oito compostos testados aqui, pode-se notar que a diminuição na fluorescência do complexo LA-ctDNA atingiu a porcentagem mínima de 5% para JF-249 e a máxima de 45,85% para JF-255 (Tabela 2), evidenciando, portanto, uma fraca competição de derivados com a LA na interação com o ctDNA. O potencial de supressão fluorescente apresentado pelos derivados JFs é relativamente menor do que aqueles observados de intercaladores de DNA já bem relatados na literatura (NAFISI et al., 2007).

A fim de compreender quantitativamente o comportamento da extinção fluorescente do complexo LA-ctDNA pelos compostos testados, a equação de Stern-Volmer foi usada para calcular a constante de supressão fluorescente (Tabela 2). A ordem crescente de supressão fluorescente do referido complexo foi determinado de acordo com a sequência: **249 < 254 < 250 < 252 < 255 < 256 < 251 < 253**. A intensidade de fluorescência relativa dos derivados JF's em contato com o complexo LA-ctDNA, determinada por regressão linear da intensidade de emissão relativa (F_0/F) em função das concentrações crescentes dos derivados JF's (LAKOWICZ, 2006), é representada na Figura 2, abaixo.

Figura 2. Intensidade de fluorescência relativa dos derivados JFs em contato com o complexo LA-ctDNA, em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6), à temperatura ambiente.

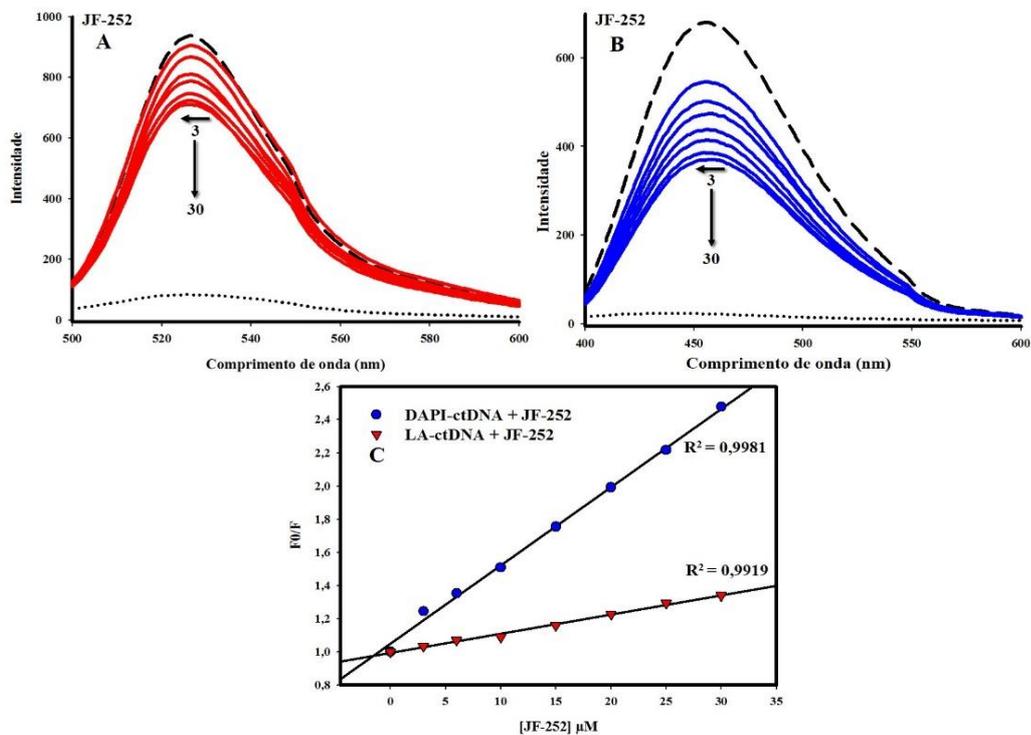


Baseado nesses resultados, constata-se que o derivado JF-253 promoveu a maior redução da fluorescência do complexo LA-ctDNA, apresentando um valor para a constante de supressão de $6.29 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Já o composto JF-252 apresentou um K_{sv} no valor de 1.17×10^4

M^{-1} , reforçando o pressuposto de que o modo de interação do referido derivado não é via intercalação (ALVES, 2019).

Para confirmar o modo de ligação ao DNA, um ensaio de competição também foi realizado com o DAPI. Se ocorrer uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência do complexo DAPI-DNA após a adição de outra molécula, provavelmente o DAPI foi deslocado e o ligante interagiu no sulco menor desta biomolécula (RAHMAN et al., 2017). Os oito derivados promoveram significativa diminuição na fluorescência do complexo DAPI-ctDNA, em comparação com a supressão do sistema LA-ctDNA, destacando-se o composto JF-252 novamente, o qual apresentou o maior percentual de hipocromismo (63.85%). Além disso, com exceção do JF-255, todos os compostos testados apresentaram taxas de hipocromismo do sistema DAPI-ctDNA mais elevados que aqueles mostrados para o complexo LA-ctDNA. Os espectros de supressão fluorescente gerados a partir da interação de ambos os sistemas LA-ctDNA e DAPI-ctDNA com o derivado JF-252 são mostrados na Figura 3.

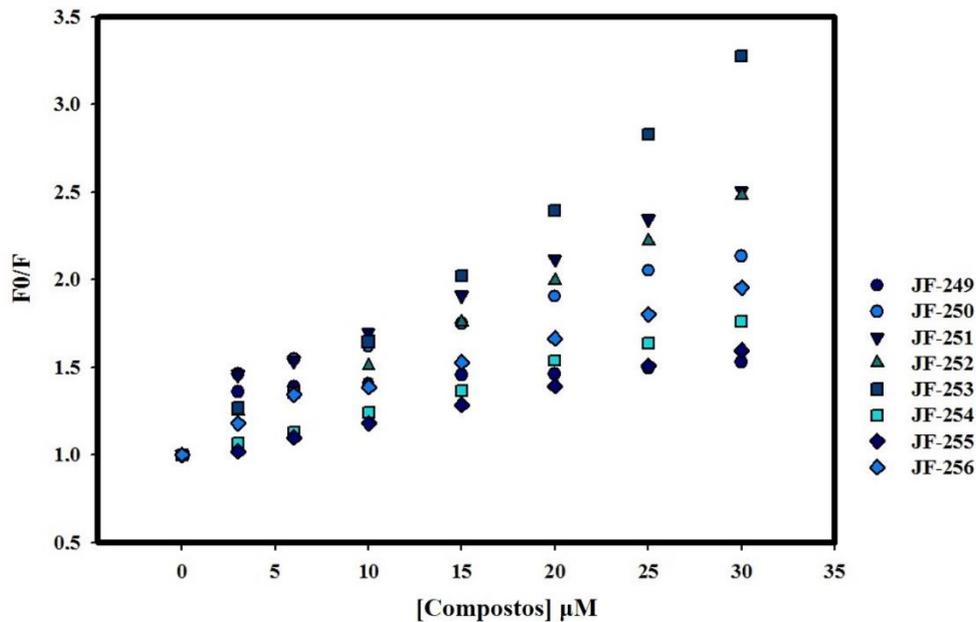
Figura 3. Espectros de emissão dos complexos LA-ctDNA (A) e DAPI-ctDNA (B) livres (----) e ligados ao ctDNA na ausência (.....) e na presença do derivado JF-252. As setas (\leftarrow) e (\downarrow) mostram o efeito hipsocrômico e a diminuição de intensidade ao longo do aumento da concentração do composto (3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M), a 25 °C. (C) Gráfico da equação de Stern-Volmer relativo à extinção da intensidade fluorescente dos complexos acima mencionados, por adição sucessiva do JF-252 (3-30 μ M).



A partir do gráfico da constante de Stern-Volmer (Figura 3C) é possível concluir que o derivado JF-252 foi capaz de suprimir, expressivamente, a emissão fluorescente do complexo DAPI-ctDNA, quando comparado à extinção fluorescente do sistema LA-ctDNA. Tais resultados cosubstanciam a conclusão de que este composto é um ligante ao sulco do DNA (ALVES, 2019).

Além disso, a maioria dos compostos apresentou desvio para o azul (efeito hipsocrômico) ou desvio para o vermelho (efeito batocrômico). A ordem crescente dos valores de K_{sv} calculados foi determinada de acordo com a sequência: **249 < 255 < 250 < 254 < 256 < 251 < 252 < 253**. A partir destes resultados, pode-se observar que a adição sucessiva dos compostos testados potencializa a extinção da intensidade fluorescente do aduto DAPI-ctDNA, indicando que a diminuição da fluorescência do referido sistema na presença dos compostos JFs é devido à substituição do DAPI, a partir do seu local de ligação, ou seja, no sulco menor do DNA (ALI et al., 2018). Fato que também pode ser evidenciado a partir da análise da intensidade de fluorescência relativa dos derivados JF's em contato com o complexo DAPI-ctDNA, determinada por regressão linear da intensidade de emissão relativa (F_0/F) em função das concentrações crescentes dos derivados JFs (LAKOWICZ, 2006) (Figura 4).

Figura 4. Intensidade de fluorescência relativa dos derivados JFs em contato com o complexo DAPI-ctDNA, em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6), à temperatura ambiente.



Com respaldo nos estudos espectroscópicos de fluorescência acima expostos, a partir da utilização de diferentes sondas com distintos modos de interação com o DNA, é conclusivo

que os derivados aqui estudados são ligantes do sulco menor do ctDNA, como também constatado nos estudos de absorção UV-vis previamente discutidos, consolidando os achados de Alves (2019).

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR ENTRE OS NOVOS DERIVADOS JFS E O DNA

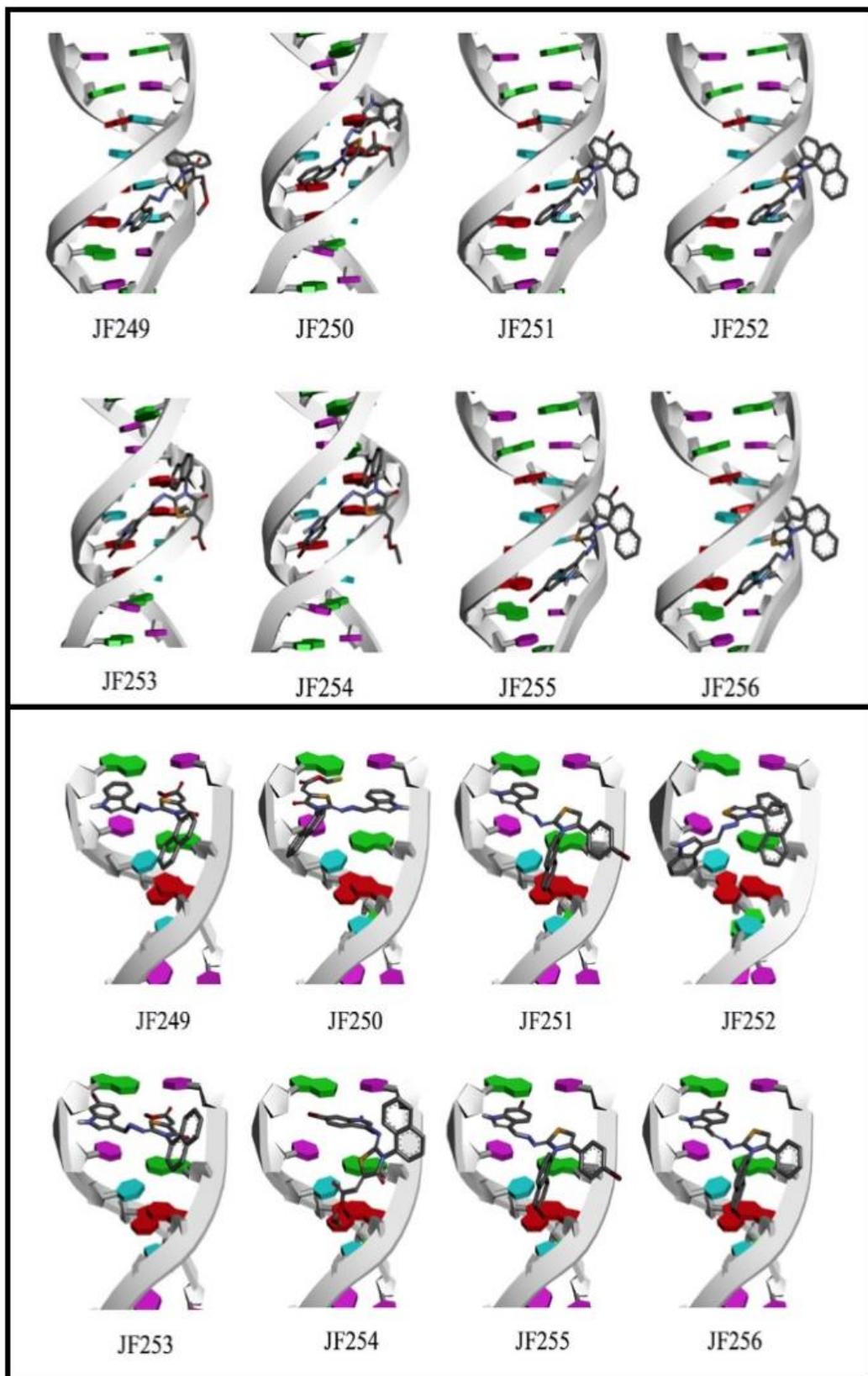
O docking molecular é uma técnica *in silico* largamente utilizada para modelar a interação e formação do complexo entre um ligante e um determinado alvo terapêutico de interesse, o que permite determinar o modo de ligação e afinidade entre as moléculas constituintes no reconhecimento molecular, compreender os mecanismos de interação, projetar moléculas para intervenções terapêuticas no processo de descoberta de novos medicamentos, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (NAIK & SEETHARAMAPPA, 2019; ABBAS; FISAL; ORABI, 2020). Este método é frequentemente usado como uma ferramenta de pesquisa computacional, em virtude de ser capaz de prever a estrutura sustentada do complexo estável receptor-ligante para melhor reconhecimento dos detalhes da interação entre um ligante e biomacromoléculas, como o DNA (MOGHADAM et al., 2019; SHI et al., 2018; JAMEEL et al., 2020; DONG et al., 2020).

Pautando-se nisso, foi realizado um estudo de ancoramento entre os novos derivados indólicos e duas estruturas de DNA do PDB. Analisaram-se as energias de ligação e as posições de acoplamento para dois tipos de interação com o DNA: ligação aos sulcos e intercalação. As respectivas energias de ligação referentes aos acoplamentos são mostradas na Tabela 4 e as posições de encaixe são representado na Figura 5.

Tabela 4. Valores das energias de ligação calculadas conforme o modo de interação com o DNA.

Composto	Energia de Ligação (kcal mol ⁻¹)	
	Ligação aos sulcos do DNA PDB ID: 1BNA	Intercalação do DNA PDB ID: 1Z3F
JF-249	-10.56	-9.48
JF-250	-9.97	-9.43
JF-251	-10.68	-8.51
JF-252	-10.09	-9.03
JF-253	-10.92	-9.60
JF-254	-10.82	-9.15
JF-255	-11.24	-8.82
JF-256	-10.97	-8.64

Figura 5. Posições de encaixe de ligação aos sulcos do DNA (superior) e de intercalação (inferior) referentes aos compostos testados.



Consoante o que está mostrado na Tabela 4, a ordem decrescente dos valores calculados para a interação nos sulcos é: **255 < 256 < 253 < 254 < 251 < 249 < 252 < 250**. Já a ordem decrescente dos valores calculados para o modo intercalativo é: **253 < 249 < 250 < 254 < 252 < 255 < 256 < 251**. Esses dados desvelam que os derivados tiazolidinonas possuem energias de ligação com menores valores para o modo intercalativo; já os derivados tiazólicos, para o modo interativo de ligação aos sulcos, com destaque para o JF-255, que apresentou o menor valor de energia de ligação ($-11,24 \text{ kcal mol}^{-1}$) para o modo de interação aos sulcos do DNA.

Ademais, podemos ver na Tabela 4 que todos os compostos apresentaram uma menor energia de ligação para o modo de ligação aos sulcos do DNA. Para compostos poliaromáticos, a força motriz do processo de intercalação é a interação por meio do empilhamento de elétrons π entre os pares de bases do DNA e os anéis aromáticos presentes na molécula (GILAD & SENDEROWITZ, 2014). As posições de acoplamento indicam a ausência de tais interações entre o DNA e os anéis do grupo naftil. Os anéis aromáticos de indol foram capazes de intercalar na maioria dos compostos. Por outro lado, as posições de encaixe do sulco indicam que tanto o indol quanto outros anéis aromáticos nas moléculas foram bem acomodadas no sulco menor, incluindo os anéis de naftil para os compostos JF-249, JF-250, JF-253 e JF-254.

Finalmente, é aceito que a dupla hélice do DNA é estabilizada pela ligação de pequenos ligantes em seus sulcos maiores ou menores por meio de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals com grupos nas bordas dos pares de bases nitrogenadas (GUP; GÖKÇE; DILEK, 2015). Ligantes de sulco de DNA desempenham um papel fundamental no design de moléculas utilizadas na terapia anticâncer. Grandes avanços são alcançados com o design e síntese de ligantes que interagem pelo sulco menor e alguns compostos promissores avançaram para ensaios clínicos (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Estudos mostram que ligantes para o sulco menor do DNA, por exemplo, têm uma maior capacidade de estabilizar suas interações com o DNA, pois são pequenas moléculas que até o protegem do efeito de atividades mutagênicas, mediante a ocorrência desta estabilidade durante a formação do complexo DNA-ligante, por meios de ligação direta aos sulcos (CHANDRAN; GHOSHDASTIDAR; SENAPATI, 2012; BURAKA et al., 2014).

CONCLUSÃO

Mediante os estudos de interação dos novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas com o ctDNA, por meio das técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis e emissão fluorescente com diferentes sondas fluorescentes, depreendeu-se que os compostos estudados interagiram com esta biomolécula, tendo como mecanismo de interação a ligação ao sulco menor do ctDNA. Os estudos *in silico* de ancoramento molecular com o DNA, confirmaram o modo de interação entre derivados e DNA por ligação aos sulcos, especificamente no sulco menor, havendo, portanto, a formação do complexo DNA-JF.

A partir do ensaio espectroscópico de absorção UV-vis com oligonucleotídeos e DAPI (controle) foi possível inferir que o composto JF-252 liga-se especificamente nas regiões ricas em sequências A-T, no sulco menor do ctDNA.

Ademais, os resultados indicam que os novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas propostos são promissores, dada a sua capacidade em interagir com biomacromoléculas de interesse científico como o DNA, indicando que a inserção dos substituintes propostos foi relevante na contribuição dos efeitos verificados, bem como a importância da presença de grupos químicos lipofílicos no processo de interação com o DNA. Mais experimentos serão executados posteriormente a fim de investigar com mais meticulosidade o mecanismo de ação dos novos JFs, enquanto candidatos a fármacos a serem utilizados na terapia antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. M.; FISAL, S. R.; ORABI, A. S. Novel β -lactam antibiotic derivative and its complexes: DFT, frontier energy levels, DNA interaction, docking, physicochemical and antimicrobial properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1218, 128487, 2020.
- ALEKSI, M. M.; KAPETANOVIC, V. An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA - Drug Interactions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 61, p. 555–573, 2014.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA Binders in Clinical Trials and Chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506–4521, 2014.
- ALI, M. S. et al. Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: a multi spectroscopic and molecular modelling study. **RSC Advances**, v. 8, p. 9083–9093, 2018.
- ALINAGHI, M. et al. A Pd (II) complex derived from pyridine-2-carbaldehyde oxime ligand: Synthesis, characterization, DNA and BSA interaction studies and *in vitro* anticancer activity. **Journal of Molecular Structure**, v.1219, 128479, 2020.
- 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.
- ALVES, J. E. F. Estudos de Interação com o DNA e a albumina sérica bovina de novos derivados indol-tiazólicos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, p. 149, 2019.
- BIOVIA, D. S. Discovery Studio Visualizer, version 16.1.0.15350, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
- BURAKA, E. et al. DNA-binding studies of AV-153, an antimutagenic and DNA repairstimulating derivative of 1,4-dihydropyridine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 200–207, 2014.
- CAVALLO, G. et al. The halogen bond. **Chemical Reviews**, v. 116 (4), 2478–2601, 2016.
- CHANDRAN, A.; GHOSHASTIDAR, D.; SENAPATI, S. Groove Binding Mechanism of Ionic Liquids: A Key Factor in Long- Term Stability of DNA in Hydrated Ionic Liquids? **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 20330–20339, 2012.
- DONG, J. et al. Synthesis, crystal structure, Hirshfeld surffasse analysis, DNA binding, DNA cleavage activity and molecular docking of a new Schiff base nickel(II) complex. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020 DOI: 10.1080/07391102.2020.1784789.
- DOUADI, K. et al. Azoimine quinoline derivatives: Synthesis, classical and electrochemical evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities and the DNA / BSA binding. **Journal of Molecular Structure**, v. 1217, 128305, 2020.

FROEHLICH, M. et al. Bundling and Aggregation of DNA by Cationic Dendrimers. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 511–517, 2011.

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

GUP, R.; GÖKÇE, C.; DILEK, N. Synthesis, Structural characterization and DNA Interaction of Zinc Complex from 2,6-Diacetylpyridine Dihydrazone and 2-(4-(2-(Hydroxyimino)acetyl)phenoxy) Acetic Acid. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 144, p. 42–50, 2015.

GUPTA, S. et al. Synthesis and bio-evaluation of indole-chalcone based benzopyrans as a promising antiligase and antiproliferative agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1981–1996, 2018.

GUTIÉRREZ, I. S. et al. Parametrization of halogen bonds in the CHARMM general forcefield: improved treatment of ligand-protein interactions, **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 24 (20), p. 4812–4825, 2016.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, 2012.

HERNADES, M. Z. et al. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. **Current Drug Targets**, v. 11 (3), p. 303–314, 2010.

HO, P. S. Halogen bonding in medicinal chemistry: from observation to prediction. **Medicinal Chemistry**, v. 9 (7), 2017.

HUSAIN, M. A. et al. Elucidating the interaction of sulindac with calf thymus DNA: biophysical and in silico molecular modelling approach. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 14924–14935, 2017.

JAMEEL, M. et al. Interaction of thiamethoxam with DNA: Hazardous effect on biochemical and biological parameters of the exposed organism. **Chemosphere**, v.254, 126875, 2020.

KAN, G. S. et al. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 115, p. 105-118, 2012.

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**, v. 136, p. 511–522, 2017.

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

LI, J. J. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of 2,3-diphenyl acrylonitriles-bearing halogen as selective anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 92, p. 1419-1428, 2018.

MCGHEE, J. D.; HIPPEL, P. H. VON. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions : Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, n. 2, p. 469–489, 1974.

MOGHADAM, N. H. et al. In vitro cytotoxicity and DNA/HSA interaction study of triamterene using molecular modelling and multi-spectroscopic methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, 2019.

MOPAC, J.; STEWART, J. P. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://openMOPAC.net>. 2016.

NAFISI, S. et al. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, v. 827, n. 1–3, p. 35–43, 2006.

NAIK, R.; SEETHARAMAPPA, J. Spectral and computational attributes: Binding of a potente anticancer agent, dasatinib to a transport protein. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, 111492, 2019.

O'DEA, A. et al. A series of indole-thiazole derivatives act as GPER agonists and inhibit breast cancer cell growth. **ACS Medicial Chemistry Letters**, v. 9, n. 9, p. 901–906, 2018.

OLIVEIRA, J. F. DE 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.

PANDYA, P. et al. DNA minor groove binding of small molecules: experimental and computational evidence. **Journal of Chemical Sciences**, v. 122, p. 247–257, 2010.

QAIS, F. A.; AHMAD, I. In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 193–205, 2018.

RAHMAN, Y. et al. Unravelling the interaction of pirenzepine, a gastrointestinal disorder drug, with calf thymus DNA: An in vitro and molecular modelling study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 625–626, p. 1–12, 2017.

RESCIFINA, A. 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.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 111592, 2019.

SANI, F. D. et al. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of Luminescence**, v. 203, p. 599–608, 2018.

SARWAR, T. et al. Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA : A multi-spectroscopic , thermodynamics and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 319–328, 2017.

SHI, J.-H. et al. Exploring the binding interaction between herring sperm DNA and sunitinib: insights from spectroscopic and molecular docking approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, p. 837-845, 2018.

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, p. 1173–1213, 2007.

VENMATHY, P. et al. Interaction of two flavonoids with calf thymus dna: a multi-spectroscopic, electrochemical and molecular modelling approach. **European Chemical Bulletin**, v. 7, p. 10-19, 2018.

WANG, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of bromophenol-thiazolyhydrazone hybrids inhibiting the interaction of translation initiation factors eIF4E/eIF4G as multifunctional agents for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 177, p. 153-170, 2019.

WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA. **Biochemistry**, v. 26, n. 20, p. 6392–6396, 1987.

ZAITSEV, E. N.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Binding of double-stranded DNA by *Escherichia coli* RecA protein monitored by a fluorescent dye displacement assay. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 2, p. 650-654, 1998.

CAPÍTULO III

5 OBTENÇÃO DE ALBUMINA HUMANA E SEU USO PARA ENSAIOS DE INTERAÇÃO *IN VITRO* COM DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados em 2021 (Anexo E), no periódico International Journal of Biological Macromolecules.

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1



ISSN: 0141-8130

International Journal of Biological
Macromolecules

Título do artigo: Um método simples para obtenção de albumina humana e seu uso para ensaios de interação *in vitro* com derivados Indol-Tiazóis e Indol-Tiazolidinonas

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.109>

Josival Emanuel Ferreira Alves^a, Maria Luiza Cavalcanti Lucena^a, Antônio Edson de Souza Lucena^b, Aurenice Arruda Dutra das Mercês^a, Rafael David Souto de Azevedo^d, Gleyton Leonel Silva Sousa^e, Ricardo Olimpio de Moura^f, Maria do Carmo Alves de Lima^c, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^a, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{a,d,*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil

^bEmpresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRÁS), Recife, PE 51021-410, Brasil

^cLaboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil

^dLaboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE 55290-000, Brasil

^ePrograma de Doutorado em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23897-000, Brasil

^fDepartamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, PB 58429-500, Brasil

RESUMO

Neste trabalho, a HSA foi usada para ensaios de interação com derivados indol-tiazóis e indol-tiazolidinonas por meio de estudos espectroscópicos de absorção UV-vis e fluorescência, bem como pela técnica *in silico* de ancoramento molecular. A partir dos resultados, foi possível afirmar que os compostos interagiram com a referida proteína plasmática, formando o complexo HSA-JF, com destaque para o composto JF-255 (di-substituído com bromo), o qual apresentou o maior valor tanto para a constante de afinidade ($K_b = 3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) como também para a constante de supressão fluorescente ($K_{sv} = 4.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Os estudos espectroscópicos de fluorescência evidenciaram que os derivados extinguíram a fluorescência intrínseca de HSA, alteraram o microambiente dos resíduos de triptofano, provavelmente, ligando-se ao sítio I da proteína plasmática. O estudo molecular de ancoramento corroborou os resultados *in vitro*, comprovando a forte interação da HSA com o JF-255, no mesmo sítio que o controle (indometacina). A existência de mecanismo de supressão estática durante a formação dos sistemas HSA-JF foi também consolidada. Portanto, a partir dos estudos de interação com uso das técnicas supracitadas, concluiu-se que os compostos, revelaram alta afinidade e a indução de alterações no microambiente intrínsecos da HSA.

Palavras-chave: HSA, Interação, Indol, Purificação, Tiazol, Tiazolidinona.

INTRODUÇÃO

A albumina sérica é a principal proteína extracelular do sistema circulatório, representando cerca de 60% de todas as proteínas plasmáticas (RIBEIRO et al., 2021). Várias propriedades fisiológicas importantes são relatadas para esta proteína, como manutenção da pressão osmótica, proteção contra radicais livres e outros agentes químicos nocivos, funções antioxidantes, participação no processo de agregação plaquetária e na permeabilidade vascular, modulando a distribuição de líquidos entre os compartimentos do corpo, envolvimento em vias de sinalização intracelular, bem como ligação e transporte de diferentes substâncias, incluindo fármacos anticancerígenos (LIU et al., 2020).

Entre estas diversas funções biológicas, o transporte é o mais evidente e deve ser considerado durante o projeto de novas moléculas terapêuticas, uma vez que o plasma

sanguíneo é o caminho através do qual qualquer fármaco percorre antes de atingir o local-alvo final, após a administração. Os seguintes fatores podem contribuir para a função de transporte da albumina: sua ação como portador de ligantes endógenos com perfis hidrofóbicos; sua resistência aos processos de degradação sistêmica; sua meia-vida de 14-20 dias no corpo humano; o acúmulo preferencial em locais de vazamento na vascularização; e a falta de relatos de toxicidade sistêmica conhecida (RIBEIRO et al., 2021).

A albumina sérica humana (HSA) consiste em uma única cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos, com peso molecular de 66,438 kDa. Estruturalmente, é composto por vários segmentos de hélice alfa que se agrupam para formar dois subdomínios (NIU et al., 2023). A HSA tem características específicas que são importantes para sua estrutura e função: 18 resíduos de tirosina, seis resíduos de metionina, um resíduo de triptofano (Trp), 59 resíduos de lisina, um resíduo de cisteína (Cys-34) e 17 pontes dissulfeto. Estas características conferem uma carga residual negativa, com um ponto isoelétrico de 4.8, resultando em alta solubilidade em água (BINJAWHAR et al., 2023). A disponibilidade, estabilidade e as propriedades de ligação da HSA a tornam uma das proteínas mais amplamente estudadas em testes de interação realizados *in vitro*, ou como reagente em investigações de testes biológicos (BALAKRISHNAM et al., 2019).

A estrutura da HSA é composta por três domínios: I, II e III. Cada domínio contém dois subdomínios, a saber, A e B com padrões estruturais idênticos (KAUR et al., 2018). Os principais locais de ligação de medicamentos às albuminas são os sítios I e II nos três domínios homogêneos, principalmente responsáveis pela entrega específica de fármacos. A afinidade oferecida pelo sítio I, deriva principalmente da interação hidrofóbica, enquanto o sítio II envolve uma combinação de pontes de hidrogênio hidrofóbicas e interações eletrostáticas. A interação HSA-fármaco pode ser avaliada por absorção UV-vis e espectroscopia de fluorescência para prever o fenômeno de ligação entre estes elementos (CHAVES et al., 2020).

A tendência de ligação albumina-fármaco é considerada um dos fatores significativos na avaliação de atividades farmacológicas específicas e pode ajudar a prever o efeito terapêutico (ZHANG, DENG, WANG, 2020). Após a ligação da albumina sérica, a vida útil de um medicamento pode ser melhorada aumentando a estabilidade e diminuindo a toxicidade, o que pode levar a melhores resultados terapêuticos (FILHO et al, 2019). Se a afinidade de ligação do fármaco com a albumina é fraca, o medicamento será metabolizado e excretado do corpo muito rapidamente, então seu efeito terapêutico será também fraco. Por outro lado, uma elevada afinidade de ligação implica longo tempo de retenção do fármaco ao

corpo, o que pode levar a alta toxicidade e efeitos colaterais indesejados (PAWAR et al., 2018). Em outras palavras, a ligação à albumina sérica pode afetar a solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de um fármaco (NIU et al., 2023). Portanto, o conhecimento aprofundado da interação entre HSA e medicamentos é extremamente importante e significativo em áreas como medicina e química medicinal (RABBANI et al., 2018; BAIG et al., 2019).

Recentemente, novos derivados heterocíclicos contendo núcleos como indol, tiazol e tiazolidinona foram sintetizados e caracterizados por Alves et al., 2021. Eles foram testados quanto às suas propriedades de ligação ao DNA e seu modo de interação foi definido por meio da ligação do sulco menor. Aqui, estes compostos foram estudados em ensaios de interação com a HSA por titulações por absorção UV-vis e emissão fluorescente.

Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar os derivados indol-tiazóis e indol-tiazolidinonas para realizar estudos de interação com a HSA. Essa proteína foi então utilizada em testes *in vitro* com os referidos compostos-teste e fármacos já comercializados (indometacina e ibuprofeno), por absorção UV-vis e espectroscopia de fluorescência. Além disso, estudos de ancoramento molecular também foram realizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS-TESTE, INSUMOS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e métodos utilizados na síntese e caracterização dos oito derivados indol-tiazólicos (JFs 251, 252, 255 e 256) e indol-tiazolidinonas (JFs 249, 250, 253 e 254) utilizados neste trabalho, bem como as etapas de obtenção dos referidos compostos foram descritos por ALVES et al., 2021 e as estruturas químicas foram apresentadas no esquema 1 do capítulo 2 (página 68).

A HSA (soroalbumina humana) foi doada pela Fundação HEMOPE, Recife-PE e purificada segundo a metodologia de Lucena, 2022. Os espectros UV-vis foram adquiridos a partir do Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO e do Espectrofotômetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Waltham, MA, Estados Unidos). Os espectros de emissão fluorescente foram obtidos a partir do Espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão).

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS COM A HSA E OS DERIVADOS JFS

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução-estoque). As soluções-teste foram preparadas em duplicata, fixando-se a concentração da HSA em 20 μ M e variando-se a concentração dos derivados nas seguintes concentrações: 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 20 μ M. A mistura dos compostos-teste com a HSA foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização e, posteriormente, submetidas a análise absorptiva em UV-vis por meio de varredura entre 200-600 nm.

O aparecimento de alterações no comportamento absorptivo da HSA em contato com os compostos pode indicar a ocorrência de uma interação, pela formação do complexo biomolécula-ligante (RIBEIRO et al., 2021). A partir desta análise, é possível coletar informações significativas relacionadas ao modo de interação, bem como calcular os valores relativos às constantes de ligação, revelando uma maior ou menor afinidade da biomolécula pelos compostos-teste. A constante de ligação intrínseca (K_b) da HSA foi obtida através da equação de (MCGHEE; HIPPEL, 1974):

$$[JFs] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [JFs] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

$$[HSA] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [HSA] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

onde ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da $[JFs]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[JFs]$ e $[HSA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[HSA]$ 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. As alterações no pico máximo absorptivo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) dos espectros gerados da HSA livre e ligada aos derivados JFs foram também analisadas. Os percentuais relativos ao efeito hipercrômico observado foram calculados a partir de uma relação entre os valores dos picos máximos absorptivos da HSA livre e ligada aos derivados JFs obtida em função da maior concentração utilizada no experimento.

ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO FLUORESCENTE COM A HSA E OS DERIVADOS JFS

As concentrações das amostras referentes às soluções-teste foram variadas em 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μ M. Logo em seguida, estas, por sua vez, foram colocadas em contato com a HSA fixada na concentração de 10 μ M. O sistema foi homogeneizado e deixado à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização no tampão. Posteriormente, as

amostras foram submetidas à análise de emissão fluorescente, a diferentes temperaturas (25, 30 e 37 °C). Os espectros de emissão gerados foram registrados na região de 310-400 nm usando um comprimento de onda de excitação de 280 nm.

As medições foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de 1 cm de percurso. O comportamento de supressão de emissão fluorescente foi analisado através da equação de Stern-Volmer (K_{sv}) (ARUMUGAM et al., 2016):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor, K_q é a constante de taxa de extinção bimolecular, τ_0 é o tempo de vida médio da molécula na ausência do extintor ($\tau_0 = 5,09$ ns para HSA) e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer determinada pela inclinação de um gráfico de F_0/F vs $[Q]$. Os dados de ligação foram obtidos usando o software SigmaPlot 10.0.

A fluorescência síncrona foi registrada em uma concentração fixa de HSA (3 μ M) e os derivados JFs foram adicionados em incrementos sucessivos (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M). Os sistemas HSA-composto foram registrados usando uma diferença constante $\Delta\lambda = 15$ e 60 nm entre os comprimentos de onda de excitação e emissão, para Tyr e Trp, respectivamente (ALSAIF et al., 2020). Além disso, para decifrar o sítio de ligação dos derivados de JFs em HSA, um experimento preliminar foi realizado na presença de dois marcadores específicos de sítio usando um método de titulação de fluorescência (CHAVES et al., 2020).

Os fármacos indometacina e o ibuprofeno foram usados como marcadores de sítio I e II, respectivamente (MAURYA et al., 2019). As concentrações equimolares foram tomadas para ambos os marcadores de sítio e HSA, ou seja, 3 μ M. Antes do deslocamento, cada marcador de sítio foi incubado com HSA em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) por 10 min. A mistura incubada foi então titulada aumentando a concentração dos compostos de teste (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M) e a emissão foi registrada de 300 a 400 nm, a um λ_{exc} de 280 nm, a temperatura ambiente. Todos os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos no Espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão), cujas medições foram realizadas em uma cubeta retangular de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Os percentuais relativos ao efeito hipocrômico observado foram calculados a partir de uma relação entre os valores dos picos máximos emissivos da HSA livre e ligada aos derivados JFs obtida em função da maior concentração utilizada no experimento.

ESTUDOS *IN SILICO* DE ANCORAMENTO MOLECULAR DOS DERIVADOS JFS COM A HSA

Estudos de docking molecular foram realizados com o programa Gold 5.8.1 para entender a interação e ligação dos compostos-testes com HSA. A estrutura cristalográfica de raios-X da HSA (PDB ID: 2BXM) foi obtido no site do RCSB Protein Data Bank (GHUMAN et al., 2005) em resoluções de 2,50 Å. As estruturas estudadas foram primeiramente tratadas usando o software Spartan 14. Depois de otimizados, foram submetidos ao estudo de docking molecular através do programa Gold 5.8.1 (JONES et al., 1997).

Para validar o estudo, o redocking para o alvo indometacina (2BXM) foi realizado em complexos com a HSA, dando um RMSD =0,42. Em seguida, os arquivos do receptor (HSA) e do ligante foram estudados. O receptor foi tratado como uma molécula rígida, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Para as simulações de encaixe com GOLD, uma esfera de espaço de busca com um raio de 10 Å foi definida como a ligação bolso HSA, centrado nas coordenadas cristalográficas de um átomo aromático de carbono do resíduo Trp 214. As funções de pontuação “*score*” GOLDScore e o CHEMPLP foram usadas para determinar qual se ajustava melhor a esse sistema.

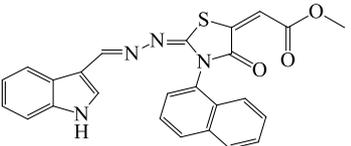
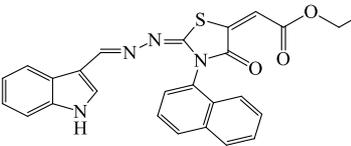
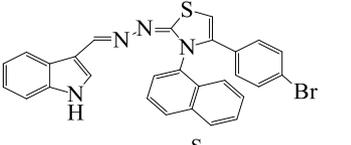
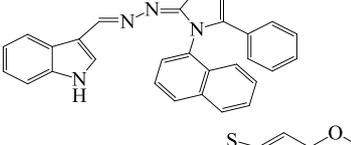
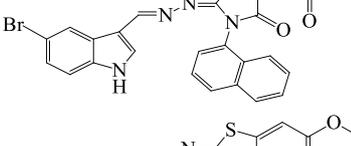
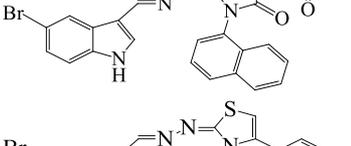
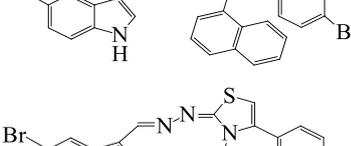
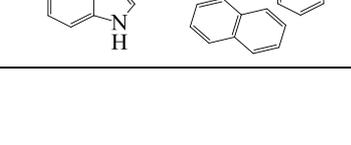
A função CHEMPLP foi considerada para melhor descrever a proteína e o sistema de ligantes. Os resultados do docking foram analisados, usando interações intermoleculares como parâmetros para medir a energia de afinidade, disponibilizada pelo programa Gold. Os ligantes que obtiveram a pontuação mais alta foram investigados pelo programa Pymol 2.3.2 e Discovery Studio Visualizer v17. A distância e o tipo de conexão com o receptor foram preponderantes para a conclusão do estudo de modelagem (ZHANG, DENG, WANG, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO UV-VIS COM A HSA E OS DERIVADOS JFS

Nos estudos absorptivos entre os derivados JFs e a HSA, esta mostrou um pico alto de absorção em torno de 280 nm, em função da ocorrência de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis fenílicos de seus aminoácidos aromáticos: triptofano (Trp), tirosina (Try) e fenilalanina (Phe) (SIDDIQUI et al., 2018; ZHANG, DENG, WANG, 2020), gerando uma absorbância cumulativa destes cromóforos, a qual pode ser influenciada por espécies químicas capazes de interagir com esta proteína (HUANG et al., 2020). Os dados espectroscópicos referentes à absorção UV-vis da HSA livre e conjugada aos derivados JFs estão detalhados na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Informações espectroscópicas de absorção UV-vis da HSA livre e conjugada aos derivados JFs.

JF	Estrutura Química	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hiper cromismo (%) ^a	Kb (M ⁻¹) ^b
249		279	280	01	28.05	2.36 x 10 ⁵
250		279	279	-	63.55	3.61 x 10 ⁵
251		279	278	01	52.92	3.30 x 10 ⁵
252		279	278	01	51.54	3.29 x 10 ⁵
253		279	279	-	47.89	2.89 x 10 ⁵
254		279	280	01	57.25	2.90 x 10 ⁴
255		279	278	01	58.98	3.65 x 10 ⁵
256		279	278	-	36.28	2.60 x 10 ⁵

^aHipercromismo resultante da interação da HSA fixada em 20 μM com os compostos-teste em variadas concentrações (2-20 μM), em comparação com a HSA livre.

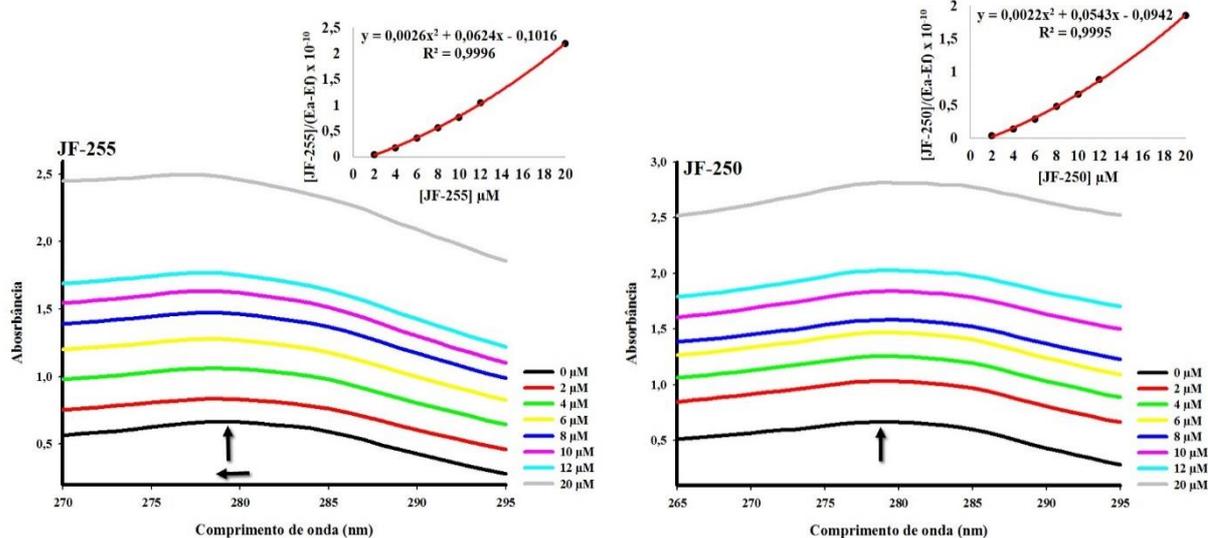
^bConstante de ligação (K_b) obtida com base na absorbância do HSA na presença de diferentes concentrações dos derivados JFs (2-20 μM), à temperatura ambiente.

A HSA apresentou pico máximo de absorção em 279 nm. As variações na intensidade e na posição do referido pico foram utilizadas para investigar a interação dos derivados com esta biomolécula. Após a interação da HSA na presença de quantidades crescentes dos compostos-teste (0-20 μM), foram constatadas alterações espectrais nos comportamentos absorptivos da HSA, exibindo a ocorrência dos efeitos: hipercrômico, batocrômico e hipsocrômico, os quais podem indicar a formação do complexo HSA-ligante, dadas as mudanças observadas na faixa de 279 nm (CHUGH et al., 2019).

Segundo os dados da Tabela 1, relativos ao hipercromismo, é estabelecida a seguinte ordem crescente resultante deste efeito: **249 < 256 < 253 < 252 < 251 < 254 < 255 < 250**. Pode-se notar, portanto, que os compostos responsáveis pelo maior efeito hipercrômico da interação com a HSA foram os JFs 255 e 250. O primeiro possui um bromo na posição 5 do núcleo indol e um *p*-bromofenil acoplado ao C-4 do núcleo tiazol. Já o segundo (portador do maior percentual de hipercromismo) contém um vinil-éster (etóxi) ligado ao núcleo tiazolidinona. Supostamente, estas substituições podem ter colaborado na produção do efeito espectroscópico acima mencionado, mediante a formação do complexo JF-HSA, devido à exposição de cromóforos, sugerindo uma mudança conformacional na HSA (SIDDIQUI et al., 2018).

Curiosamente, os análogos dos derivados supracitados (JF-251 e JF-254, respectivamente) também tiveram percentuais significativos de hipercromismo. Contudo, o fato do JF-251 ser diferente do JF-255 (58.98%) por portar o núcleo indol não substituído provavelmente colaborou para que apresentasse um menor hipercromismo (52.92%). Com relação ao JF-254, foi observado que o fato deste portar um bromo ligado à posição 5 do anel indólico, possivelmente, pode ter contribuído com um percentual menor de hipercromismo (57.25%), quando comparado ao seu análogo JF-250 (63.55%). Os espectros de absorção UV-vis e o gráfico representativo do aumento linear da concentração de HSA em função dos valores absorptivos ($\lambda = 279$ nm) resultantes da interação entre os derivados JF-250 e JF-255 com a HSA, são mostrados na Figura 1, a seguir:

Figura 1. Espectros de absorção da HSA (20 μM) na presença de quantidades crescentes dos JF's 250 e 255 (0-20 μM). As setas (\uparrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{JF}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Ainda nessa perspectiva, nota-se que a capacidade absorptiva da HSA aumentou após a interação com o JF-255, em comparação com os outros derivados portadores do fenil não-substituído (JFs 252 e 256). Esses achados indicam que a presença do halogênio nas porções laterais do referido composto foi significativa no melhoramento da capacidade absorptiva da HSA.

Isso pode indicar que o impedimento estérico característico do bromo, quando presente em ambas as extremidades das porções laterais de um dado composto, pode aumentar consideravelmente a reatividade do anel fenílico, possivelmente, por causa de um aumento na energia de transição entre os elétrons π durante a formação do complexo HSA-ligante, gerando, conseqüentemente, uma maior capacidade absorptiva desta biomolécula. Tal fenômeno pode ter ocorrido devido às mudanças na polaridade em torno do resíduo de triptofano, alterando o microambiente da HSA (HANSANZADEH et al., 2017; RIBEIRO et al., 2021).

No tocante aos derivados portadores de vinil-éster acoplados ao núcleo tiazolidinona, pode-se inferir, a partir dos dados da Tabela 1, que os compostos que apresentam um vinil-éster (etóxi) (JF-250 e JF-254) exibiram uma maior capacidade de elevar o perfil absorptivo da HSA, quando comparados com os portadores do vinil-éster (metóxi) (JF-249 e JF-253). Este resultado indica uma maior contribuição do grupo etóxi na reprodução do efeito hiperacrômico, supostamente, por se tratar de um grupo com um carbono a mais que o grupo metila, influenciando diretamente na transição de elétrons π , o que pode ter gerado mais

efeitos eletrônicos, potencializando o hipercromismo constatado no processo de formação do complexo HSA-ligante.

Resultados semelhantes foram encontrados por Siddiqui et al. (2018), uma vez que os autores realizaram estudos de interação entre a HSA e o fungicida carbendazim, cuja estrutura química contém um éster (metóxi). Entre vários métodos, a absorção UV-vis desmontou a ocorrência de hipercromia no espectro de absorção da HSA quando colocada em contato com concentrações crescentes do citado fungicida, o que levou os autores a concluir que o aumento do perfil absorptivo desta proteína plasmática se deu pela formação do complexo HSA-carbendazim, corroborando a importância da presença do éster (metóxi) no referido processo de interação.

Foi verificada também a leve ocorrência do efeito hipsocrômico (deslocamento do pico máximo de absorção para o azul) para os derivados JFs 251, 252, 255 e 256, com uma variação de 01 nm, indicando mudanças na polaridade em torno do resíduo de triptofano, causando alterações na hidrofobicidade no microambiente da HSA, dado que confirma uma forte interação desta proteína com os derivados e formação do complexo HSA-JF (RIBEIRO et al., 2019).

Os derivados JFs 249 e 254 apresentaram leve batocromia (deslocamento do pico máximo de absorção para o vermelho), apresentando um $\Delta\lambda = 01$ nm, sugerindo a ocorrência de um afrouxamento do microambiente da HSA, levando a mudanças conformacionais nas cadeias polipeptídicas desta biomolécula, após a adição dos compostos acima mencionados (NAIK & SEETHARAMAPPA, 2019).

No que diz respeito a constante de afinidade (K_b) da HSA para com os derivados, é possível observar ainda na Tabela 4 os valores calculados, que em ordem crescente gera a seguinte sequência: **249 < 256 < 253 < 254 < 252 < 251 < 250 < 255**. Percebe-se que o composto com maior afinidade para a HSA também foi o mesmo que apresentou o segundo maior efeito hipercrômico e desvio de 01 nm para o azul (efeito hipsocrômico): o derivado JF-255 ($K_b = 3.65 \times 10^5 M^{-1}$), indicando a relevância da presença do halogênio bromo na posição 5 do grupo farmacofórico indol e na posição *para* do fenil no que tange à deslocalização do pico máximo de absorção para uma faixa de absorção de UV maior, bem como na afinidade com a HSA.

Hipoteticamente, esses efeitos decorreram pela presença dos átomos de bromo, os quais são portadores de pares de elétrons livres, que interagiram com os elétrons em ressonância dos anéis aromáticos dos aminoácidos cromóforos da HSA, ampliando a densidade eletrônica destes núcleos, implicando numa interação de natureza não-covalente, a

qual pode ter ocorrido por empilhamento π - π entre os anéis aromáticos dos derivados e os anéis fenólicos intrínsecos à HSA (CHEN; ZHANG; LIU, 2013).

Do mesmo modo que no resultado observado no efeito hipercrômico acima discutido, o derivado JF-249 apresentou a menor afinidade com a HSA ($K_b = 2.36 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), como também foi responsável por um menor efeito hipercrômico quando comparado ao JF-250 (composto com maior percentual de hipercromia). A diferença entre eles é a presença do grupo metóxi conjugado ao vinil-éster no JF-249, enquanto o JF-250 possui um etóxi ligado ao vinil-éster. Este resultado aponta a relevância do grupo etóxi em causar mais alterações no perfil absorptivo da HSA e em contribuir na afinidade de um ligante com esta biomolécula, em comparação ao grupo metóxi.

O derivado JF-251, com indol não substituído, apresentou um $K_b = 3.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Já o seu análogo (JF-255), portador de um bromo na posição 5 do anel indólico, exibiu um $K_b = 3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, sugerindo que a presença do referido halogênio foi fundamental para elevar a afinidade da HSA pelo ligante, quando acoplado na posição e no grupo farmacofórico supracitados.

Outro fator importante é o fato do JF-255 também ser portador do bromo na posição *para* do fenil, sendo este átomo ausente no JF-256. Possivelmente, a inexistência desta substituição minimizou sua afinidade com a HSA, no processo de interação, porquanto a constante de afinidade calculada para este derivado foi $2.60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (o segundo menor K_b registrado). A presença do halogênio bromo nas extemidades do JF-255 insinua que estes átomos foram cruciais na afinidade deste composto com a HSA. Outra evidência desta premissa é que o derivado JF-252 também mostrou um menor valor da constante de afinidade ($K_b = 3.29 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) quando comparado com o JF-255, aventando que o *p*-bromofenil conjugado ao C-4 do anel tiazol também contribuiu com a afinidade deste derivado com a HSA.

Ainda nesse aspecto, foi constatado que os derivados portadores de bromo na posição 5 do núcleo indólico e de um vinil-éster (metóxi) (JF-253) ou de um vinil-éster (etóxi) (JF-254) apresentaram baixos K_b 's (2.89×10^5 e $2.90 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Esses achados mostram que essas substituições acopladas ao núcleo tiazolidinona não contribuíram com a afinidade destes derivados com a HSA, comparadas ao *p*-bromofenil ligado ao C-4 do núcleo tiazólico, presente no JF-255.

Portanto, os compostos testados mediante a técnica de espectroscopia de absorção UV-vis com a HSA foram capazes de alterar a hidrofobicidade do microambiente intrínseco aos aminoácidos aromáticos da HSA, gerando alterações no seu perfil absorptivo, como

também, demonstrando afinidade para com essa proteína plasmática, maior até mesmo do que a vitamina C, por exemplo, cujo valor de K_b calculado foi de $1.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, segundo estudos de interação com a HSA realizados por Alsamamra; Abusharkh; Abuteir, 2018.

Em linhas gerais, os resultados corroboram que a inserção do bromo seja no C-5 do indol ou na posição *para* do anel fenílico ligado ao C-4 do núcleo tiazol, bem como a presença do vinil-éster (etóxi) conjugado ao grupo tiazolidinona foram importantes para a afinidade entre HSA e os derivados testados, o que ficou evidenciado pelo aumento da absorvidade UV-vis da biomolécula.

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE EMISSÃO FLUORESCENTE COM A HSA E OS DERIVADOS JFS

A fluorescência intrínseca da HSA é muito sensível a seu microambiente. Tal propriedade biofísica se deve a porções químicas, como os aminoácido aromáticos Trp, Phe e Tyr. Contudo, é reportado que a Phe tem um rendimento quântico muito baixo e a fluorescência da Tyr é quase totalmente extinto se for ionizado ou estiver próximo a um grupo amino, a um grupo carboxila ou a um Trp (HASANZADEH et al., 2017; NAIK & SEETHARAMAPPA, 2019). Em razão disto, a fluorescência intrínseca da HSA é essencialmente devido ao Trp-214, presente no Sudlow I, subdomínio IIA, no arcabouço hidrofóbico da proteína (DING et al., 2018). Dessa forma, os residuais de Trp são mais sensíveis às mudanças no microambiente, por este motivo, é amplamente utilizado como uma sonda fluorescente endógena para pesquisar a interação de ligação entre proteínas e protótipo/fármacos (GOUVEIA et al., 2018).

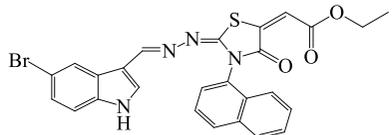
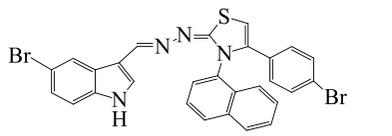
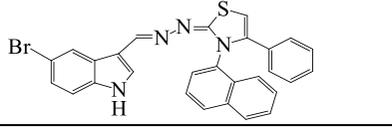
Neste estudo, a solução de HSA ainda livre foi aquecida a temperaturas diferentes (25 °C, 30 °C e 37 °C), revelando picos de emissão fluorescente em diferentes comprimentos de onda (332, 336 e 335 nm, respectivamente) quando excitada em 280 nm. Os JFs, em solução tampão de Tris-HCl (pH 7,6; 0,1 M), nas temperaturas usadas, não apresentaram qualquer emissão na região de 300-400 nm, onde as albuminas séricas têm forte fluorescência sobre excitação em torno de 280 nm (CHAVES et al., 2018; BALAKRISHNAN et al., 2019).

Uma vez ligada aos compostos-teste, a HSA apresentou picos emissivos de 329 nm a 333 nm (a 25 °C), de 329 nm a 343 nm (a 30 °C), e de 329 nm a 340 nm (a 37 °C), indicando êxito na interação HSA-JF. Foi constatado que o percentual de supressão fluorescente atingiu valores de 27.18% a 41.53% (a 25 °C), de 24.50% a 39.72% (a 30 °C), de 21.94% a 36.34% (a

37 °C). Os dados espectroscópicos da emissão fluorescente da HSA, em função de concentrações variadas dos derivados são detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados espectroscópicos de emissão fluorescente da HSA livre e conjugada aos compostos JFs, a 25 °C, 30 °C e 37°C.

JF	Estrutura Química	T (°C)	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^a	Hipo. (%) ^b	K_q (M ⁻¹ s ⁻¹) ^c	K_{sv} (M ⁻¹) ^d	R ^{2(e)}
249		25	332	331	01	27.18	2.75 x 10 ¹²	1.40 x 10 ⁴	0.9971
		30	336	334	02	24.50	1.49 x 10 ¹²	0.76 x 10 ⁴	0.9903
		37	335	333	02	22.92	1.45 x 10 ¹²	0.74 x 10 ⁴	0.9939
250		25	332	333	01	38.24	3.71 x 10 ¹²	1.89 x 10 ⁴	0.9903
		30	336	343	07	34.82	3.49 x 10 ¹²	1.78 x 10 ⁴	0.9904
		37	335	340	05	32.47	3.30 x 10 ¹²	1.68 x 10 ⁴	0.9900
251		25	332	329	03	34.72	3.79 x 10 ¹²	1.93 x 10 ⁴	0.9908
		30	336	329	07	33.52	3.55 x 10 ¹²	1.81 x 10 ⁴	0.9918
		37	335	330	05	30.87	3.43 x 10 ¹²	1.75 x 10 ⁴	0.9941
252		25	332	330	02	30.63	3.65 x 10 ¹²	1.86 x 10 ⁴	0.9931
		30	336	330	06	25.60	3.57 x 10 ¹²	1.82 x 10 ⁴	0.9913
		37	335	329	06	21.94	3.51 x 10 ¹²	1.79 x 10 ⁴	0.9954
253		25	332	331	01	31.81	5.04 x 10 ¹²	2.57 x 10 ⁴	0.9788
		30	336	330	06	30.98	4.93 x 10 ¹²	2.51 x 10 ⁴	0.9907
		37	335	330	05	28.36	4.34 x 10 ¹²	2.21 x 10 ⁴	0.9958

254		25	332	333	01	27.95	3.43×10^{12}	1.75×10^4	0.9939
		30	336	338	02	27.10	3.39×10^{12}	1.73×10^4	0.9934
		37	335	337	02	25.46	3.24×10^{12}	1.65×10^4	0.9981
255		25	332	330	02	41.53	8.52×10^{12}	4.34×10^4	0.9904
		30	336	330	06	39.72	8.07×10^{12}	4.11×10^4	0.9991
		37	335	330	05	36.34	7.99×10^{12}	4.07×10^4	0.9943
256		25	332	331	01	27.95	1.84×10^{12}	0.94×10^4	0.9971
		30	336	330	06	25.35	1.59×10^{12}	0.81×10^4	0.9954
		37	335	330	05	22.79	1.55×10^{12}	0.79×10^4	0.9971

^aDados relacionados ao perfil emissivo da HSA na presença e ausência de concentrações diferentes dos JFs (5-40 μ M), a diferentes temperaturas.

^bHipocromismo resultante da interação da HSA fixada em 10 μ M com concentrações variadas dos compostos-teste (5-40 μ M) em comparação com a HSA livre.

^cContante de supressão bimolecular obtida a partir na fluorescência da HSA na presença de diferentes concentrações dos JFs (5-40 μ M), a diferentes temperaturas.

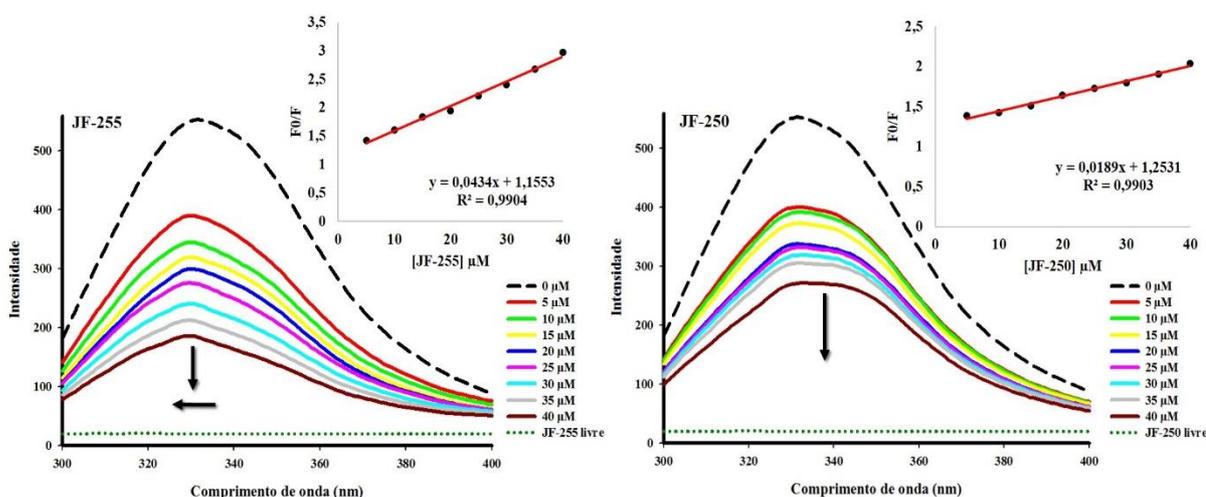
^dConstante de supressão de Stern–Volmer (K_{sv}) obtida com base nos dados de fluorescência com a HSA.

^eCoefficiente de Correlação.

As variações na intensidade e na posição do pico máximo de supressão fluorescente da HSA foram utilizadas para investigar a interação dos novos derivados com esta biomolécula. Os espectros de fluorescência da HSA apresentaram alterações, mostrando diminuição das suas propriedades emissivas. A ordem crescente de hipocromismo segue a seguinte sequência: $249 < 254 = 256 < 252 < 253 < 251 < 250 < 255$. A ocorrência deste efeito espectroscópico reitera a relevância dos substituintes na reprodução deste efeito, confirmando a formação de um aduto resultante do processo de interação dos derivados com a HSA, uma vez que todos os JFs foram capazes de extinguir a fluorescência intrínseca da HSA (LIU et al., 2020).

Coincidentemente, pode-se observar que os compostos responsáveis pelo maior efeito hipocromico da emissão fluorescente da HSA foram os mesmos que provocaram o maior percentual de hipercromismo na absorção UV-vis discutidos previamente: os JFs 255 e 250 (Figura 2). Para o derivado JF-250, observa-se que a presença do vinil-éster (etóxi) acoplado ao anel tiazolidinona pode ter contribuído para a supressão fluorescente da HSA, mesmo não havendo o átomo de bromo na posição 5 do indol. Contudo, para o JF-255, a inserção do halogênio bromo na posição 5 do núcleo indólico e na posição *para* do fenil conjugado ao C-4 do tiazol potencializaram a ocorrência deste fenômeno e, portanto, induziram mudanças no microambiente do triptofano da HSA, a partir da formação do complexo HSA-ligante (CHUGH et al., 2019; CHAVES et al., 2020).

Figura 2. Espectros de supressão fluorescente da HSA (10 μM) na ausência (----) e na presença dos derivados JF's 255 e 250. A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (.....). As setas (\downarrow) e (\leftarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (0-40 μM), à temperatura ambiente, e o efeito hipocromico, respectivamente. Inserido: Gráfico da supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Similarmente aos resultados obtidos no perfil absorptivo da interação da HSA com os JFs, o JF-249 foi o derivado que apresentou o menor percentual de hipocromismo (27.18%), sugerindo que o indol não substituído e a inserção de um vinil-éster (metóxi) conjugado ao núcleo tiazolidinona desfavoreceram não apenas o perfil absorptivo, mas também o processo de supressão emissiva da HSA. Por sua vez, seu análogo JF-243, cuja única diferença é a presença de um bromo na posição 5 do indol, apresentou um valor para o efeito hipocrômico um pouco maior (31,81%), enfatizando a importância do halogênio bromo na indução de alterações no microambiente hidrofóbico do Trp desta proteína plasmática, provavelmente devido às suas propriedades lipofílicas, facilitando a complexação deste derivado pela HSA.

Semelhantemente aos resultados obtidos nos ensaios espectroscópicos de absorção UV-vis para o efeito hiper-crômico, o derivado JF-251 apresentou um menor valor para o efeito hipocrômico (34.72%), quando comparado ao seu análogo JF-255 (41.53%). Lembrando que a diferença entre ambos reside no fato deste último portar um bromo na posição 5 do indol, enquanto o primeiro não o possui, apontando que a presença do bromo nas porções laterais do composto contribuiu significativamente na supressão emissiva da HSA, pois as mudanças observadas indicam que os derivados podem alterar a estrutura de HSA, devido à mudança de polaridade em torno da molécula do fluoróforo (NIAEI et al., 2018).

O mesmo pode-se dizer do derivado JF-254. A análise de absorção UV-vis desse composto no processo de interação com a HSA mostrou que o percentual de hiper-cromismo foi menor que seu análogo JF-250. Em consonância com os dados apresentados na Tabela 2, nota-se que o valor de hipocromismo apresentado pelo JF-254 (27.95%) também foi menor que o mostrado por seu análogo JF-250 (38.24%), aventando que o indol não substituído favoreceu tanto o perfil absorptivo quanto à extinção emissiva da HSA, mesmo ambos possuindo um vinil-éster (etóxi) conjugado ao núcleo tiazolidinona.

Com relação aos compostos JFs 252 e 256, observa-se também um comportamento semelhante ao registrado nos ensaios espectroscópicos de absorção UV-vis. O primeiro apresentou um valor mais alto para o efeito hipocrômico (30.63%) do que o segundo (27.95%), demonstrando que, para esses análogos, o indol não substituído contribuiu leve e positivamente para a reprodução deste efeito, mesmo ambos possuindo um fenil não substituído acoplado ao C-4 do anel tiazólico. Comparando-os com o JF-251, é possível observar que a presença de um *p*-bromofenil contribuiu ainda mais com a extinção da fluorescência intrínseca da HSA (34.72%), mesmo com a ausência de um bromo na posição 5 do anel indol. Já a presença do bromo, em ambas as posições mencionadas, melhorou a capacidade de supressão da HSA do JF-255 (41.53%), como discutido previamente.

Tais resultados sugerem que o caráter hidrofóbico e eletronegativo do referido halogênio pode contribuir circunstancialmente em alterações nas propriedades da HSA, elevando-as ou minimizando-as, a depender de sua posição no ligante e dos grupos/núcleos químicos aos quais o referido halogênio esteja ligado.

Os derivados JFs testados neste trabalho são providos de anéis heterocíclicos nitrogenados (núcleos indol, tiazol e tiazolidinona), o que contribui relevantemente com a hidrofobicidade, auxiliando, portanto no processo de interação com a HSA, sobretudo, se estiverem ligados a grupos substituintes que compartilham da mesma propriedade físico-química de hidrofobicidade como é o caso do halogênio bromo, visto que a extinção de fluorescência refere-se à redução da intensidade fluorescente reproduzida mediante o processo de interação proteína-ligante (RAO et al., 2020).

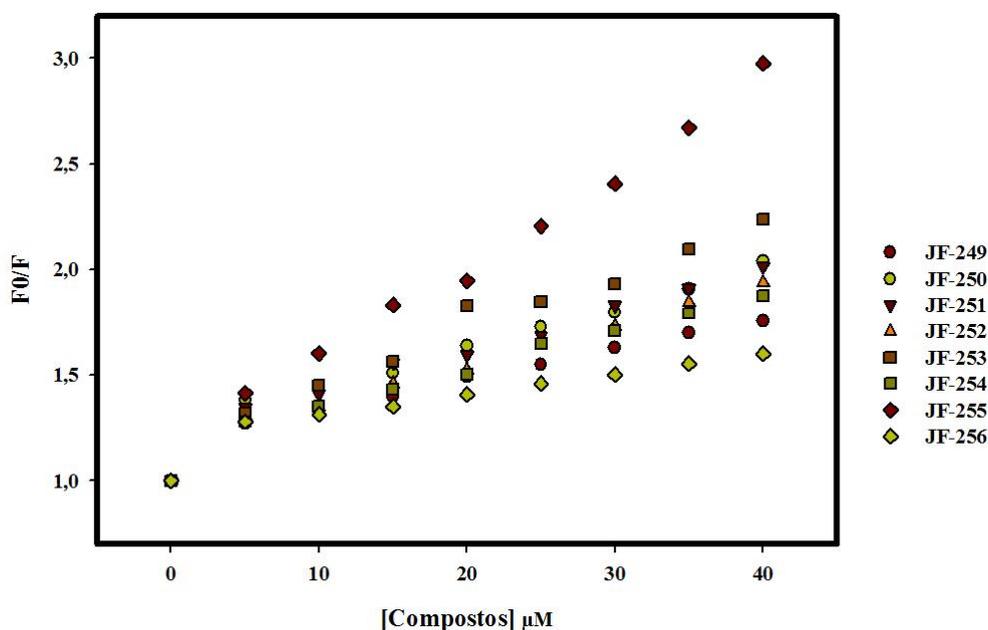
Os dados da Tabela 2 revelam também a leve ocorrência do efeito hipsocrômico (deslocamento do pico máximo de emissão fluorescente para o azul) para os derivados JF-249, JF-253 e JF-256 ($\Delta\lambda = 01$ nm), JF-252 e JF-255 ($\Delta\lambda = 02$ nm) e JF-251 ($\Delta\lambda = 03$ nm). Nesse aspecto, é reportado na literatura que o deslocamento do pico máximo de supressão para a região do azul evidencia que o fluoróforo da proteína foi colocado em um ambiente mais hidrofóbico com a adição do ligante. Provavelmente, devido à perda da estrutura compacta do subdomínio hidrofóbico IIA, onde está situado o Trp da HSA (BANERJEE et al., 2020).

Moghadam et al. (2019) investigaram os mecanismos de interação entre o fármaco triantereno com a HSA mediante técnicas multi-espectroscópicas, entre elas a extinção da fluorescência. Este medicamento possui em sua estrutura química um anel fenílico não substituído, semelhante aos compostos JF-252 e JF-256. Os autores observaram a ocorrência da diminuição da emissão fluorescente da HSA, com desvio do pico máximo de emissão para a região do azul (efeito hipsocrômico) de 6 nm, fato que se assemelha aos achados aqui com supressão da fluorescência intrínseca da HSA e hipsocromismo de 2 nm e 1 nm, respectivamente. Tais resultados consolidam a relevância do fenil não substituído na minoração da polaridade do microambiente do Try-214, auxiliando no processo de interação e formação do complexo JF-HSA, provavelmente devido ao efeito de ressonância do anel fenílico.

No que diz respeito a constante de supressão fluorescente (K_{sv}) da HSA, determinada por regressão linear da intensidade de emissão relativa (F_0/F), em função das concentrações crescentes dos novos derivados (LAKOWICZ, 2006) (Figura 3), é possível observar na Tabela 2 os valores calculados para cada composto, a partir dos quais pode-se depreender a seguinte

sequência de ordem crescente: **256 < 249 < 254 < 252 < 250 < 251 < 253 < 255.**

Figura 3. Intensidade de fluorescência relativa dos novos derivados, no complexo HSA-ligante, em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6).



Percebe-se que o composto que apresentou uma maior constante de supressão fluorescente ao interagir com a HSA também foi o mesmo responsável pelo desvio do pico de máximo de emissão fluorescente para o azul ($\Delta\lambda = 2\text{nm}$) e o que apresentou o maior valor para a constante de afinidade ($K_b = 3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), na absorção UV-vis: o derivado JF-255. Ou seja, a presença do halogênio bromo na posição 5 do grupo indol e de um *p*-bromofenil ligado ao C-4 do anel tiazólico contribuiu na supressão da emissão fluorescente desta proteína plasmática, uma vez que o seu similar, o JF-251, portador do indol não substituído teve uma capacidade extintora da emissão fluorescente da HSA menos expressiva, ficando com o terceiro maior valor da constante de supressão (K_{sv}), e também na mesma colocação para a constante de afinidade ($K_b = 3.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), na absorção UV-vis.

Resultados similares foram descritos por Chaves et al. (2020), os quais sintetizaram novos derivados de naftiridina e, entre outros ensaios, realizaram testes de interação entre os novos compostos e a HSA. Uma das técnicas utilizadas foi a de extinção da emissão fluorescente, a partir da qual os autores registraram um valor para a constante de supressão (K_{sv}) de $4.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para um dos derivados (1d), cuja porção lateral é portadora de um *p*-bromofenil, o qual teve o segundo maior valor calculado para o K_{sv} , ratificando a relevância do referido substituinte à ocorrência do fenômeno de supressão fluorescente da HSA, cujo valor de K_{sv} é aproximado ao registrado pelo JF-255 ($K_{sv} = 4.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Ainda nessa perspectiva, o JF-249 ficou com a penúltima posição no que diz respeito ao percentual da constante de supressão fluorescente da HSA. Apesar disto, permaneceu bem distante da posição alcançada por seu análogo, o JF-253, o qual obteve o segundo maior valor para a referida constante. Esse fato corrobora a importância do halogênio bromo na posição 5 do indol, uma vez que ambos possuem o substituinte vinil-éster (metóxi) acoplado ao anel tiazolidinona, como outrora discutido.

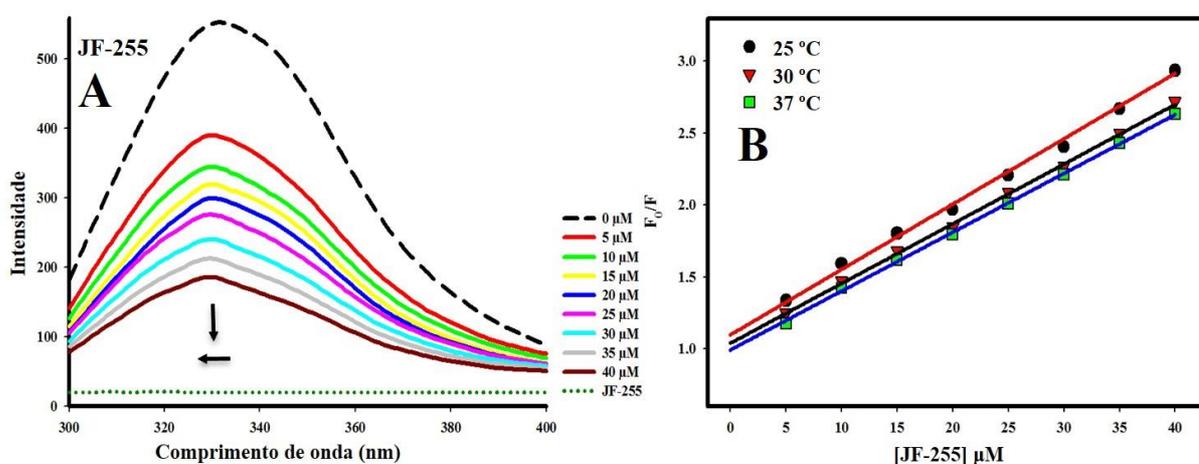
É possível observar que os compostos JF-254 e, sobretudo, o JF-256 (ambos com bromo na posição 5 do indol) apresentaram baixo valor para o K_{sv} (0.94×10^4 e $1.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, nessa ordem), quando comparados aos seus análogos JF-250 e JF-252, respectivamente. Estes registraram um valor de K_{sv} aproximado (1.82×10^4 e $1.86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, nessa ordem), lembrando que o primeiro é portador de um vinil-éster (etóxi) acoplado ao anel tiazolidinona; o segundo, de um fenil não substituído acoplado ao C-4 do núcleo tiazol. Seus análogos acima mencionados não potencializaram a supressão emissiva da HSA, apesar da presença do halogênio bromo na posição 5 do indol. Esse fato mostra que a presença do referido átomo volumoso não fez com que os JF's 254 e 256 ocasionassem uma alteração significativa na polaridade do microambiente em que está situado o Trp da HSA, porquanto a fluorescência intrínseca desta proteína é extremamente sensível a alterações no referido microambiente (MOGHADAM et al., 2019).

Mediante a análise da Tabela 2, foi constante que os valores da contante de supressão fluorescente (K_{sv}) e da constante bimolecular (K_q) diminuíram com o aumento da temperatura, outro indício que sugere a formação do complexo HSA-JFs. O intervalo observado foi de $1,45 \times 10^{12}$ a $8,52 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. É bem reportado pelos pesquisadores que quando há uma extinção fluorescente do tipo dinâmica, os valores observados para o K_q não excedem $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ARUMUGAM et al., 2016). Portanto, esses dados indicam a ocorrência da extinção intrínseca da HSA, a partir de um mecanismo de supressão do tipo estático (BINJAWHAR et al., 2023).

Como supracitado, sabe-se que uma característica valiosa da fluorescência de uma proteína é a alta sensibilidade do Trp ao seu próprio microambiente, uma vez que mudanças no espectro de emissão de Trp são comuns em resposta a vários processos (ERKMEN et al., 2023). Com base nisso, os espectros fluorescentes dos complexos HSA:JFs indicaram que, com o aumento da concentração dos JFs, nas três temperaturas testadas, vários efeitos espectroscópicos foram notados (Tabela 2), com destaque para o sistema HSA:JF-255, no qual houve um leve deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão para o azul para as três temperaturas utilizadas (Figura 4). Isso sugere que a conformação e/ou o

microambiente da HSA foram alterados na presença de JF-255 (RIBEIRO et al., 2021). Outrossim, pode-se deduzir que o fluoróforo da proteína foi colocado em um ambiente mais hidrofóbico após a adição do composto acima mencionado. Isso ocorreu provavelmente devido à perda da estrutura compacta do subdomínio hidrofóbico IIA, onde o Trp se situa (BANERJEE et al., 2020).

Figura 4. (A) Espectros de emissão do derivado JF-255 (40 μM) livre (.....) e de HSA (3 μM) livre (--) e ligada a quantidades crescentes do composto mencionado acima (5,10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\leftarrow) referem-se a efeitos hipocrômico e hipsocrômico, respectivamente. (B) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre o derivado JF-255 e a HSA, sob três diferentes temperaturas.



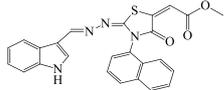
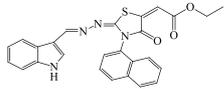
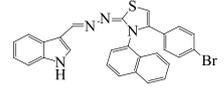
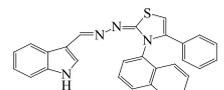
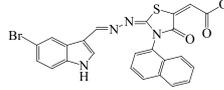
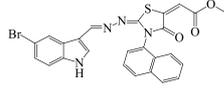
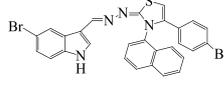
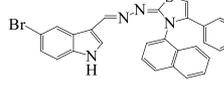
ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE FLUORESCÊNCIA SÍNCRONA DA HSA E OS DERIVADOS JFS

A espectroscopia de fluorescência síncrona é uma ferramenta aplicável que fornece informações valiosas sobre o ambiente molecular na vizinhança de um cromóforo e identifica possíveis mudanças na estrutura da proteína (ASEMAN et al., 2019). Nesta técnica, os monocromadores de excitação e emissão são varridos sincronizadamente, separados por um intervalo de comprimento de onda constante ($\Delta\lambda$).

Quando $\Delta\lambda$ é estabilizado em 15 nm, a fluorescência síncrona de HSA é característica de um resíduo de Tyr, e quando $\Delta\lambda$ é fixado em 60 nm, um espectro característico de resíduos de Trp é obtido (NIU et al., 2023). Quando os resíduos de aminoácidos estão em um ambiente mais hidrofóbico e menos expostos ao solvente, um deslocamento para o azul de λ_{max} é observado, enquanto um desvio para o vermelho de λ_{max} significa que os resíduos de aminoácidos estão em um ambiente polar e estão mais expostos ao solvente (ASEMAN et al.,

2019). Os dados espectroscópicos de fluorescência síncrona obtidos de interação de HSA com os derivados JFs, a temperatura ambiente, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Informações espectroscópicas da fluorescência síncrona da HSA na presença e ausência dos derivados JFs (3-30 μM), a temperatura ambiente.

Composto	Estrutura química	$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$				$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$			
		$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$(\Delta\lambda)$ (nm) ^a	Hip. (%) ^b	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$(\Delta\lambda)$ (nm) ^a	Hip. (%) ^b
JF-249		301	301	-	14.89	340	341	01	18.58
JF-250		301	301	-	56.05	340	341	01	60.18
JF-251		301	303	02	36.89	340	340	-	42.61
JF-252		301	303	02	28.78	340	340	-	19.18
JF-253		301	301	-	26.30	340	342	02	54.60
JF-254		301	302	01	33.92	340	341	01	34.59
JF-255		301	302	01	26.05	340	341	01	35.75
JF-256		301	302	01	46.44	340	341	01	60.08

^aDados relacionados à extinção fluorescente da HSA na ausência e na presença de diferentes concentrações dos JFs (3-30 μM), com $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ou com $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$.

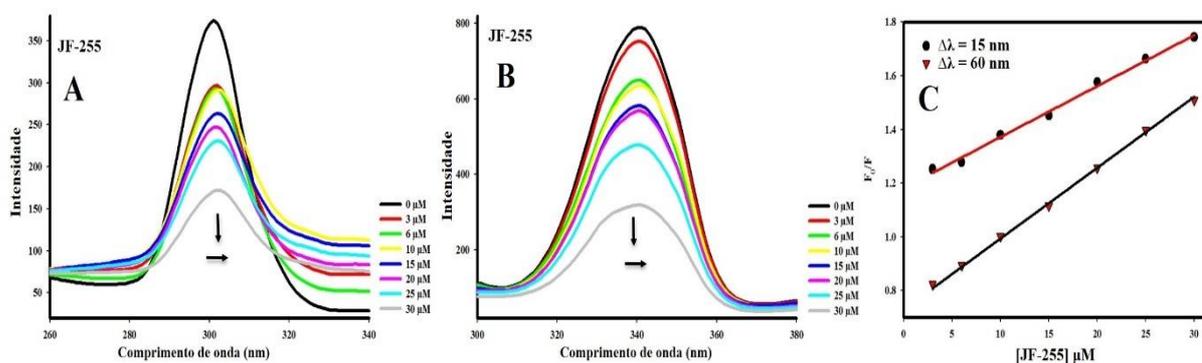
^bHipocromismo resultante da interação entre a HSA e os JFs em comparação com a HSA livre (3 μM), com $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ou com $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$.

Todos os oito derivados JFs induziram extinção da fluorescência síncrona da HSA em ambos os intervalos de comprimento de onda, atingindo uma faixa de 19,18% a 56,05% em $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, e uma faixa de 18,58% a 60,18% em $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. Além disso, notou-se que a

supressão fluorescente da HSA foi constantemente maior em $\Delta\lambda = 60$ nm, o que significa uma maior extensão do efeito supressivo da intensidade fluorescente do Trp em comparação com a de Tyr (NAIK & SEETHARAMAPPA, 2019).

As informações de fluorescência síncrona apresentadas na Tabela 3 não mostraram mudanças em $\Delta\lambda = 15$ nm para os JFs 249, 250 e 253, enquanto um pequeno desvio para o vermelho de 1 nm (JFs 249 e 250) e de 2 nm (JF-253) foi observado em $\Delta\lambda = 60$ nm. Ademais, foi observada uma extinção emissiva da HSA após a adição dos JFs 251 e 252 em $\Delta\lambda = 15$ nm e em $\Delta\lambda = 60$ nm, com uma mudança no comprimento de onda de emissão do resíduo Tyr de 301 a 303 nm (Tabela 3). Esse fenômeno mostra que os microambientes em torno de Tyr e Trp resíduos foram perturbados pelos derivados, tornando-se menos hidrofóbico (RUDRA et al., 2017). As Figuras 5A e B mostram os respectivos síncronos espectros de fluorescência de HSA em $\Delta\lambda = 15$ nm e em $\Delta\lambda = 60$ nm após a adição de concentrações crescentes de um representante desses três compostos, ou seja, o derivado JF-255.

Figura 5. Espectros de fluorescência síncrona de HSA (3 μ M) na ausência e presença de adições sucessivas do derivado JF-255 (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M) a $\Delta\lambda = 15$ nm (A) e $\Delta\lambda = 60$ nm (B), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se aos efeitos hipocrômico e batocrômico, respectivamente. (C) O gráfico de Stern-Volmer da supressão fluorescente síncrona da HSA pelo JF-255.



Como pode ser visto nas Figuras 5A e B, a intensidade de fluorescência intrínseca de HSA diminuiu com o aumento gradual da concentração de JF-255 em ambos os perfis com $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm. A partir desses resultados, ficou evidente que a hidrofobicidade em torno do Trp e Tyr resíduos aumentou, o que retrata diretamente as mudanças causadas na conformação de HSA (NIU et al., 2023). Além disso, esses resultados indicam que por aumentando a concentração de JF-255, o resíduo Trp mostrou-se mais forte extinção (35,75%) e depois a do resíduo Tyr (26,05%). O desvio para o vermelho no pico de emissão ($\Delta\lambda = 1$) contribuiu para o aumento da polaridade em o microambiente de Trp-214. O desvio

para o vermelho e a intensidade decrescente também se relacionam com a conformação alterada de HSA sob a influência de JF-255 vinculativo a ele (MAURYA et al., 2019).

No entanto, quando $\Delta\lambda$ foi fixado em 15 nm, o espectro de fluorescência síncrona de Tyr mostrou desvio para o vermelho de 1 nm (301-302), sugerindo assim a perturbação do microambiente em torno do resíduo de Tyr e expondo-o a um ambiente mais hidrofílico (SIDDIQUI et al., 2018). Além disso, é mostrado na Figura 5C que a inclinação foi maior quando $\Delta\lambda = 60$ nm, indicando que JF-255 estava mais próximo do Trp do que dos resíduos Tyr. Isso implica que o sítio de ligação do JF-255 estava mais próximo dos resíduos Trp. Em outras palavras, o microambiente dos resíduos de Trp foram mais influenciados do que aqueles de resíduos de Tyr (BINJAWHAR et al., 2023). Portanto, é possível inferir que a presença de bromo de halogênio principalmente na posição 5 do grupo farmacofórico indol contribuiu para a perturbação do microambiente em torno de ambos os resíduos de Tyr e Trp, especialmente para o último.

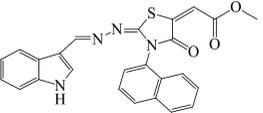
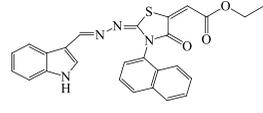
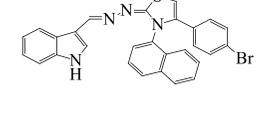
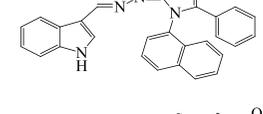
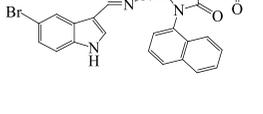
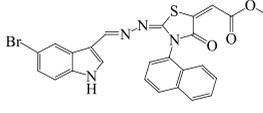
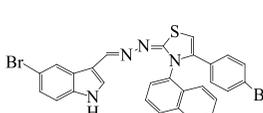
ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE COMPETIÇÃO COM SÍTIO-MARCADORES FLUORESCENTES ENTRE A HSA E OS DERIVADOS JFS

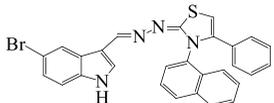
Interações de ligantes com HSA ocorrem principalmente em duas ligações distintas sítios localizados em cavidades hidrofóbicas, ou seja, sítios I e II. O sítio I (localizado no subdomínio IIA) é dominado por fortes interações hidrofóbicas com ligantes, enquanto o sítio II (localizado no subdomínio IIIA) possui principalmente interações dipolo-dipolo, van der Waals e/ou ligações de hidrogênio (RIBEIRO et al., 2021).

Estudos de cristalografia de raios X mostraram o subdomínio IIA como um dos principais sítios favoráveis à ocorrência de interações com ligantes hidrofóbicos. Fármacos como a indometacina pode se ligar especificamente ao sítio I. Já o sítio II, exibe afinidade com ibuprofeno, entre outros medicamentos (RABBANI et al., 2019). Em geral, indometacina e ibuprofeno, ambos agentes anti-inflamatórios não esteróides, são considerados como sondas e/ou ligantes específicos para o sítio I e o sítio II, respectivamente, e são usados como sondas para ensaios de interação com a HSA (RIBEIRO et al., 2021).

Assim, para fornecer mais informações sobre o sítio de ligação dos derivados JFs com a HSA, experimentos de deslocamento foram realizados com os dois medicamentos acima citados como sítio-marcadores específicos. Os dados de emissão fluorescente em HSA-Indometacina e complexos HSA-Ibuprofeno na ausência e na presença de compostos JF são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de emissão fluorescente dos complexos HSA-Indometacina e HSA-Ibuprofeno na ausência e na presença dos compostos JFs.

Composto	Estrutura química	HSA-Indometacina				HSA-Ibuprofeno			
		Ksv (M ⁻¹) ^a	R ^{2b}	Hip. (%) ^c	Δλ (nm) ^d	Ksv (M ⁻¹) ^a	R ^{2b}	Hip. (%) ^c	Δλ (nm) ^d
JF-249		1.49 x 10 ⁴	0.9973	41.57	01	1.33 x 10 ⁴	0.9918	7.26	01
JF-250		4.89 x 10 ⁴	0.9929	57.41	02	1.82 x 10 ⁴	0.9940	7.81	02
JF-251		6.14 x 10 ⁴	0.9951	59.62	01	2.96 x 10 ⁴	0.9936	25.40	01
JF-252		7.94 x 10 ⁴	0.9964	46.53	01	3.43 x 10 ⁴	0.9922	22.25	01
JF-253		12.83 x 10 ⁴	0.9971	51.20	01	9.93 x 10 ⁴	0.9930	19.79	01
JF-254		3.08 x 10 ⁴	0.9903	52.76	01	2.98 x 10 ⁴	0.9933	19.65	01
JF-255		7.02 x 10 ⁴	0.9939	51.75	01	3.28 x 10 ⁴	0.9948	38.87	01

JF-256		5.77×10^4	0.9925	38.09	01	4.74×10^4	0.9924	17.31	-
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------	--------	-------	----	--------------------	--------	-------	---

^aValores da constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) obtidos a partir da fluorescência dos complexos HSA-Indometacina e HSA-Ibuprofeno na presença de diferentes concentrações dos JFs (3-30 μM).

^bCoefficiente de correlação.

^cHipocromismo resultante da interação entre os JFs e os complexos HSA-Indometacina e HSA-Ibuprofeno, em comparação com os complexos livres.

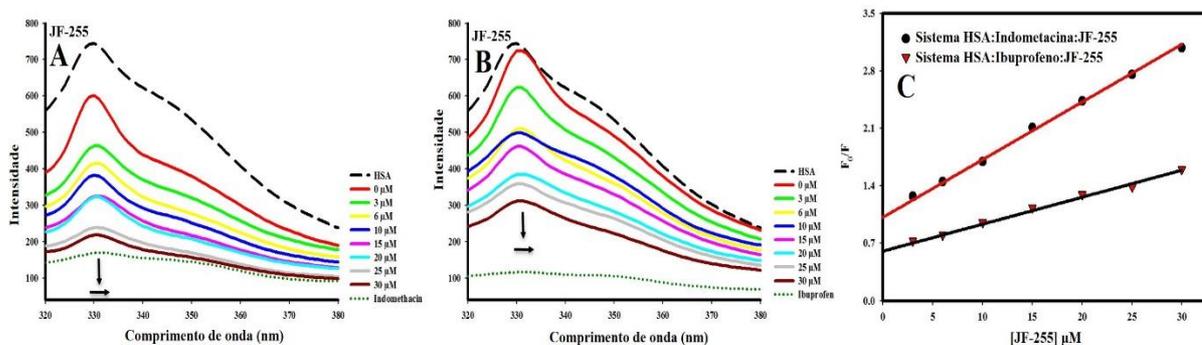
^dEfeito Batocrômico observado do perfil emissivo dos complexos HSA-Indometacina e HSA-Ibuprofeno na presença de diferentes concentrações dos JFs (3-30 μM).

Todos os oito derivados JFs causaram supressão fluorescente dos sistemas HSA-indometacina e HSA-Ibuprofeno, sendo as faixas de hipocromismo calculadas num intervalo de 38,09% a 59,62% e de 7,26% a 38,87%, respectivamente. Também, os valores de Ksv atingiram as faixas de $1,49 \times 10^4$ a $12,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $1,33 \times 10^4$ a $9,93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para ambos os sistemas, nesta ordem.

Em outras palavras, os valores de extinção e Ksv diminuíram notavelmente após a adição de concentrações crescentes dos compostos-teste, especialmente para o complexo HSA-indometacina, incluindo a ocorrência de deslocamentos para a região espectral do vermelho (efeito batocrômico). Esses resultados indicam que os JFs competem principalmente com a indometacina no subdomínio IIA (Sudlow I) (WU et al., 2018).

Particularmente, o composto JF-255 apresentou a maior porcentagem de extinção (59,62%) para o sistema HSA-Indometacina comparado aos demais JFs. Os espectros para ambos os complexos, bem como o gráfico de Stern-Volmer de interação com o referido composto-teste são representados na Figura 6.

Figura 6. Espectros do teste de deslocamento da indometacina do complexo HSA:indometacina (A) e do ibuprofeno do complexo HSA:ibuprofeno (B) pelo derivado JF-255. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se a efeitos hipocromicos e batocrômicos, respectivamente. (C) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os sistemas HSA:sítio-marcadores e o composto JF-255, a temperatura ambiente. [Indometacina] = [Ibuprofeno] = 3 μM ; [HSA] = 3 μM e [JF-255] = 3–30 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$.



Com base nas Figuras 6A e B, é possível notar uma diminuição na intensidade de emissão após a adição do derivado JF-255 aos complexos HSA-Indometacina e HSA-Ibuprofeno. Curiosamente, a competição da indometacina com o JF-255 é maior se comparada ao ibuprofeno. A diminuição na intensidade de emissão do complexo HSA-Indometacina (59,62%) foi maior em comparação ao registrado para o sistema HSA-Ibuprofeno (38,87%). Os valores de Ksv determinados para o sistema HSA: Indometacina: sistema JF-255 ($7,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) foram significativamente maiores em comparação com o sistema HSA:Ibuprofeno:JF-255 ($3,28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Embasando-se nesses dados, é possível depreender que JF-255 se ligou ao sítio I (subdomínio IIA) da HSA, bem como, é mostrado na Figura 6C que a inclinação foi maior para o sistema HSA:Indometacina:JF-255, corroborando que o citado composto-teste competiu com a indometacina principalmente pelo sítio I (subdomínio IIA), deslocando-o de seu sítio de ligação (WU et al., 2018).

Por fim, vale ressaltar que o fármaco indometacina possui um anel indol em sua estrutura química, como os derivados JFs. Isso provavelmente contribuiu substancialmente para sua competição com a indometacina para o sítio I, se comparada à concorrência com ibuprofeno, especialmente para alguns compostos contendo bromo na posição 5 do anel indol (JFs 255 e 253), cujos valores de K_{sv} e porcentagem de supressão fluorescente foram as mais elevadas, em comparação com os outros compostos.

À luz dos efeitos constatados nos estudos de interação dos derivados JFs com a HSA, usando as técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis e supressão da emissão fluorescente, a partir das quais foram evidenciadas nítidas alterações nos espectros absorptivos e emissivos, pode-se inferir que os novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas são promissores candidatos à fármacos, uma vez que interagem significativamente com a HSA, dada a constatação da formação do complexo HSA-JF (ERKMEN et al., 2023; NIU et al., 2023).

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR ENTRE OS NOVOS DERIVADOS JFS E A HSA

Para melhor compreender os resultados espectroscópicos obtidos em função da interação dos JFs com a HSA, estudos de docking molecular foram realizados para determinar possíveis sítios de ligação dos compostos a referida proteína plasmática.

A interação molecular entre os ligantes e a HSA (PDB-ID: 2BXM) foi analisada para obter informações sobre os modos de ligação (GHUMAN et al., 2005). Os ensaios de docking foram baseados na hipótese proposta pelos estudos espectroscópicos, que sugerem uma interação entre HSA (no seu resíduo de Trp-214) e os compostos-teste. Este aminoácido faz parte do sítio de ligação I da HSA, localizado no subdomínio IIA (Figura 7A) (RIBEIRO et al., 2019). A Tabela 5 abaixo apresenta as pontuações de encaixe dos compostos-teste com a indometacina:

Tabela 5. Pontuações de encaixe calculadas a partir das ligações entre os receptores da HSA com os JFs e com o fármaco indometacina.

Composto	Pontuação do Encaixe
JF-249	94.31
JF-250	100.59
JF-251	115.01
JF-252	112.41
JF-253	99.00
JF-254	102.12
JF-255	119.29
JF-256	110.16
Indometacina	98.25 ^a

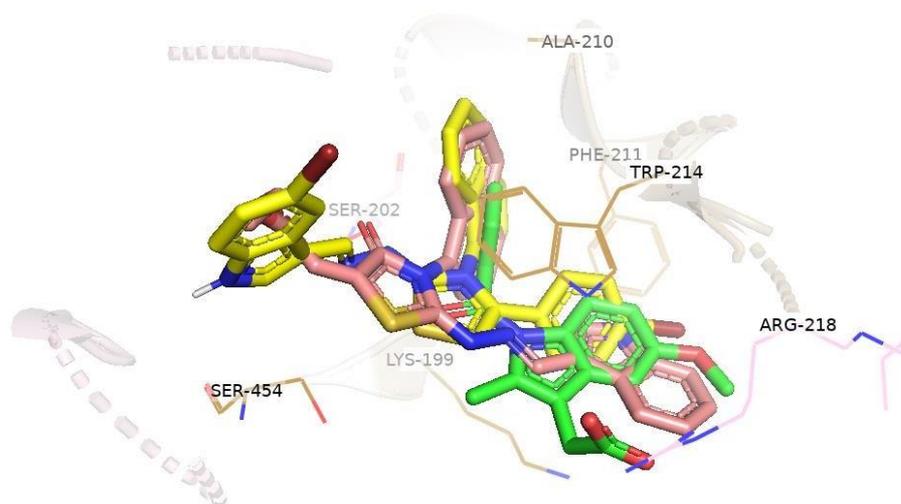
^aO RMSD encontrado para o redocking foi 0.42

Pode-se perceber que dentre todos os derivados JFs, os compostos indol-tiazólicos, substituídos ou não, apresentaram uma maior pontuação, ou seja, uma maior afinidade com a HSA, sobretudo, o derivado JF-255 (bromo-dissubstituído).

É importante ressaltar também que os estudos espectroscópicos de absorção e emissão fluorescente indicaram como composto destaque, dentro da classe dos indoís-tiazolidinonas, o JF-250 (dietil-acetileno não substituído), ficando em segundo lugar nos valores de K_b e K_{sv} , sendo o derivado que apresentou o maior valor de hipercromismo.

Portanto, os resultados mostrados na Tabela 5 corroboram os resultados dos estudos espectroscópicos de interação dos JFs com a HSA, outrora discutidos. Embasando-se nisso, a Figura 7 mostra o encaixe molecular de ambos os compostos, com a HSA.

Figura 7. Comparação conformacional do resultado do ancoramento molecular para o JF-250 (rosa claro), JF-255 (amarelo) e indometacina (verde). Os compostos apresentaram maior afinidade pela HSA, quando comparados aos demais de suas respectivas classes.



A seguir, na Figura 8, O ligante acoplado (destaque nos ensaios espectroscópicos: JF-255) ocupa a mesma região que a ligação HSA e mostra orientações muito semelhantes ao ligante cristalográfico, conforme mostrado na Tabela 6 e nas Figuras 8 e 9.

Tabela 6. As afinidades de ligação da HSA com o JF-255 e com a Indometacina.

Composto	Pontuação de encaixe	Resíduos	Átomos	Distância (Å)	Tipo de Interação	
JF-255	119.29	Leu 198	Hidrotiazol	5.13	Hidrofóbica ^a	
			Anel indol	5.27		
		Lys 199	Anel	4.96	Hidrofóbica ^a	
			hidrotiazol	5.12		
		Ser 202	Anel indol	1.87	Ligação de hidrogênio convencional	
		Ala 210	Anel	4.27	Hidrofóbica ^a	
		Phe 211	Anel	Br	4.79	Hydrophobic ^b
					3.86	Hidrofóbica ^a
		Trp 214	Anel	hidrotiazol	3.94	Hidrofóbica ^b
					5.49	
		Ala 215	Br	3.49	Hidrofóbica ^c	
		Leu 238	Br	4.42	Hidrofóbica ^c	
		His 242	Br	4.94	Hidrofóbica ^a	
		Val 344	Br	3.13	Hidrofóbica ^c	
		Ser 454	N ₂	2.54	Ligação de hidrogênio convencional	
		Leu 457	Anel indol	5.35	Hidrofóbica ^a	
		Leu 481	Anel	4.13	Hidrofóbica ^a	
		Arg 484	Anel indol	Anel	4.06	Hidrofóbica ^a
4.91						
Arg 485	Br	Anel indol	4.54	Hidrofóbica ^c		
			5.38	Hidrofóbica ^a		
Indometacina	98.25 ^d	Lys 199	Anel	4.33	Eletrostática ^e	
		Ala 210	Cl	3.94	Hidrofóbica ^c	
		Phe 211	Anel	Anel indol	5.16	Hidrofóbica ^b
					4.44	
		Trip 214	Anel indol	Anel	4.44	Hidrofóbica ^b
					4.69	
		Arg 218	O ₁	O ₂	2.70	Ligação de hidrogênio convencional
					2.82	

^a Pi-Alquil; ^b Pi-Pi empilhadas; ^c Alquil; ^d O RMSD encontrado para o redocking foi 0.42; ^e Pi-cátion.

Figura 8. (A) Sítio de Ligação analisado da HSA (PDB ID: 2BXM) com seus respectivos domínios. (B) Ilustração detalhada das forças polares de ligação do JF-255 (amarelo) e da Indometacina (verde) com os residuais de aminoácidos circundantes.

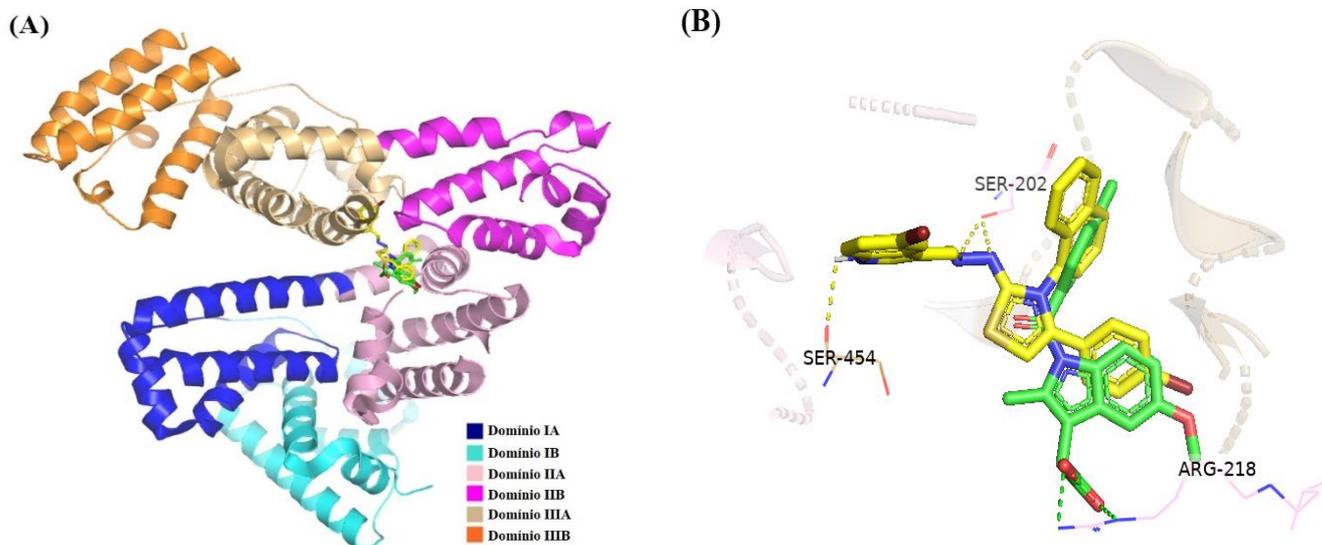
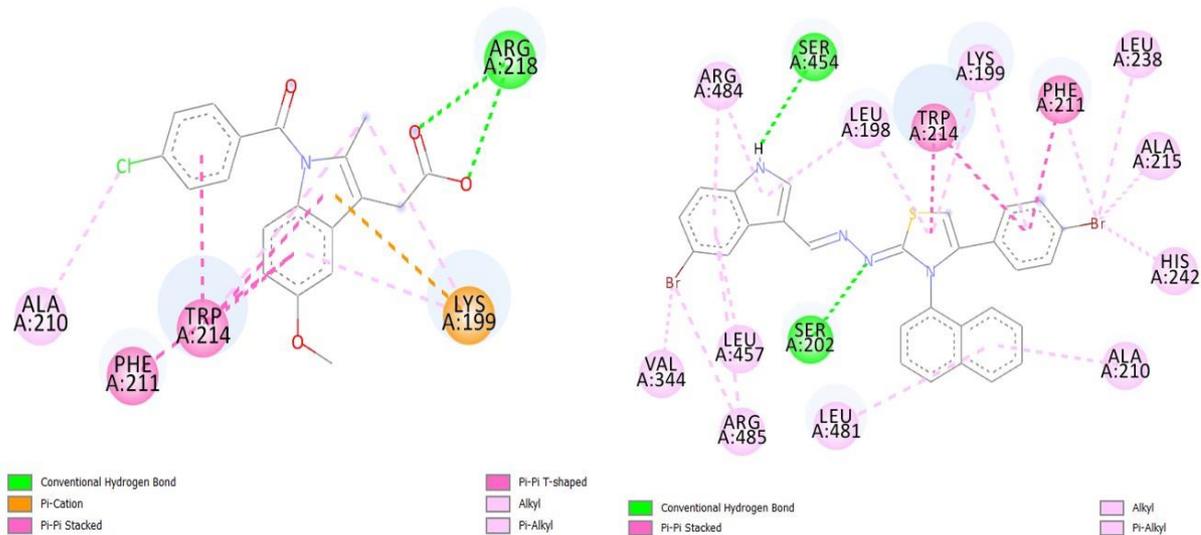


Figura 9. À direita, as interações moleculares do complexo, disponível no PDB, da Indometacina com a HSA são mostradas na figura. À esquerda, uma ilustração detalhada das forças de ligação do JF-255 com os resíduos de aminoácidos circundantes. As interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogênio foram responsáveis pelo encaixe induzido a partir da interação do JF-255 com a HSA.



A maioria das interações da HSA com o JF-255, assim com a indometacina, ocorreu na região do domínio IIA. No entanto, também foram encontradas interações nos domínios IIB e IIIA da HSA, o que corrobora a melhor pontuação de encaixe do JF-255 com a HSA quando comparado à indometacina (Tabela 5). De maneira geral, os compostos indol-tiazólicos apresentaram melhores pontuações, pois apresentaram mais pontos de interação hidrofóbica com o receptor, principalmente com o bromo em R₂ (JF-251 e JF-255).

Ao analisar os resultados da interação com os derivados indol-tiazolidinonas, as

substituições em R₃ com grupos alquil mais volumosos favoreceu o ajuste com a HSA (JF-250 e JF-254). Estes resultados convergem com os resultados espectroscópicos de competição com o sistema HSA-Indometacina, mostrados anteriormente.

Conforme descrito acima, as interações com os resíduos de Trp são excelentes indicadores de ligação dos JFs com HSA, portanto, a distância de ligação entre os derivados indólicos e o Trp foi avaliado após os resultados do anacramento molecular. O composto JF-255 apresentou a menor distância de ligação ao resíduo em questão (3,94 Å) através da interação hidrofóbica de empilhamentos de ligações Pi.

CONCLUSÃO

Oito derivados indol-tiazóis e indol-tiazolidinonas foram submetidos a estudos *in vitro* e *in silico* de interação com a HSA, mediante as técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis e de emissão fluorescente, bem com a técnica de ancoramento molecular. A partir dos estudos de interação com uso das técnicas supracitadas, concluiu-se que os compostos interagiram com esta biomolécula, formando o complexo HSA-JF, especialmente o composto JF-255 (di-substituído com bromo), o qual apresentou o maior valor tanto para a constante de afinidade ($K_b = 3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) quanto para a constante de supressão fluorescente ($K_{sv} = 4.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), mostrando assim, em ambos os casos, alta afinidade e a indução de alterações no microambiente intrínsecos da HSA. O estudo molecular de ancoramento corroborou os resultados *in vitro*, comprovando a forte interação da HSA com o JF-255, no mesmo sítio que o controle (indometacina). A existência de mecanismo de supressão estática durante a formação dos sistemas HSA-JF foi verificada por estudos espectroscópicos. O estudo de fluorescência síncrona também revelou que a conformação de HSA foi alterada, e a polaridade preferencialmente ao redor do resíduo Trp foi alterado na presença dos derivados. Por fim, os resultados obtidos com as sondas sítio-marcadores (indometacina e ibuprofeno) revelou o subdomínio IIA (sítio I de Sudlow) como o local preferencial de interação para os compostos-teste com a HSA.

REFERÊNCIAS

- ALSAIF, N. et al. Multi-spectroscopic investigation, molecular docking and molecular dynamic simulation of competitive interactions between flavonoids (quercetin and rutin) and sorafenib for binding to human serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, Part B, p. 2451-2461, 2020.
- ALSAMAMRA, H.; ABUSHARKH, S.; ABUTEIR, M. Comparative Studies on the Interaction of Human and Bovine Serum Albumins with Vitamin C. **European Journal of Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 17–22, 2018.
- ALVES, J. E. F. et al. Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 622–635, 2021.
- ARUMUGAM, S. S.; SUBRAMANIAN, S.; MALAICHAMY, I. New insights into the dimerization and site-specific cooperative interaction of Azure B with model transport proteins by spectroscopic and computational studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 212-225, 2016.
- ASEMAN, M. D. et al. Cycloplatinated(II) Derivatives of Mercaptopurine Capable of Binding Interactions with HSA/DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 58, p. 16154–16170, 2019.
- BAIG, M. H. et al. Multi-Spectroscopic Characterization of Human Serum Albumin Binding with Cyclobenzaprine Hydrochloride: Insights from Biophysical and In Silico Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20 (3), 662, 2019.
- BALAKRISHNAN, G. et al. Synthesis, photophysics and the binding studies of rhenium(I) diimine surfactant complexes with serum albumins: A spectroscopic and docking study approach. **Journal of Luminescence**, n. 205, p. 51–60, 2019.
- BANERJEE, A. et al. Synthesis, structure and characterization of new dithiocarbazate based mixed ligand oxidovanadium(IV) complexes: DNA/HSA interaction, cytotoxic activity and DFT studies. **New Journal of Chemistry**, v. 44, p. 10946-10963, 2020.
- BINJAWHAR, D. N. et al. Probing the interaction of zinc oxide nanorods with human serum albumin: A spectroscopic approach. **Journal of Biotechnology**, v. 362, p. 36–44, 2023.
- CHAVES, O. A. et al. Biological assays of BF₂-naphthyridine compounds: Tyrosinase and acetylcholinesterase activity, CT-DNA and HSA binding property evaluations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 1114–1129, 2020.
- CHAVES, O. A. et al. Synthesis, tyrosinase inhibition and transportation behavior of novel β - enamino thiosemicarbazide derivatives by human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 280–290, 2018.
- CHEN, Z.; ZHANG, J.; LIU, C. Study on the interaction between a water-soluble dinuclear nickel complex and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Biomaterials**, p. DOI 10.1007/s10534-013-9663-x, 2013.

CHUGH, H. et al. Interaction of noscapine with human serum albumin (HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, v. 372, p. 168–176, 2019.

DING, X. et al. Study of the interaction of broad-spectrum antimicrobial drug sitafloxacin with human serum albumin using spectroscopic methods, molecular docking, and molecular dynamics simulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 160, p. 397–403, 2018.

ERKMEN, C. et al. Exploring molecular interaction of cefpirome with human serum albumin: In vitro and in silico approaches. **Journal of Molecular Structure**, v. 1275, 134723, 2023.

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

GHUMAN, J. et al. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, p. 38-52, 2005.

GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.

HASANZADEH, A. et al. Multispectral and molecular docking studies on the interaction of human serum albumin with iohexol. **Journal of Molecular Liquids**, v. 248, p. 459-467, 2017.

HUANG, S. et al. Conformational structure variation of human serum albumin after binding interaction with black phosphorus quantum dots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 405–414, 2020.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 727–748, 1997.

KAUR, A. et al. Probing the binding ability of vitamin B₁ with bovine serum albumin: Calorimetric, light scattering, spectroscopic and volumetric studies. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 127, p. 59–70, 2018.

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

LIU, K.; DING Y.; KANG, C. Synthesis and antiproliferative activity of new *n*-acylhydrazone derivatives containing benzothiazole and indole based moiety. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 4, 2020.

LUCENA, Maria Luiza Cavalcanti. Desenvolvimento de metodologia simplificada de obtenção de selante de fibrina autólogo com incorporação de agente antimicrobiano à formulação. 2022. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

MAURYA, N. et al. In vitro cytotoxicity and interaction of noscapine with human serum albumin: effect on structure and esterase activity of HSA, **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, p. 952–966, 2019.

MCGHEE, J. D.; HIPPEL, P. H. VON. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions : Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, n. 2, p. 469–489, 1974.

MOGHADAM, N. H. et al. In vitro cytotoxicity and DNA/HSA interaction study of triamterene using molecular modelling and multi-spectroscopic methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, 2019.

NAIK, R.; SEETHARAMAPPA, J. Spectral and computational attributes: Binding of a potente anticancer agent, dasatinib to a transport protein. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, 111492, 2019.

NIAEI, N.; HASSANZADEH, M.; SHADJOU, N. Molecular interaction of some cardiovascular drugs with human serum albumin at physiological-like conditions: A new approach. **Journal of Molecular Recognition**, v. 31, n. 8, p. 1–9, 2018.

NIU, T. et al. Unveiling interaction mechanisms between myricitrin and human serum albumin: Insights from multi-spectroscopic, molecular docking and molecular dynamic simulation analyses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 285, 121871, 2023.

PAWAR, S.; OTTOOR, D. Spectroscopic and molecular docking study to understand the binding interaction of rosiglitazone with bovine serum albumin in presence of valsartan. **Journal of Luminescence**, v. 197, p. 200–210, 2018.

RABBANI, G. et al. Binding of Tolperisone Hydrochloride with Human Serum Albumin: Effects on the Conformation, Thermodynamics, and Activity of HSA. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15 (4), p. 1445–1456, 2018.

RABBANI, G.; AHN, S.N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 979-990, 2019.

RAO, H. et al. Mechanistic and conformational studies on the interaction of human serum albumin with rhodamine B by NMR, spectroscopic and molecular modeling methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 316, 113889, 2020.

RIBEIRO, A. G. et al. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Medicinal Chemistry Research**, v. 30, p. 1469–1495, 2021.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 111592, 2019.

RUDRA, S. et al. Characterization of domain specific Interaction of Synthesized Dye with Serum Proteins by Spectroscopic and Docking Approaches along with Determination of *In vitro* Cytotoxicity and Antiviral Activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 14, p. 3773–3790, 2017.

SIDDIQUI, M. F. et al. Deciphering the binding of carbendazim (fungicide) with human serum albumin: A multi- spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. doi.org/10.1080/07391102.2018.1481768, 2018.

WU, J. et al. Study on the interaction of fisetholz with BSA/HSA by multi-spectroscopic, cyclic voltammetric and molecular docking technique. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, doi.org/10.1080/07391102.2018.1518789, 2018.

ZHANG, H.; DENG, H.; WANG, Y. Comprehensive investigations about the binding interaction of acesulfame with human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 237, 118410, 2020.

CAPÍTULO IV

6 ESTUDOS CITOTÓXICOS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α DE DERIVADOS INDOL-TIAZOIS E INDOL-TIAZOLIDINONAS

Os resultados descritos neste capítulo serão submetidos no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*.

FATOR DE IMPACTO: 7.088

QUALIS CAPES: A1



European Journal of Medicinal Chemistry

RESUMO

A enzima Topoisomerase II α é considerada um dos alvos promissores de moléculas com potencial atividade anticâncer, pois é vista como um fator preponderante à condução de diversos eventos que resultam em morte celular. Esse trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* a atividade inibitória da enzima topoisomerase II α humana por derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas, além de testes citotóxicos com linhagem tumoral de mama e ensaios de hemólise com os derivados mais promissores. Foi constatado que os derivados inibiram a atividade da Topo II α em 50 μ M, com destaque para os compostos JF-252 (não-substituído) e JF-253 (vinil éster - etóxi - com bromo no C-5 do anel indólico). Outro fato observado deste ensaio, é que a inibição enzimática foi mais significativa para os JFs (compostos ciclizados), em comparação com o LT-51, que não é ciclizado (derivado indol-tiossemicarbazona); mostrando, portanto, que a ciclização pode, possivelmente, potencializar a capacidade inibitória Topo II α . Os compostos mais promissores na atividade antitopoisomerase II α , bem como na interação com o DNA e na HSA (JFs 252, 253, 255 e 256) tiveram sua atividade hemolítica analisada e comparada com o fármaco antitumoral *m*-AMSA (Amsacrina). Os resultados apontam uma insignificante hemólise dos compostos testados, em relação ao fármaco controle. A técnica de ancoramento molecular dos compostos

com o sistema Topo II α -DNA apontou um bom ajuste dos JFs à cavidade enzimática (especialmente os derivados tiazólicos), cujo encaixe molecular ocorre principalmente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas com o DNA. Tais resultados indicam uma possível contribuição dos substituintes propostos na inibição da enzima Topo II α , sobretudo, os portadores do fenil com ou sem bromo na posição *para* e do bromo na posição 5 do indol.

Palavras-chaves: Indol. Tiazol. Tiazolidinonas. Topoisomerase. Citotoxicidade. Hemólise.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todos os países do mundo com cerca de 18 milhões de casos de vários tipos de câncer são diagnosticados a cada ano. Segundo previsões da OMS, esse número deve chegar a 29,4 milhões em 2040 (OMS, 2022). Por este motivo, um importante objetivo de pesquisas oncológicas é o desenvolvimento de quimioterápicos novos por meio da identificação de alvos biológicos que possam ser usados na terapia antitumoral (LIANG et al., 2019). Com base nisso, um dos alvos bem explorados nas investigações terapêuticas antitumorais são as enzimas topoisomerases, em virtude de suas funções essenciais no controle de uma variedade de problemas topológicos do DNA durante processos celulares vitais, como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SINGH et al., 2023). Em especial, a Topoisomerase II α tem sido priorizada nos estudos de inibição enzimática por ser considerada um biomarcador na proliferação de células, devido à sua superexpressão durante este processo fisiológico celular (SHINDE et al., 2022). Em razão disto, agentes que afetam as funções das topoisomerases são considerados atraentes para a terapia do câncer, pois podem causar danos que desencadeiam uma série de eventos celulares, induzindo apoptose e, conseqüentemente, a morte celular (ALMEIDA et al., 2017).

Os heterocíclicos são compostos altamente versáteis com amplas atividades biológicas. Inúmeros derivados portadores dos anéis indol, tiazol e tiazolidinona com atividade anticancerígena têm sido sintetizados, inclusive com o halogênio bromo como substituinte (ALVES et al., 2021) a fim de intensificar o seu potencial de modular distintos alvos moleculares terapêuticos como a enzima topoisomerase II α (SHINDE et al., 2022). Outra característica importante é a biocompatibilidade de novos compostos, que é um dos principais parâmetros determinantes, visando uma fortuita aplicação biomédica. Um dos

principais testes para determinar a toxicidade de compostos é analisar sua atividade hemolítica (JASIEWICZ et al., 2023), pois uma taxa de hemólise elevada e/ou significativa exclui o composto de ser considerado uma alternativa terapêutica (SILVA et al., 2017).

Diante dessas evidências, vários derivados portadores dos grupos indol, tiazol e tiazolidinona têm sido sintetizados, a exemplo de Alves et al., 2021, que sintetizaram e caracterizaram novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas, cuja capacidade e mecanismo de interação com biomoléculas, como o DNA e HSA já foram investigados. No presente trabalho, os oito derivados foram utilizados em estudos mais aprofundados, no intuito de avaliar *in vitro* e *in silico* sua capacidade de inibição da enzima Topoisomerase II α , além de analisar o potencial citotóxico com linhagem tumoral de mama (MCF-7) e o perfil hemolítico dos derivados destaques de vários ensaios outrora realizados.

MATERIAS E MÉTODOS

OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS-TESTE, INSUMOS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e métodos utilizados na síntese e caracterização dos oito derivados indol-tiazólicos (JFs 251, 252, 255 e 256) e indol-tiazolidinonas (JFs 249, 250, 253 e 254) utilizados neste trabalho, bem como as etapas de obtenção dos referidos compostos foram descritos por Alves et al., 2021. As estruturas químicas dos derivados estão apresentadas no esquema 1 do capítulo 2 (página 68).

A enzima Topoisomerase II α , o pUC19, as linhagens tumorais de mama MCF7 e T47D, a sulforrodamina, o meio de cultura RPMI-1640, o soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos foram comercialmente adquiridos pela Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Os dados absorptivos utilizados para a construção dos gráficos no ensaio de atividade hemolítica, bem como para os cálculos do ensaio antiproliferativo foram colhidos a partir do Espectrofotômetro de microplacas Thermo ScientificTM MultiskanTM GO (Waltham, MA, Estados Unidos). O sangue colhido para a realização do protocolo hemolítico foi coletado de voluntários saudáveis (MUKHOPADHYAY et al., 2019).

ATIVIDADE ANTITOPISOMERASE II α COM OS DERIVADOS JFS

Para avaliar a capacidade de inibição da enzima topoisomerase II α pelos derivados JFs, foram utilizados 100 ng de DNA do Plasmídeo pUC19 e 4 UI de topoisomerase II α humana recombinante em tampão de relaxamento (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP e 0,5 mM ditioneitol) (ALMEIDA et al., 2016). As soluções-teste foram incubadas por 45 min, a 37°C. Os compostos, bem como o controle positivo (*m*-AMSA), foram testados na concentração de 50 μ M. A eletroforese em gel de agarose (0,8%) foi aplicada e o brometo de etídio utilizado para corar o gel e facilitar a visualização das bandas sob luz UV. Para análise qualitativa dessas bandas (DNA superenovelado e relaxado) foi utilizado o software de processamento de imagem (Adobe Photoshop CS4 11.0x2007, San Jose, CA, EUA).

A avaliação quantitativa das bandas de gel correspondentes ao DNA superenrolado foi realizado por densitometria usando um software de processamento de imagem (ImageJ, versão 1.51). As densidades ópticas das bandas para cada derivado JF, bem como de todos os controles (apenas o plasmídeo, DNA + Topo II α e DNA + Topo II α + *m*-AMSA) foram obtidos a partir dos valores de densidade média, os quais foram usados para calcular a porcentagem de inibição enzimática dos compostos em relação à *m*-AMSA (controle positivo).

Excepcionalmente, além dos derivados JFs, no protocolo deste ensaio foi usado o composto LT-51, um derivado indol-tiossemicarbazônico (ou seja, não ciclizado), portador do núcleo naftil. O referido derivado foi sintetizado e caracterizado por Oliveira et al., 2017, os quais também testaram a capacidade inibitória Topoisomerase II α deste composto, cujos resultados foram promissores, a uma concentração de 50 μ M. O intuito de utilizá-lo no citado protocolo é comparar os resultados, a fim de corroborar se o processo de ciclização de tiossemicarbazonas em tiazóis e tiazolidinonas pode potencializar a capacidade de inibição do referido alvo enzimático, dada a semelhança estrutural do LT-51 com “esqueleto químico” dos JFs.

ESTUDOS *IN SILICO* DE ANCORAMENTO MOLECULAR DOS DERIVADOS JFS COM A ENZIMA TOPOISOMERASE II α

Os derivados indólicos tiveram suas estruturas tridimensionais otimizadas com base na teoria semiempírica no Nível PM6 usando o software Spartan 14. Posteriormente, foram

submetidos ao estudo de ancoramento molecular através do programa Gold 5.8.1, utilizando a função empírica ChemPLP. O modelo cristalográfico com código PDB 5gwk (Topo II α humana em complexo com DNA) foi usado como receptor para o estudo (WANG et al., 2017). A metodologia do estudo foi validada através da reprodução do encaixe do etoposideo (ligante co-cristalizado) à TopoII α -DNA (RMSD = 0,48). Os resultados teóricos foram analisados e as interações intermoleculares avaliadas para os compostos com maior pontuação no encaixe (*score*), explorados pelos programas Discovery Studio 2017R2 e Pymol 2.3.2. A análise interpretativa dos resultados encontrados baseou-se nas correlações estrutura/afinidade dos derivados estudados, assim como em comparações diretas realizadas com os controles positivos utilizados (amsacrina e etoposideo) (DE ALMEIDA et al., 2021; GILAD; SENDEROWITZ, 2014; SOUSA et al., 2022).

ESTUDOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS DERIVADOS JFS 252, 253, 255 E 256

A ação hemolítica dos JFs em eritrócitos humanos foi estudada a partir da coleta de sangue de voluntários saudáveis. Uma amostra de 5 ml do sangue humano coletado foi três vezes lavada em solução salina (0,9% de NaCl), sendo centrifugada, entre cada lavagem, a 2500 rpm, por 5 minutos, para garantir a ausência de quaisquer resquícios de plasma, formando, no final, uma solução concentrada de hemácias. Logo depois, foi preparada uma solução-mãe de hemácias a 0,5% (250 μ l da solução concentrada + 50 ml da solução salina). Paralelamente, cada um dos compostos usados nesse ensaio foram diluídos em 1% de DMSO, gerando suas respectivas soluções-mãe, numa concentração final de 1mM.

A partir das soluções-mãe foram preparadas as soluções-teste, contendo cada uma 2 ml da solução-mãe de eritrócitos. Seguidamente, os compostos-teste foram adicionados em concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μ M, em triplicata. Uma solução contendo 2 ml de hemácias com 10 μ l de solução salina correspondeu ao controle negativo (0% de hemólise) e outra com 2 ml de eritrócitos adicionada de 10 μ l de Triton X-100 (agente hemolisante), a 1%, foi usada como controle positivo (100% de hemólise).

Após incubação em temperatura ambiente por uma hora, as soluções foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, a 4 °C para separar o sobrenadante do *pellet*. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços de fundo plano, para leitura em um espectrofotômetro, num comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada usando a Equação (GEHRCKE et al., 2017):

% de Hemólise = $[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}) / (\text{Abs}_{\text{controle positivo}})] \times 100$, onde:

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a Absorbância da solução-teste (Hemácias + JFs), $\text{Abs}_{\text{controle negativo}}$ é a Absorbância do controle negativo (Hemácias + Solução Salina) e $\text{Abs}_{\text{controle positivo}}$ é a Absorbância do controle positivo (Hemácias + Triton).

ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO COM OS DERIVADOS JFS

As culturas celulares foram cultivadas em 5 mL de RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (1 mL/L RPMI-1640) foi adicionado às culturas experimentais. A linhagem celular MCF-7 foi aplicadas em placas de 96 poços (100 μL de células/poço) e foram expostos a diferentes concentrações das amostras dos compostos-teste JFs (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) em DMSO, a 37 °C, 5% CO_2 , por 48 h.

A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. As células foram então fixadas com solução de ácido tricloroacético (50%) e a proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo de proteína celular, usando o ensaio da sulforrodamina B (ALMEIDA et al., 2015; 2016). A *m*-AMSA foi usada como controle positivo. A incubação de 48 h foi baseada no protocolo NCI60, proposto por NCI/EUA para uma triagem de estudos antiproliferativos. A partir da curva concentração-resposta para cada linhagem celular, os valores de TGI – *Total Growth Inhibition* (concentração necessária para inibir o crescimento celular total) foram determinados por meio de análise de regressão não linear utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Os experimentos foram realizados em triplicata.

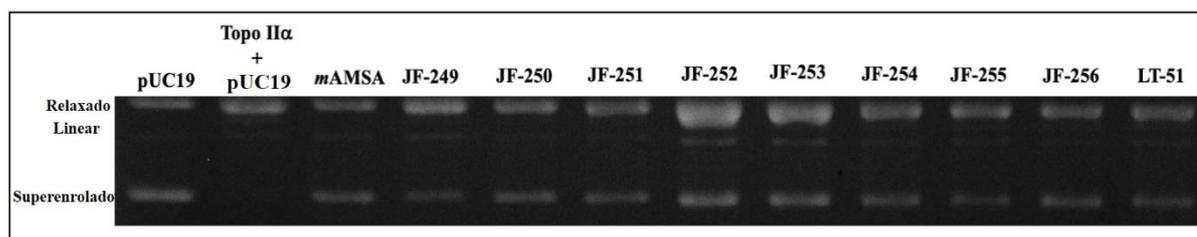
RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA

A capacidade inibitória da Topo II α pelos novos derivados foi investigada, o que pode auxiliar na elucidação de seu mecanismo de ação. Os oito compostos foram avaliados no ensaio de relaxamento de plasmídeo de DNA. Este ensaio consistiu na avaliação da atividade enzimática Topo II α na ausência e presença dos JFs seguido de análise de eletroforese (ALMEIDA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2019). O plasmídeo circular pUC19 pode existir em

três conformações topológicas distintas: DNA superenrolado e circular, DNA circular e relaxado e DNA linear, todos os quais têm sequências idênticas, mas migram em taxas diferentes através do gel de agarose. Devido à sua natureza compacta, topoisômeros de DNA superenrolados migram mais rápido através da agarose em comparação ao DNA linear e ao DNA relaxado (OLIVEIRA et al., 2017; FILHO et al., 2019). Os resultados para os derivados testados estão na Figura 1, abaixo.

Figura 1. Efeito da *m*-AMSA, dos derivados indol-tiazólicos, indol-tiazolidinonas e do análogo LT-51 na concentração de 50 μ M, no ensaio de inibição enzimática da Topo II α .



Quando a enzima está ativa, o plasmídeo migra como uma única banda e muito mais lentamente (segunda linha). Por outro lado, a inibição da Topo II α resulta em um padrão de banda semelhante ao DNA plasmidial (primeira linha), fato evidenciado ao analisar o padrão de migração da *m*-AMSA com formação do DNA linear (terceira linha), resultado do efeito inibitório da religação das fitas clivadas do DNA pela Topo II α (complexo de clivagem). Ou seja, se o composto estiver ativo contra a atividade enzimática, a banda superhelicoidal do DNA estará presente no gel de eletroforese (GOUVEIA et al., 2018). Respalhando-se nos resultados analisados a partir da técnica de eletroforese realizada, é possível observar que os oitos novos derivados foram capazes de inibir a atividade da referida enzima quando comparados à *m*-AMSA (controle positivo), na concentração de 50 μ M. A formação de topoisômeros de DNA indica uma estabilização do complexo de clivagem formado entre a enzima, o plasmídeo e os compostos (OLIVEIRA et al., 2017).

O surgimento de bandas de DNA linear indica que os compostos também atuaram como venenos da Topo II α (HASINOFF et al., 2012). Esta categoria de inibidores aumenta a concentração de complexos de clivagem por duas vias não mutuamente exclusivas: eles inibem a capacidade da enzima de ligar moléculas de DNA clivadas ou aumentam a taxa direta de clivagem de DNA mediada pela enzima (ROGOJINA et al., 2012). O sítio ativo das enzimas topoisomerase é uma bolsa rica em arginina e lisina com carga positiva condensada que permite interações eletrostáticas com os grupos fosfato do DNA carregados negativamente (ALMEIDA et al., 2016).

Estes resultados corroboram investigações científicas relacionadas a diversas substâncias com atividade antitopo II α , cujas estruturas químicas possuem o anel indólico, como o estudo de Figueiredo et al. (2014), no qual os autores realizaram testes de inibição enzimática Topo II α usando alcaloides indólicos β -carbolina, os quais inibiram a atividade enzimática em concentrações de 1 μ M e 25 μ M. Já o estudo conduzido por Schwandt et al. (2012) mostrou que um análogo do antibiótico rebecamicina, cuja estrutura química possui um anel indolcarbazol e está na fase II de estudos clínicos terapêuticos anticâncer, apresenta ação dual antitopo, ou seja, este composto tem a capacidade de inibir ambas as topoisomerases (Topo I e Topo II α). Por sua vez, na investigação dirigida por Kashyap et al. (2013), os resultados de inibição enzimática revelaram que os derivados indenoindolonas testados também exibiram atividade inibitória frente à Topo II α , a 100 μ M, sem promover intercalação com o DNA. Tais estudos comprovam a importância do núcleo indol, enquanto farmacóforo potencializador da ação antitopoisomerase II α .

No que tange aos núcleos tiazol e tiazolidinona, há poucas investigações concatenando-os a uma inibição potencial da atividade Topo II α . No entanto, no estudo conduzido por Salem et al. (2016) um dos derivados testados foi uma acridina-tiazolidinona, cuja ação inibitória enzimática foi constada a 5 μ M. Outro estudo realizado por Choi et al. (2006) mostrou a ação antitopo II α de benzotiazóis. Alguns deles apresentaram porcentagens de inibição enzimática expressivas (84%, 89%) em relação ao controle positivo (etoposídeo) (58%), a 100 μ M. Estes dados respaldam a importância destes grupos farmacofóricos no tratamento anticâncer, enfocando a referida enzima como alvo terapêutico.

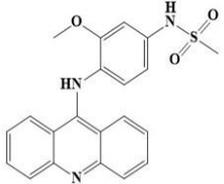
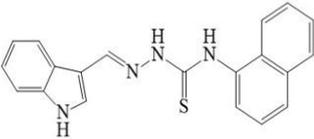
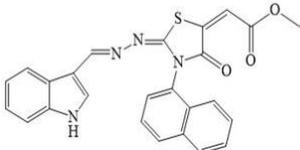
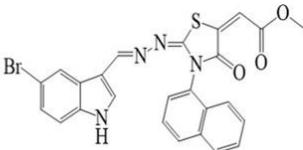
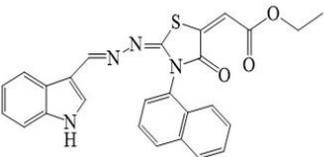
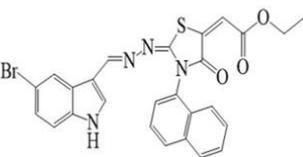
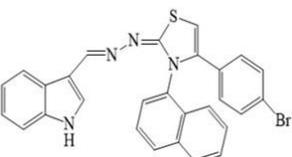
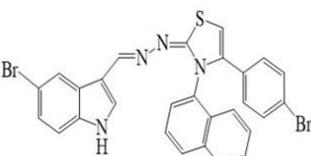
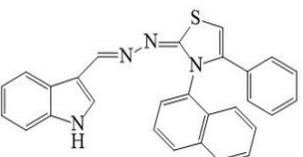
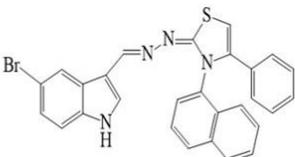
O composto LT-51 foi sintetizado segundo Oliveira et al. (2017), sendo selecionado propositalmente por ser portador de um anel indólico e de um naftil acoplado ao grupo tiossemicarbazona, a fim de comparar os efeitos da inibição da Topo II α a partir de um derivado indólico-tiossemicarbazônico em relação aos JFs, os quais possuem o núcleo naftil em seu “esqueleto químico”, portando um indol substituído ou não na posição 5. Outra diferença a ser pontuada é que as tiossemicarbazonas foram ciclizadas, gerando os derivados JF's com núcleos tiazóis e tiazolidinonas. Os resultados corroboram os achados dos autores supracitados, uma vez que o LT-51 inibiu a atividade enzimática, assim como os compostos testados aqui, inferindo que a ciclização da tiossemicarbazona contribuiu positivamente para a manutenção da atividade inibitória da referida enzima, na mesma concentração usada pelos referidos autores (50 μ M).

Tais resultados confirmam os achados de Filho et al. (2019), os quais realizaram teste de inibição enzimática Topo II α usando dois derivados acridina-tiossemicarbazonas

substituídos com fenil (3a) e naftil (3h), os quais mostraram considerável inibição da atividade enzimática em 100 μM , principalmente para o portador do substituinte fenil, aventando que a inserção destes grupos bem como a ciclização da tiossemicarbazona em tiazóis e tiazolidinonas foram cruciais à consecução da inibição enzimática e numa menor concentração (50 μM) comparada a que foi utilizada pelos citados autores.

Nessa mesma perspectiva, os valores médios de intensidade obtidos por resultados de densitometria foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição enzimática para melhor analisar o efeito, como pode ser constatado na Tabela 1:

Tabela 1. Percentual de atividade inibitória Topo II α da *m*-AMSA, do LT-51 e dos derivados JFs, em 50 μM .

Composto	Estrutura Química	% de inibição enzimática	Composto	Estrutura Química	% de inibição enzimática
<i>m</i> -AMSA		100%	LT-51		68%
JF-249		65%	JF-253		100%
JF-250		87%	JF-254		83%
JF-251		81%	JF-255		68%
JF-252		100%	JF-256		85%

Fonte: o autor

A partir dos dados da Tabela 1, é possível averiguar quantitativamente a capacidade inibitória da Topo II α , em 50 μ M, a partir dos novos derivados indólicos, suscitando a seguinte sequência crescente do percentual de inibição: **JF-249 < JF-255 = LT-51 < JF-251 < JF-256 < JF-254 < JF-250 < *m*-AMSA = JF-253 = JF-252**. Nota-se que os JFs 253 e 252 foram os derivados que inibiram totalmente a atividade enzimática similarmente ao controle positivo *m*-AMSA. Ao comparar este primeiro com seu respectivo análogo, percebe-se que a presença do bromo na posição 5 do indol contribui significativamente no processo inibitório, elevando sua capacidade inibitória, quando equiparado ao seu análogo JF-249, cujo percentual de inibição foi parcial (65%), ressaltando que ambos possuem um vinil-éster (metóxi) acoplado ao núcleo tiazolidinona.

Ainda nessa concepção, Ribeiro et al. (2019) realizaram ensaios de inibição enzimática Topo II α , utilizando derivados quinolinas-tiossemicarbazonas. Dentre os compostos testados, houve derivados portadores dos substituintes naftil (JF-89), *p*-bromofenil (JF-93) e fenil não substituído (JF-96), cuja atividade antitopo II α foi constatada a 10 μ M. Segundo os autores, os substituintes halogenados presentes em alguns compostos, como o JF-93, conferiram um caráter eletrônico e hidrofóbico positivos, influenciando no processo inibitório enzimático e que substituintes hidrofóbicos, como o naftil e o fenil, presentes em alguns compostos também contribuíram para a melhoria da atividade inibitória enzimática abordada.

Já com relação ao derivado JF-256, podemos deduzir que a presença do halogênio bromo na posição 5 do indol desfavoreceu levemente o processo inibitório enzimático (85%), quando comparado ao seu análogo JF-252 (indol não substituído) (100%), uma vez que ambos possuem um fenil não substituído acoplado ao C-4 do núcleo tiazol. A explicação pode estar relacionada ao fato do JF-256 ser portador de um átomo volume como o bromo, o que pode ter ocasionado um impedimento estérico na sua conformação, interferindo na interação com o sítio ativo da enzima e, por conseguinte, na inibição Topo II α .

Semelhantemente, o derivado JF-251 obteve um percentual inibitório (81%) melhor que o seu análogo JF-255 (68%), mesmo ambos possuindo um *p*-bromofenil acoplado ao C-4 tiazólico, sugerindo que a mono-substituição pelo bromo foi mais eficaz que a di-substituição pelo mesmo elemento químico no que diz respeito a sua capacidade inibitória. O mesmo pode ser constatado ao se comparar os derivados JFs 251, 252, 255 e 256. O primeiro e o último apresentaram porcentagens de inibição muito aproximadas (81% e 85%, respectivamente), o que indica a relevância da mono-substituição pelo bromo no efeito inibidor da Topo II α em relação ao di-substituído JF-255, que mostrou o menor percentual de inibição (68%), sendo

este antagonico ao JF-252, sem substituições no indol e no fenil, com uma inibição enzimática total, semelhante à *m*-AMSA, na concentração de 50 μ M.

Gouveia et al. (2018) também sugeriram em seu estudo com espiroacridinas que uma di-substituição pelo halogênio cloro desfavoreceu a atividade inibitória Topo II α (15.91%) quando comparado ao seu análogo portador de uma mono-substituição pelo mesmo elemento químico (61.70%), a 100 μ M. Esses achados reforçam os resultados discutidos no parágrafo anterior, visto que o halogênio usado para os JFs (bromo) é mais volumoso que o cloro, indicando que a inserção deste halogênio em posições diferentes provavelmente causa um impedimento estérico, prejudicando a inibição da enzima, conforme concluído pelos referidos autores.

Todavia, o JF-250, que foi um dos melhores nos testes de interação com a HSA, teve uma atividade inibitória um pouco maior (87%) quando comparada ao seu análogo JF-254 (83%), mesmo ambos possuindo um vinil-éster (etóxi) acoplado ao anel tiazolidinona. Para este caso, deduz-se que a presença do halogênio bromo na posição 5 do indol também desfavoreceu levemente a inibição enzimática, possivelmente, pelas razões acima discutidas.

De forma geral, com base nos percentuais mostrados na Tabela 1, pode-se constatar que a ciclização das tiossemicarbazonas contribuiu no processo de potencialização da atividade inibitória da Topo II α . Isso é evidenciado pelo fato de todos os compostos, com exceção do JF 249 (50%), apresentarem percentuais de inibição enzimática maiores ou igual (JF-255) que o LT-51 (68%), um derivado indólico-tiossemicarbazônico, na concentração de 50 μ M, possivelmente em circunstância das propriedades eletrônicas e físico-químicas inerentes aos grupos químicos cíclicos.

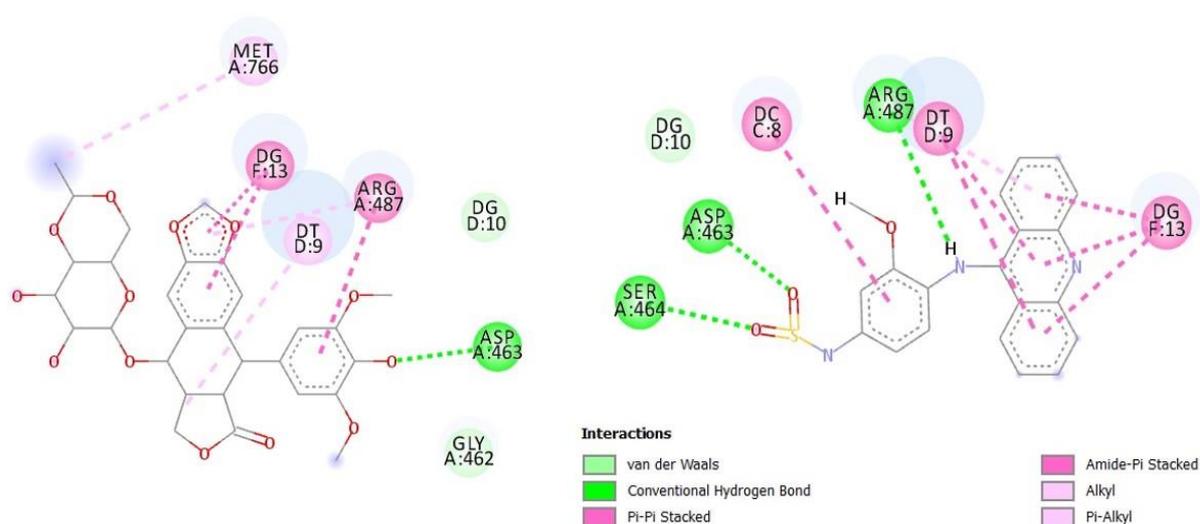
De maneira conclusiva, evidencia-se que para os compostos portadores de um vinil-éster (etóxi) conjugado ao anel tiazolidinona e de um *p*-bromofenil e/ou de um fenil não substituído ligado ao C-4 do anel tiazólico, a inserção de um bromo na posição 5 do grupo indólico desfavorece a atividade de inibição enzimática Topo II α . Entretanto, apenas para os derivados portadores de um vinil-éster (metóxi) acoplado ao grupo tiazolidinona, a inserção do referido átomo de halogênio na citada posição do indol parece contribuir na ampliação do efeito inibitório enzimático. Em linhas gerais, pode-se inferir que os derivados JFs melhoraram o mecanismo interfacial do complexo de clivagem e levaram à inibição da atividade catalítica Topo II α .

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS JFS E A TOPOISOMERASE II α HUMANA

Vislumbrando entender os resultados de inibição *in vitro* obtidos para os derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas frente à Topo II α , estudos de ancoramento molecular foram propostos para determinar possíveis modos de interações destes com o receptor estudado: a enzima Topoisomerase II α Humana (PDB ID: 5gwk). A resposta biológica antiproliferativa pela inibição enzimática à Topo II α é comumente associada a formação de um complexo ternário estável DNA-TopoII α -ligante (FILHO et al., 2019; TYLIŃSKA et al., 2021).

Informações acerca do encaixe de inibidores conhecidos ao sítio de ligação da DNA-TopoII α , como o etoposídeo e a amsacrina, descrevem interações polares com os resíduos de aminoácidos Ser⁴⁶⁴, Asp⁴⁶³ e Arg⁴⁸⁷ na região enzimática, assim como, interações geralmente hidrofóbicas com a dupla fita do DNA (DRWAL et al., 2014; SADER; WU, 2017; SOUSA et al., 2022). Essas informações sobre o encaixe dos compostos de referência podem ser confirmadas na Figura 2 abaixo, onde, em um modelo 2D, as principais interações com o complexo DNA-Topo II α são apresentadas.

Figura 2. Conforméros finais do etoposídeo e amsacrina complexados com DNA-TopoII α humana (PDB ID:5gwk). Os tracejados indicam as interações polares e hidrofóbicas realizadas por cada estrutura com o modelo cristalográfico utilizado.

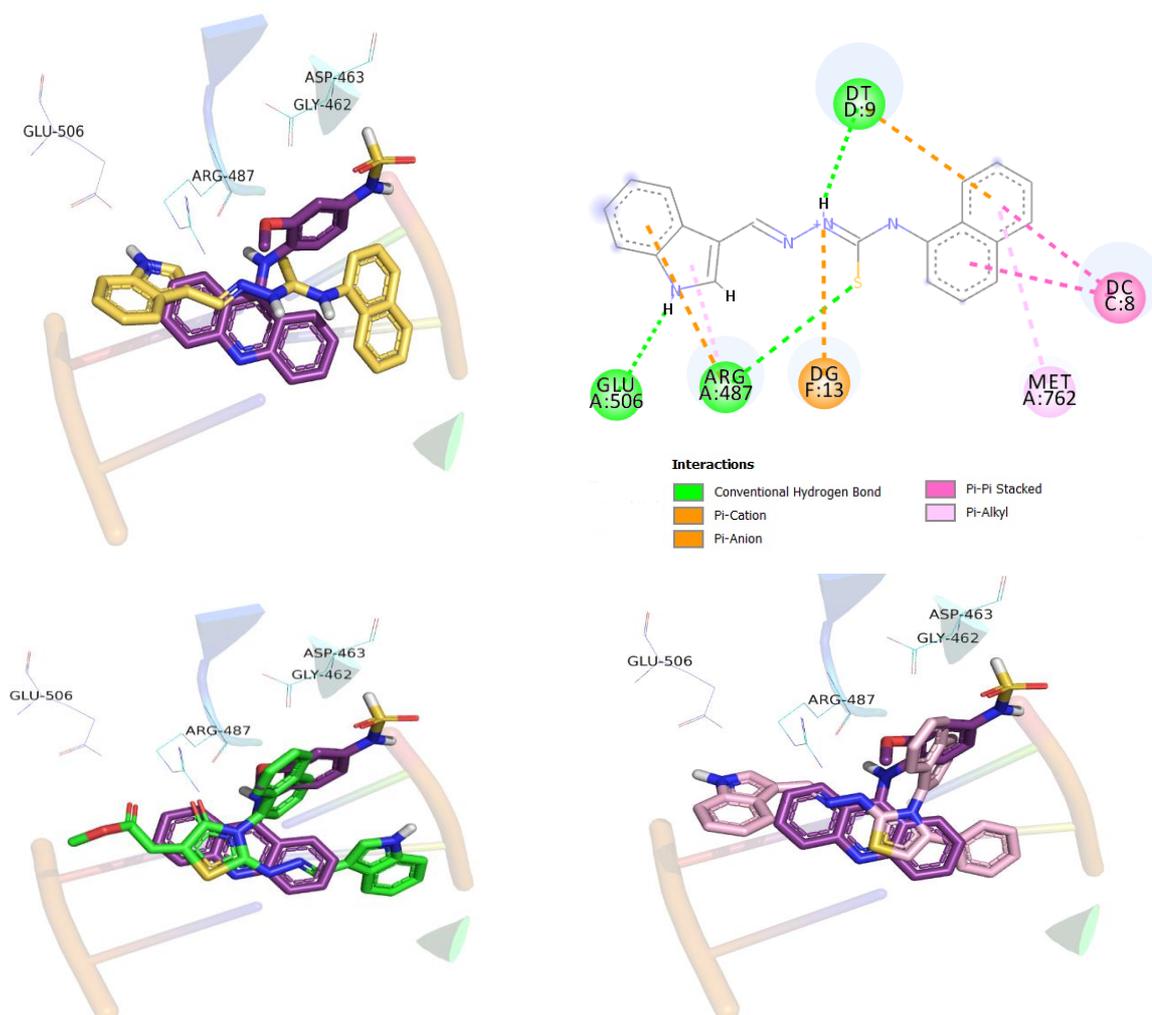


Os ensaios de ancoramento molecular para os derivados JFs foram baseados no local de complexação da Topo II α com o etoposídeo. A validação do estudo foi realizada tanto por estudos de re-docking (RMSD = 0,48), quanto pela utilização da amsacrina como ligante, um

controle positivo para o estudo *in vitro* com interações já descritas com a enzima, validando assim os parâmetros utilizados pelo programa Gold para os cálculos teóricos (DRWAL et al., 2014; SADER; WU, 2017).

A Figura 3 indica o encaixe do LT-51 ao sítio da Topo II α , em comparação ao encaixe encontrado para amsacrina. O LT-51 apontou interações polares com o Arg⁴⁸⁷, Glu⁵⁰⁶ e T⁹, indicando uma complementariedade interessante ao sítio estudado; este derivado indólico-tiossemicarbazona (não ciclizado) foi utilizado como precursor dos JFs (OLIVEIRA et al., 2015, 2017). Os derivados JFs foram planejados com objetivo de intensificar possíveis empilhamentos de elétrons, principalmente com os resíduos de DNA, potencializando assim o perfil biológico já encontrado para o LT-51. Para tal, a inserção de porções cíclicas e ricas em elétrons, através da ciclização do ligante da tiossemicarbazona do LT-51 foram propostas aos novos derivados.

Figura 3. Conformémeros finais encontrados após o ancoramento molecular do etoposídeo (lilás), LT-51 (amarelo), JF-249 (verde) e o JF-252 (rosa claro) com o modelo cristalográfico da DNA-TopoII α humana (PDB ID:5gwk). As interações intermoleculares com o receptor estudado são detalhadas para o composto LT-51.



A Figura 4 apresenta um ponto de discussão importante apontado pelos estudos teóricos; os derivados das séries tiazolidinonas e tiazóis reproduziram modos distintos de complexação com a Topo II α . Essa distinção pode ser justificada principalmente pelas diferenças estruturais entre as séries, acometendo variações nas densidades eletrônicas, resultando em um maior perfil hidrofóbico à série tiazólica, perfil determinante para inversão no modo de encaixe.

A Figura 4 abaixo ainda apresenta um esboço tridimensional de encaixe dos derivados não substituídos estudados: o JF-249 (indol-tiazolidinona) e o JF-252 (indol-tiazólico), correlacionando-os aos limites estereoelétrônicos da cavidade da enzima estudada, através de um gráfico de superfície. Os ancoramentos apontaram um bom ajuste estereoelétrônico à cavidade enzimática, característica certamente determinante para o perfil biológico encontrado.

Adicionalmente, os resíduos de Arg⁴⁸⁷ e Glu⁵⁰⁶ coordenaram, através de interações polares, o encaixe dos derivados à enzima. Interações hidrofóbicas com os resíduos T⁹, G¹³, Arg⁴⁸⁷ e Met⁷⁶² foram reproduzidas para todos os derivados JFs. A pontuação de encaixe para cada composto, bem como os tipos de interações entre os ligantes e o complexo DNA-TopoII α estão descritos na Tabela 2.

Figura 4. Conformémeros finais encontrados após o ancoramento molecular do JF-249 (verde) e JF-252 (rosa) com o modelo cristalográfico da DNA-TopoII α humana (PDB ID:5gwk).

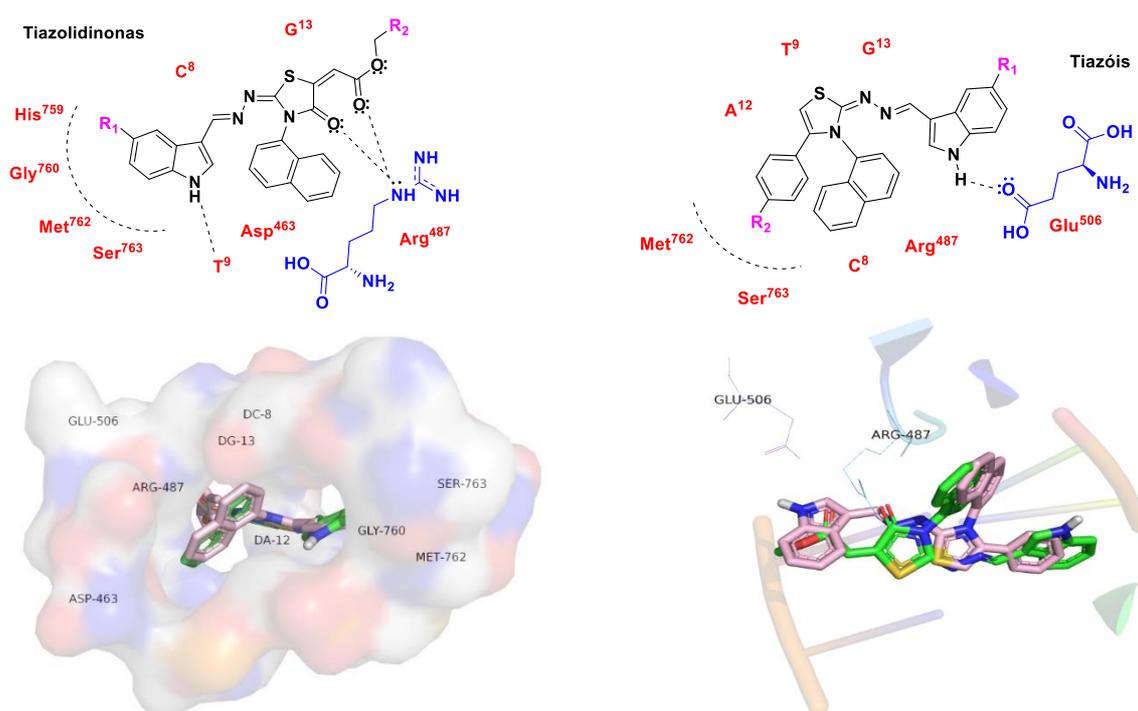


Tabela 2. Pontuação de encaixe (*score*) no ancoramento molecular com o complexo DNA-TopoII α .

Série	Composto	R ₁	R ₂	% inibição (<i>in vitro</i>)	Score	Interações polares	Interações hidrofóbicas
Indol- tiazolidino- nas	249	H	H	65	87,38	Arg ⁴⁸⁷ T ⁹	G ⁷ C ⁸ T ⁹ G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	250	H	CH ₃	87	108,32	Arg ⁴⁸⁷ T ⁹	G ⁷ C ⁸ T ⁹ G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	253	Br	H	100	106,25	Arg ⁴⁸⁷ T ⁹	G ⁷ C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶² Met ⁷⁶⁶
	254	Br	CH ₃	83	100,36	Arg ⁴⁸⁷ T ⁹	G ⁷ C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶² Met ⁷⁶⁶
Indol- tiazóis	252	H	H	100	105,60	Glu ⁵⁰⁶	C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	251	H	Br	81	98,93	Glu ⁵⁰⁶	C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	255	Br	Br	68	85,95	-	C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	256	Br	H	85	105,59	Glu ⁵⁰⁶	C ⁸ T ⁹ A ¹² G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	LT-51			68	90,85	Arg ⁴⁸⁷ Glu ⁵⁰⁶ T ⁹ Ser ⁴⁶⁴	C ⁸ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶²
	Amsacrina			100	102,01	Asp ⁴⁶³ Arg ⁴⁸⁷	C ⁸ T ⁹ G ¹³
	Etoposideo ^a			-	104,40	Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ G ¹³ Arg ⁴⁸⁷ Met ⁷⁶⁶

^a RMSD = 0,48.

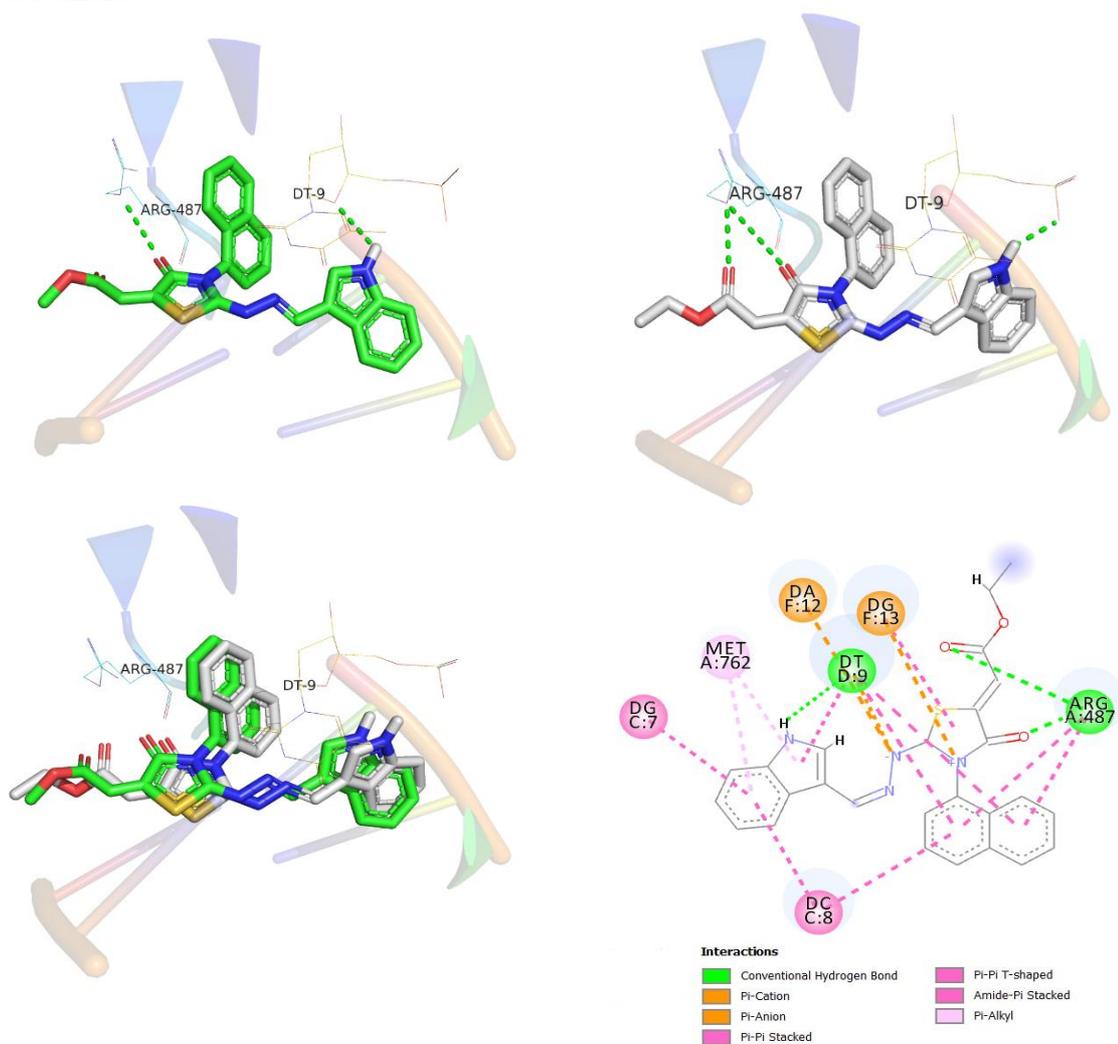
A capacidade inibitória de compostos frente à Topo II α comumente está associada a possibilidade de interações intermoleculares tanto na região específica da enzima quanto do DNA (BUZUN et al., 2020). Os derivados indol-tiazolidinonas apresentaram, no geral, além de interações com DNA, interações polares com o resíduo Arg⁴⁸⁷, condizentes com os compostos de referência estudados, com distâncias que variaram de 2,53Å (JF-253) a 3.17Å (JF-249).

Todos os derivados desta série, com exceção do JF-249, indicaram capacidade em realizar duas ou mais interações polares com o resíduo Arg⁴⁸⁷. O composto JF-249 apontou um encaixe levemente diferente dos demais, principalmente na região do éster, o que poderia justificar a menor pontuação (*score*) de encaixe do estudo (87,38) condizente com os resultados biológicos obtidos (LU et al., 2016; SADER; WU, 2017; ZIDAR et al., 2020).

Concomitantemente as interações polares discutidas, destacam-se as interações envolvendo elétrons π tanto com as bases nitrogenadas, quanto com os resíduos enzimáticos da Topo II α ; os resultados do ancoramento indicaram que a presença do bromo no núcleo indólico favoreceu as interações hidrofóbicas desse fragmento com as bases do DNA, principalmente a base nitrogenada T⁹. As poses finais encontradas no acoplamento dos

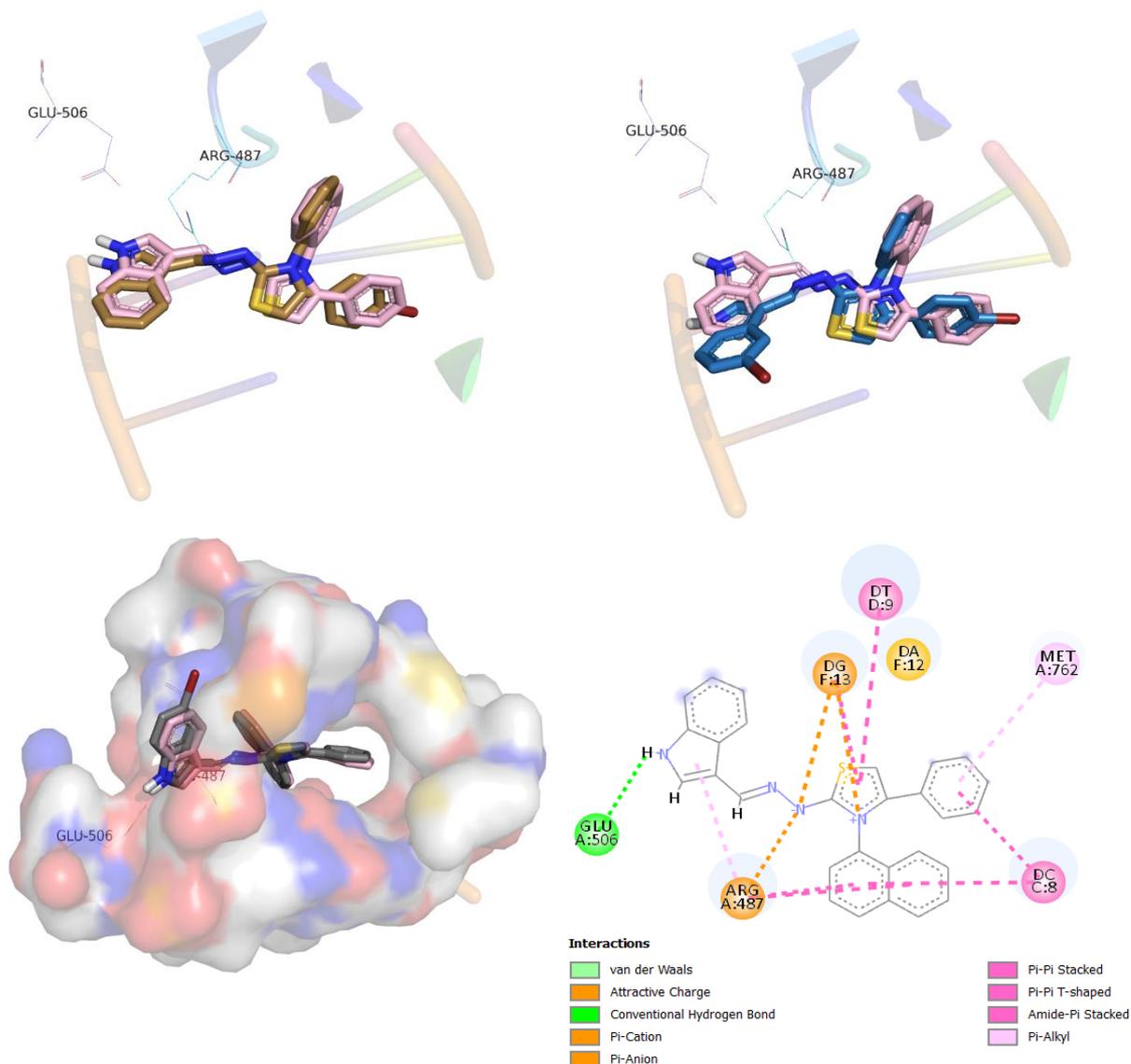
derivados JF-249 e JF-250 com DNA-TopoII α são mostradas na Figura 5.

Figura 5. Confórmeros finais encontrados após o ancoramento molecular do JF-249 (verde) e JF-250 (branco) com o modelo cristalográfico da DNA-TopoII α humana (PDB ID:5gwk). As interações polares são apresentadas em tracejados verdes; assim como, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, em tracejados rosas e laranjas, respectivamente.



Em geral, é relatado na literatura que os sistemas poliaromáticos apresentam a capacidade de interação com o DNA (via intercalação) e inibição de topoisomerases (KHALIFA et al., 2022; SANTINI et al., 2014; SOUSA et al., 2022). Assim como discutido anteriormente, os derivados indol-tiazólicos apontaram uma inversão na complexação com o sítio do sistema DNA-TopoII α , segundo os estudos teóricos. Abaixo, a Figura 6 apresenta os resultados para os ancoramentos destes derivados ao sistema DNA-TopoII α .

Figura 6. Conforméros finais encontrados após o ancoramento molecular do JF-252 (rosa claro), JF-251 (ouro), JF-255 (azul) e o JF-256 (cinza) com o modelo cristalográfico da DNA-TopoII α humana (PDB ID:5gwk). As interações intermoleculares com o receptor estudado são detalhadas para o composto JF-252.



Substituições nas posições R₁ e R₂ no arcabouço tiazólico estudado indicaram mudanças no encaixe à Topo II α ; quando dissustituído (JF-255), essa alteração foi mais pronunciada, sendo responsável pela perda de uma interação polar com o resíduo de aminoácido Glu⁵⁰⁶, assim como, interações hidrofóbicas da porção indólica com o resíduo Arg⁴⁸⁷, ambos de uma região muito influente da enzima, e comum aos outros derivados.

Todas essas diferenças justificariam a redução significativa de afinidade ao alvo estudado, indicado pelo estudo teórico (Tabela 2). Ademais, como apresentado no gráfico de superfície abaixo, a região de substituição em R₂ (porção fenil) é muito mais impedida estereoeletronicamente que a região R₁, por isso uma maior sensibilidade de atividade foi

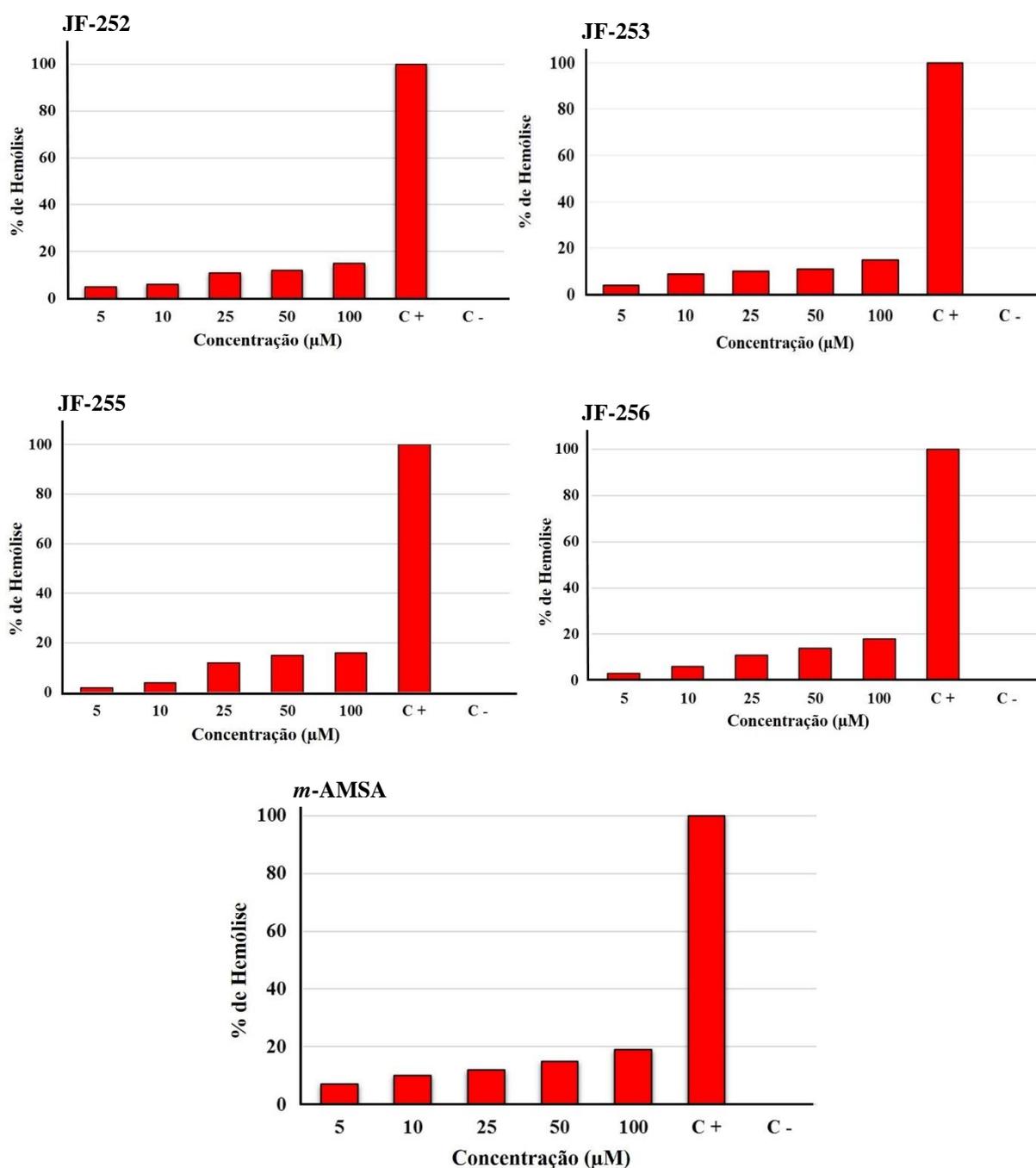
encontrada quando comparamos os derivados JF-251 ($R_1 = H$, $R_2 = Br$; pontuação = 98,93) e JF-256 ($R_1 = Br$, $R_2 = H$; pontuação = 105,59). Por fim, o arcabouço tiazólico apontou um bom ajuste a cavidade enzimática estudada, sendo conduzida principalmente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas com o DNA.

ESTUDOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS JFS 252, 253, 255 E 256

Alguns compostos são citotóxicos devido à danos inespecíficos da membrana celular, podendo culminar numa morte celular imediata (FORTES et al., 2016). Por isso, com o propósito de excluir compostos com propriedades nocivas à membrana celular, um dos ensaios mais usados é a análise da atividade hemolítica do(s) ligante(s) pesquisado(s) (SOUZA-MELO et al., 2021; ANSARI et al., 2020). Neste ensaio foram escolhidos os quatro melhores compostos inibidores da atividade catalítica da enzima Topoisomerase II α : JFs 252, 253, 255 e 256 (Tabela 1).

Em consonância com os resultados analisados, nenhum dos quatro compostos foram capazes de causar uma atividade hemolítica significativa nos eritrócitos humanos durante o período do estudo, mesmo na concentração mais alta (100 μ M). Adicionalmente, constatou-se que a propriedade hemolítica dos referidos compostos foi concentração-dependente, com baixos níveis de hemólise e muito semelhantes entre si. A seguir, os gráficos com os melhores compostos inibitórios Topo II α (JFs 252, 253, 255 e 256) e a *m*-AMSA estão discriminados na Figura 7.

Figura 7. Gráficos da atividade hemolítica dos compostos inibidores Topo II α mais eficientes: JFs 252, 253, 255, 256 e da *m*-AMSA, comparando-os aos controles positivo (C +: Triton) e negativo (C -: Solução Salina).



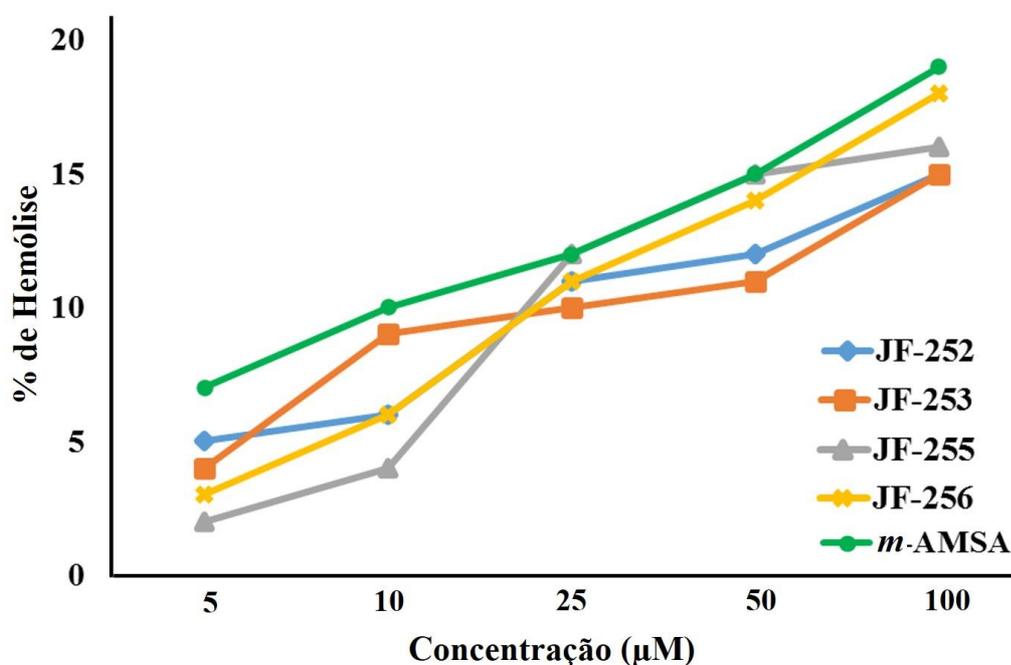
Como é possível observar, as características químicas estruturais que diferenciam os compostos JF-252 (indol-tiazólico não substituído), o JF-253 (indol-tiazolidinona bromo-substituído), JF-255 (indol-tiazólico bromo dissustituído), JF-256 (indol-tiazólico bromo substituído) possivelmente não interferiram no perfil hemolítico dos derivados citados, pois apresentaram semelhanças na atividade hemolítica em todas as concentrações usadas no ensaio, em comparação com os controles positivo e negativo. Já o fármaco *m*-AMSA

apresentou uma atividade hemolítica um pouco maior comparada aos JFs.

De Santana et al. (2017) e Ansari et al. (2020) também pesquisaram a atividade hemolítica de derivados tiazólicos. Os primeiros afirmaram que nenhum dos compostos tiazólicos testados foram capazes de desenvolver hemólise nos eritrócitos humanos, nas concentrações testadas. Já o segundo grupo citado observou que os derivados testados apresentaram hemólise numa porcentagem de aproximadamente 25% (maior que os JFs), concluindo que a atividade hemolítica apresentada não foi significativa.

O percentual hemolítico comparativo dos quatro compostos testados e da *m*-AMSA pode ser visualizado na Figura 8 abaixo:

Figura 8. Porcentagem da atividade hemolítica dos derivados JFs 252, 253, 255 e 256 e *m*-AMSA, em função das concentrações utilizadas no referido ensaio: 5, 10, 25, 50 e 100 μ M.



A partir da Figura 8, pode-se inferir que todos os quatro compostos testados nas concentrações de 5-100 μ M tiveram uma baixa atividade hemolítica, menor que 20%, na maior concentração testada. Também é possível identificar que todos os compostos testados possuem atividade hemolítica menor que a *m*-AMSA, na maioria das concentrações ou hemólise similar (em 25 e 50 μ M), para o JF-255.

Características similares aos JFs também foram descritas por Gehrcke et al. (2017), os quais também testaram o perfil hemolítico de derivados indólicos e inferiram que a atividade desencadeada foi concentração-dependente, com baixos níveis de hemólise, sendo a maior porcentagem calculada no valor de 20%. Os autores declaram, portanto, que os compostos

usados na pesquisa não apresentaram propriedade hemolítica.

Logo, percebe-se que os melhores compostos do ensaio antitopoisomerase II α (JFs 252, 253, 255 e 256) apresentam uma baixa e/ou uma insignificante atividade hemolítica, indicando que não são nocivos aos eritrócitos humanos, caso tornem-se fármacos antitumorais.

ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS COMPOSTOS JFS

A atividade antiproliferativa *in vitro* dos derivados JFs destaques nos ensaios de interação com o DNA, com a HSA e na inibição TOPO II α foi determinada com uso da linhagem tumoral de mama MCF-7. Os dados de TGI ($\mu\text{g/ml}$) estão apresentados na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3. Valores de TGI para os compostos JFs 252, 253, 255 e LT-26, testados na linhagem tumoral de mama MCF-7.

COMPOSTO	TGI ($\mu\text{g/ml}$)
JF-252	8,97
JF-253	>100
JF-255	>600
LT-26	20,51
<i>m</i> -AMSA ^a	0,83

^a Amsacrina foi usada como controle positivo

O ensaio da sulforrodamina foi empregado e a *m*-AMSA e o LT-26 foram utilizados como controles positivos, com valores de TGI entre 8,97 e >600 $\mu\text{g/ml}$. O composto com maior citotoxicidade para a referida linhagem foi o JF-252 (derivado indol-tiazólico não-substituído) com um TGI de 8,9 $\mu\text{g/ml}$. Os compostos JF-253 e JF-255 obtiveram valores >100 e >600 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Assim, observa-se que a ausência de bromo tanto no indol, quanto na cadeia lateral do núcleo tiazólico possivelmente favoreceu a ação citotóxica contra a célula da linhagem MCF-7, não apenas pelo menor valor de TGI para o composto acima mencionado, mas também pelos altos valores de TGI observado para os dois outros compostos testados. Os resultados logrados para o TGI corroboram os achados de Alves et al. (2021), cujos autores testaram todos os derivados JFs em estudos de interação com o ctDNA, concluindo que o JF-252 foi o mais promissor, em comparação aos demais, por ter

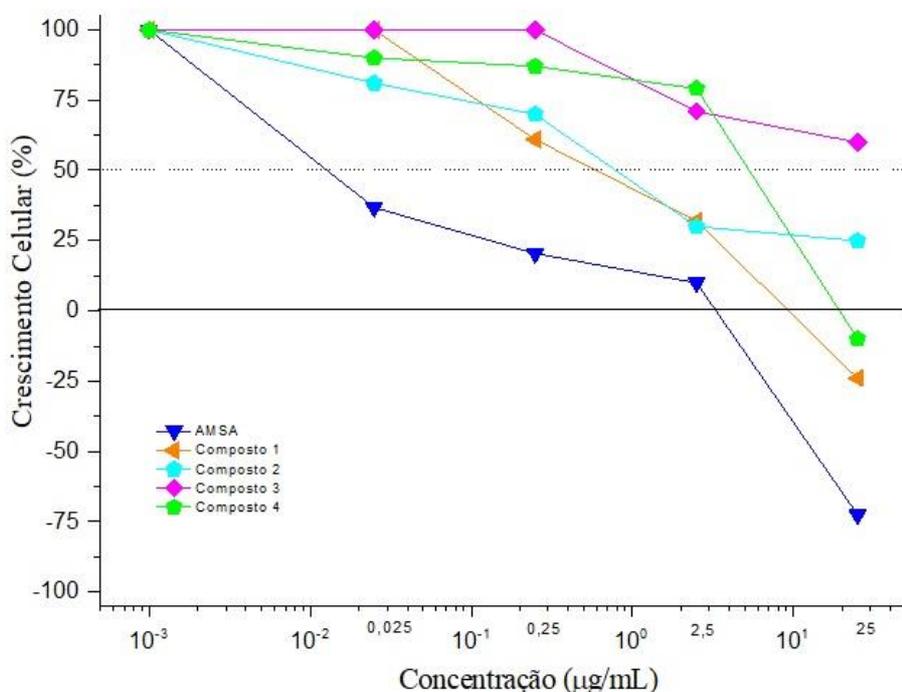
apresentado a maior constante de afinidade ($K_b = 6.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Almeida et al. (2015) conduziram experimentos antiproliferativos com derivados acridínicos-tiossemicarbazônicos substituídos com fenil LT-26 (3a), usado como controle positivo no protocolo antiproliferativo e com *p*-bromofenil (3g). Os autores inferiram que a natureza do substituinte no anel fenil influenciou significativamente na atividade antiproliferativa, com destaque para o composto 3a (fenil não-substituído) que apresentou um TGI com valor de 12,92 $\mu\text{g/ml}$. O derivado JF-252 (também portador de um fenil não substituído) apresentou um valor de TGI ainda menor: 8,97 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 3), consolidando as conclusões dos pesquisadores supracitados. Por outro lado, o composto 3g (*p*-bromofenil), cujo valor de TGI foi maior que a mais alta concentração utilizada no ensaio (>600 $\mu\text{g/ml}$), similarmente ao ocorrido com o JF-255: >600 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 3). Com base nos resultados auferidos, os autores depreenderam que substituintes volumosos no anel fenil causaram uma diminuição significativa na capacidade antiproliferativa dos derivados testados. Nossos achados ratificam a inferência dos autores.

Outrossim, Oliveira et al. (2017) realizaram estudos antiproliferativos com derivados indólicos, cujo derivado destaque foi o LT-51 (2b), também usado neste trabalho na atividade inibitória da enzima Topo II α . Os autores inferiram que a presença do núcleo indol, bem como a presença da porção naftaleno foram importantes nos resultados positivos da atividade antiproliferativa contra várias linhagens tumorais. Analogamente, o JF-252 (portador também tanto de um núcleo indol, quanto de um naftil) foi o destaque da referida atividade e dos estudos de inibição da mesma enzima, comprovando as conclusões dos autores citados.

O composto JF-252 foi mais ativo que os demais JFs testados (JF-253 e JF-255), mostrando que a ausência do bromo seja acoplado ao indol ou ao anel tiazólico potencializou, provavelmente, a atividade antiproliferativa. Ou seja, os derivados portadores do vinil-éster (etóxi) bromo-substituído e da dissustituição do referido halogênio tiveram uma baixa citotoxicidade, principalmente o JF-255, o que indica que a presença do bromo nas extremidades da estrutura da molécula, possivelmente, interferiu na referida atividade, minimizando o seu potencial (Figura 9).

Figura 9. Atividade antiproliferativa da *m*-AMSA, JF-252 (composto 1), JF-253 (composto 2), JF-255 (composto 3) e LT-26 (composto 4) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$; contra a linhagem celular tumoral de mama MCF-7.



Alves et al. (2021) realizaram estudos e confirmaram que o JF-252 foi o mais promissor nos estudos de interação com o ctDNA, em comparação aos demais, por ter apresentado a maior constante de afinidade ($K_b = 6.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Além disso, o referido trabalho concluiu que o composto é ligante aos sulcos do DNA através de estudos *in vitro* e *in silico*. Aqui, os estudos de inibição da enzima topoisomerase II α mostraram que o JF-252 apresentou inibição semelhante ao controle positivo *m*Amsa, comportando-se como um “veneno” Topo II α , como também, os estudos antiproliferativos desvelaram este JF possui o menor valor de TGI. Já os estudos hemolíticos mostraram que o citado derivado indólico tem uma atividade hemolítico insignificante comparada à *m*-AMSA (Figura 9). Esses dados estimulam mais estudos aprofundados deste e de outros derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas.

Ribeiro et al. (2019) testaram derivados quinolina-tiossemicarbazônico, tendo sido evidenciado o derivado JF-89 (portador de um naftil), o qual foi destaque com uma atividade antiproliferativa melhor que o controle positivo (*m*-AMSA). Ainda, outros derivados portadores de um *p*-bromofenil (JF-93) e de um fenil (JF-96) foram testados, com perfil antiproliferativo semelhante ao da *m*-AMSA. Em virtude disto, os autores concluíram que os

resultados evidenciados demonstraram que a substituição com átomos menos volumosos ou a não substituição favoreceu a ação antitumoral para todas as linhagens celulares utilizadas na pesquisa. Tais informações reforçam os achados do nosso trabalho referente ao JF-252 (não substituído), concorrente ao seu perfil antiproliferativo, em relação aos demais compostos testados.

Logo, uma análise da estrutura química dos derivados JFs testados no ensaio supracitado permite destacar a influência dos núcleos indol, tiazol e do fenil sem substituições, o que, presumivelmente, potencializou a atividade antiproliferativa contra a linhagem tumoral de mama MCF-7. Estudos *in vitro* e *in vivo* adicionais serão realizados para avaliar melhor os mecanismos envolvidos, além da biodisponibilidade e eficácia desses novos derivados.

CONCLUSÃO

Derivados indol-tiazóis e indol-tiazolidinonas foram submetidos a ensaios de inibição da enzima Topoisomerase II α , e foi observado que todos os compostos foram capazes de inibir a atividade enzimática, principalmente os JFs 252 e 253, que apresentaram uma ação antitopo II α total (100%), semelhante ao controle positivo (*m*-AMSA), a 50 μ M. Essa interação foi consolidada pelos estudos *in silico*, sobretudo, para os derivados indol-tiazóis, principalmente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas com o sistema DNA-Topo II α .

Ademais, a partir do estudo supracitado, foi possível depreender que a ciclização dos derivados JFs de tiossemicarbazonas em tiazóis e tiazolidinonas, em geral, potencializou a capacidade inibitória Topo II α destes, em comparação com o LT-51, que é um derivado indólico tiossemicarbazônico, portanto, não ciclizado.

O estudo das propriedades hemolíticas dos melhores compostos da atividade antitopoisomerase II α e da interação com o DNA e HSA mostrou que o perfil hemolítico de derivados testados foi concentração-dependente, com baixos níveis de hemólise, sendo a maior porcentagem calculada no valor de 20%, denotando uma biocompatibilidade razoável e/ou aceitável, segundo a literatura.

A respeito dos estudos antiproliferativos, foram testados os JFs 252, 253 e 255, cujos resultados indicaram que o JF-252 se destacou, com o melhor valor de TGI (8,97 μ g/ml). A literatura tem mostrado que compostos indólicos não substituídos, bem como a presença de um naftil e de um fenil também não substituído, supostamente, contribui para a potencialização do efeito antiproliferativo.

Ademais, os resultados indicam que os novos derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas propostos são promissores, dada a sua capacidade propriedade antitopoisomerase II α , comprovando que a inserção dos substituintes propostos foi relevante na contribuição dos efeitos verificados, bem como a importância da presença de grupos químicos lipofílicos no processo de inibição da enzima supracitada. Portanto, os derivados indólicos estudados contemplam diversas características que despertam estudos mais aprofundados sobre sua futura aplicação no tratamento do câncer. Mais experimentos serão executados posteriormente a fim de investigar com mais meticulosidade o mecanismo de ação dos novos JFs, enquanto candidatos a fármacos a serem utilizados na terapia antitumoral.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 13023–13042, 2015.
- ALVES, J. E. F. et al. Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 622–635, 2021.
- ANSARI, M. et al. New thiazole-2(3H)-thiones containing 4-(3,4,5-trimethoxyphenyl) moiety as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 185, 111784, 2020.
- BUZUN, K. et al. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 1781–1799, 1 jan. 2020.
- CHOI, S.-J. et al. Solid phase combinatorial synthesis of benzothiazoles and evaluation of topoisomerase II inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1229–1235, 2006.
- DE ALMEIDA, P. S. V. B. et al. Cytotoxicity evaluation and DNA interaction of Ru^{II}-bipy complexes containing coumarin-based ligands. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 41, p. 14908–14919, 2021.
- DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874-886, 2018.
- DRWAL, M. N. et al. Novel DNA Topoisomerase II α Inhibitors from Combined Ligand- and Structure-Based Virtual Screening. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114904, 9 dez. 2014.
- FIGUEIREDO, P. O. et al. Further constituents of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) and inhibition of DNA topoisomerases I and II α by its cytotoxic β -carboline alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1358–1361, 2014.
- FILHO, F. A. S. et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 582–589, 2019.
- FORTES, M. P. et al. Synthesis and preliminary evaluation of 3-thiocyanato-1H-indoles as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 118, p. 21-26, 2016.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 74, p. 279–286, 2017.

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

GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.

HASINOFF, B. B. et al. The anticancer multi-kinase inhibitor dovitinib also targets topoisomerase I and topoisomerase II. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1617–1626, 2012.

JASIEWICZ, B. et al. Indole Derivatives Bearing Imidazole, Benzothiazole-2-Thione or Benzoxazole-2-Thione Moieties-Synthesis, Structure and Evaluation of Their Cytoprotective, Antioxidant, Antibacterial and Fungicidal Activities. **Molecules**, v. 28, 708, 2023.

KASHYAP, M. Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23 p. 934–938, 2013.

KHALIFA, M. M. et al. Topo II inhibition and DNA intercalation by new phthalazine-based derivatives as potent anticancer agents: design, synthesis, anti-proliferative, docking, and *in vivo* studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 299–314, 31 dez. 2022.

KOSMALSKI, T. et al. The Oxime Ethers with Heterocyclic, Alicyclic and Aromatic Moiety as Potential Anti-Cancer Agents. **Molecules**, v. 27, 1374, 2022.

LIANG, X. et al. A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 129-168, 2019.

LIU, K.; DING Y.; KANG, C. Synthesis and antiproliferative activity of new *n*-acylhydrazone derivatives containing benzothiazole and indole based moiety. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 54, n. 4, 2020.

LU, H. et al. Novel substituted aminothiazoles as potent and selective anti-hepatocellular carcinoma agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 23, p. 5819–5824, 2016.

MUKHOPADHYAY, L. et al. Synthesis and compatibility evaluation of versatile mesoporous silica nanoparticles with red blood cells: an overview. **RSC Advances**, v. 9, 35566, 2019.

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.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 111592, 2019.

ROGOJINA, A. et al. Topoisomerase II Inhibitors: Chemical Biology. In: Pommier Y. (eds) DNA Topoisomerases and Cancer. **Cancer Drug Discovery and Development**. 2012 https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0323-4_11.

SADER, S.; WU, C. Computational analysis of Amsacrine resistance in human topoisomerase II alpha mutants (R487K and E571K) using homology modeling, docking and all-atom molecular dynamics simulation in explicit solvent. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 72, p. 209–219, 2017.

SALEM, O. M. et al. New spiro tria(thia)zolidine-acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 690–700, 2016.

SANTINI, C. et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 2014.

SCHWANDT, A. et al. Phase-II Trial of Rebeccamycin Analog, a Dual Topoisomerase-I and -II Inhibitor, in Relapsed “Sensitive” Small Cell Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 7, n. 4, 2012.

SHINDE, Y. et al. Keto-enol tautomerism of hydroxynaphthoquinoneoxime ligands: Copper complexes and topoisomerase inhibition activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1262, 133081, 2022.

SILVA, T. D. S. et al. Anti-liver cancer activity *in vitro* and *in vivo* induced by 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 329, p. 212–223, 2017.

SINGH, V. et al. Recent development of multi-targeted inhibitors of human topoisomerase II enzyme as potent cancer therapeutics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 473–484, 2023.

SOUSA, G. et al. Synthesis and Evaluation of Antiproliferative Activity, Topoisomerase II α Inhibition, DNA Binding and Non-Clinical Toxicity of New Acridine–Thiosemicarbazone Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1098, 2 set. 2022.

SOUZA-MELO, W. O. et al. Phytochemistry, antifungal and antioxidant activity, and cytotoxicity of *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) extract. **Archives of Oral Biology**, v. 123, 104994, 2021.

TYLIŃSKA, B. et al. Evaluation of Interactions of Selected Olivacine Derivatives with DNA and Topoisomerase II. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8492, 6 ago. 2021.

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, 13 out. 2017.

ZIDAR, N. et al. Synthesis, Antiproliferative Effect, and Topoisomerase II Inhibitory Activity of 3-Methyl-2-phenyl-1 *H* -indoles. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 5, p. 691–697, 14 maio 2020.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante os estudos de interação dos oito derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas com o ctDNA, por meio das técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis e emissão fluorescente com diferentes sondas fluorescentes, depreendeu-se que os compostos estudados interagiram com esta biomolécula, tendo como mecanismo de interação a ligação ao sulco menor do ctDNA. Os estudos *in silico* de docking molecular com o DNA, confirmaram o modo de interação entre derivados e DNA por ligação aos sulcos, especificamente no sulco menor, havendo, portanto, a formação do complexo DNA-JF. A partir do ensaio espectroscópico de absorção UV-vis com oligonucleotídeos e DAPI (controle) foi possível inferir que o composto JF-252 liga-se especificamente nas regiões ricas em seqüências A-T, no sulco menor do ctDNA.

Similarmente, a partir dos estudos de interação com uso das mesmas técnicas espectroscópicas supracitadas entre os derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas com a HSA, concluiu-se que os compostos interagiram com esta biomolécula, formando o complexo HSA-JF, especialmente o composto JF-255 (di-substituído com bromo), o qual apresentou o maior valor tanto para a constante de afinidade ($K_b = 3.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) quanto para a constante de supressão fluorescente ($K_{sv} = 4.34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).

O estudo molecular de ancoramento dos JFs com a HSA corroborou os resultados *in vitro*, comprovando a forte interação da HSA com o JF-255, no mesmo sítio que o controle (indometacina). A existência de mecanismo de supressão estática durante a formação dos sistemas HSA-JF foi verificada por estudos espectroscópicos. O estudo de fluorescência síncrona também revelou que a conformação de HSA foi alterada e a polaridade preferencialmente ao redor do resíduo Trp foi alterado na presença dos derivados. Por fim, os resultados obtidos com as sondas sítio-marcadores (indometacina e ibuprofeno) revelaram o subdomínio IIA (sítio I de Sudlow) como o local preferencial de interação para os compostos-teste com a HSA.

Na análise do potencial inibitório da enzima Topo II α , os oito derivados foram capazes de inibir a atividade enzimática, principalmente os JF-252 e JF-253, que apresentaram uma ação antitopo II α total (100%), semelhante ao controle positivo (*m*-AMSA), a 50 μM . Essa interação foi consolidada pelos estudos *in silico*, sobretudo, para os derivados indol-tiazóis, principalmente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas com o sistema DNA-Topo II α .

O estudo das propriedades hemolíticas dos melhores compostos da atividade antitopoisomerase II α e da interação com o DNA e HSA mostrou que o perfil hemolítico de derivados testados foi concentração-dependente, com baixos níveis de hemólise, sendo a maior porcentagem calculada no valor de 20%, denotando uma biocompatibilidade razoável e/ou aceitável, segundo a literatura.

Concernente aos estudos antiproliferativos com os melhores compostos, foi possível observar que o composto-teste mais promissor também foi o JF-252, que apresentou o melhor valor de TGI, em comparação aos demais derivados testados.

Ademais, os resultados indicam que os derivados indol-tiazólicos e indol-tiazolidinonas avaliados são promissores, dada a capacidade em interagir com biomacromoléculas de interesse científico como o DNA e a HSA e seu potencial antitopoisomerase II α , comprovando que a inserção dos substituintes propostos foi relevante na contribuição dos efeitos verificados, bem como a importância da presença de grupos químicos lipofílicos no processo de interação/inibição das biomoléculas supracitadas. Mais experimentos serão executados posteriormente a fim de investigar com mais meticulosidade o mecanismo de ação do derivado JF-252, principalmente com outras linhagens tumorais.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar a atividade antiproliferativa do derivado JF-252, analisando suas propriedades citotóxicas com linhagens de células não-transformadas;
- Avaliar a capacidade de inibição da migração e invasão das células tumorais MCF-7 frente ao derivado JF-252;
- Avaliar o tipo de morte celular causado nas células MCF-7 pelo derivado JF-252.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM OS COMPLEXOS LA-CTDNA E DAPI-CTDNA ATRAVÉS DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE EMISSÃO FLUORESCENTE

Figura A1. Espectros de emissão do LA (3 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (30 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados JF's 249, 250, 251, 253, 254 e 255 (—). As setas (\downarrow) e (\leftarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos compostos-teste (3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM), à temperatura ambiente, e o efeito hipsocrômico, respectivamente. Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

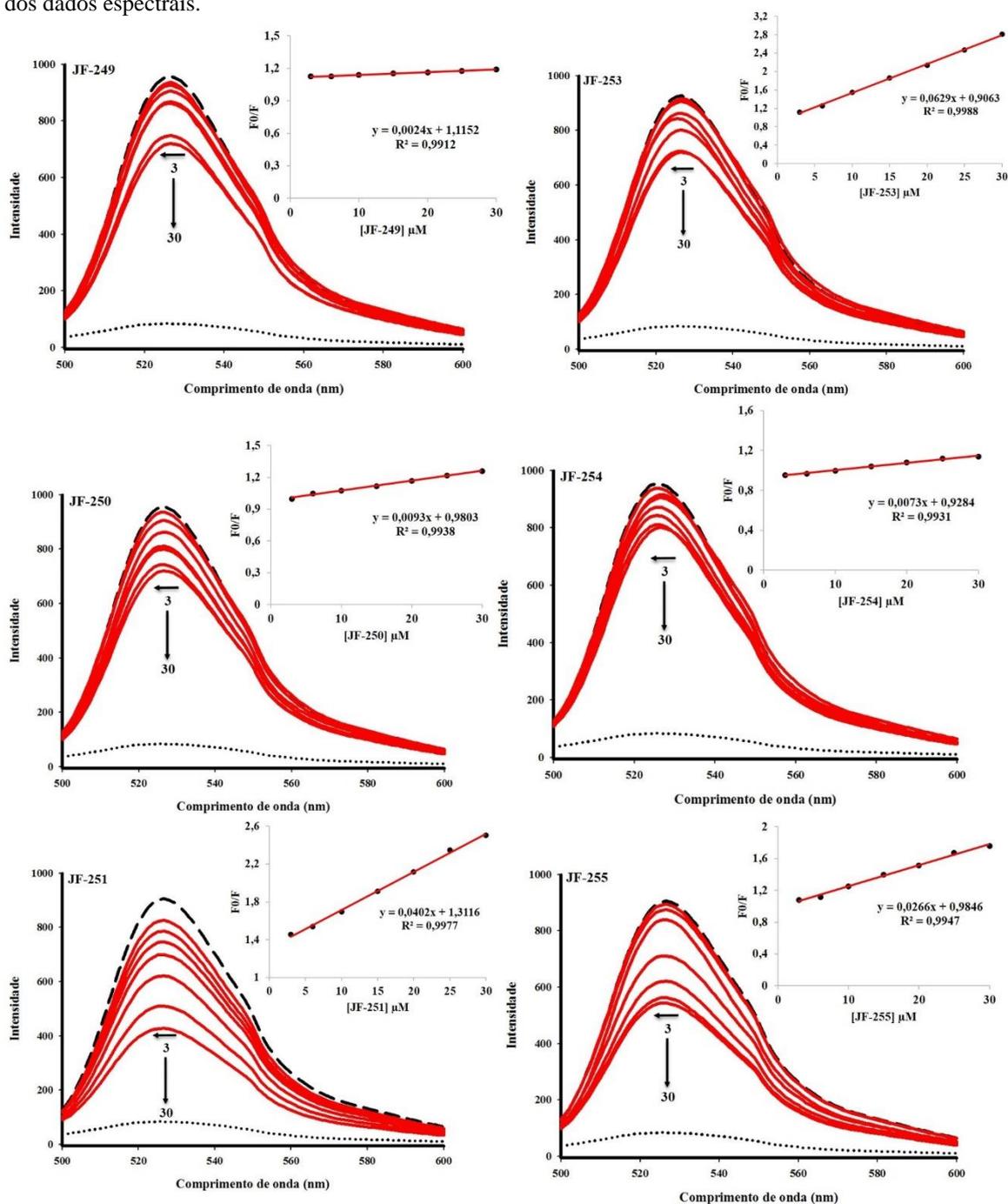


Figura A2. Espectros de emissão do LA (3 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (30 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados JF's 256 (—). As setas (\downarrow) e (\leftarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração do composto-teste (3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM), à temperatura ambiente, e o efeito hipsocrômico, respectivamente.. Inseto: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

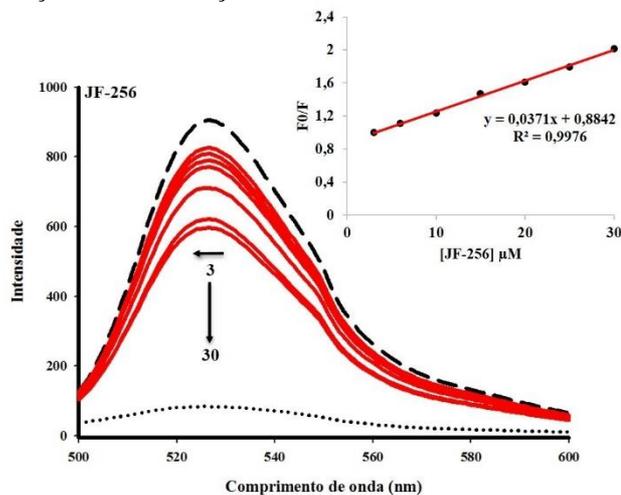


Figura A3. Espectros de emissão do DAPI (3 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (30 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados JF's 249, 250, 253 e 254 (—). A seta (\downarrow) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos compostos-teste (3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM), à temperatura ambiente. Inseto: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

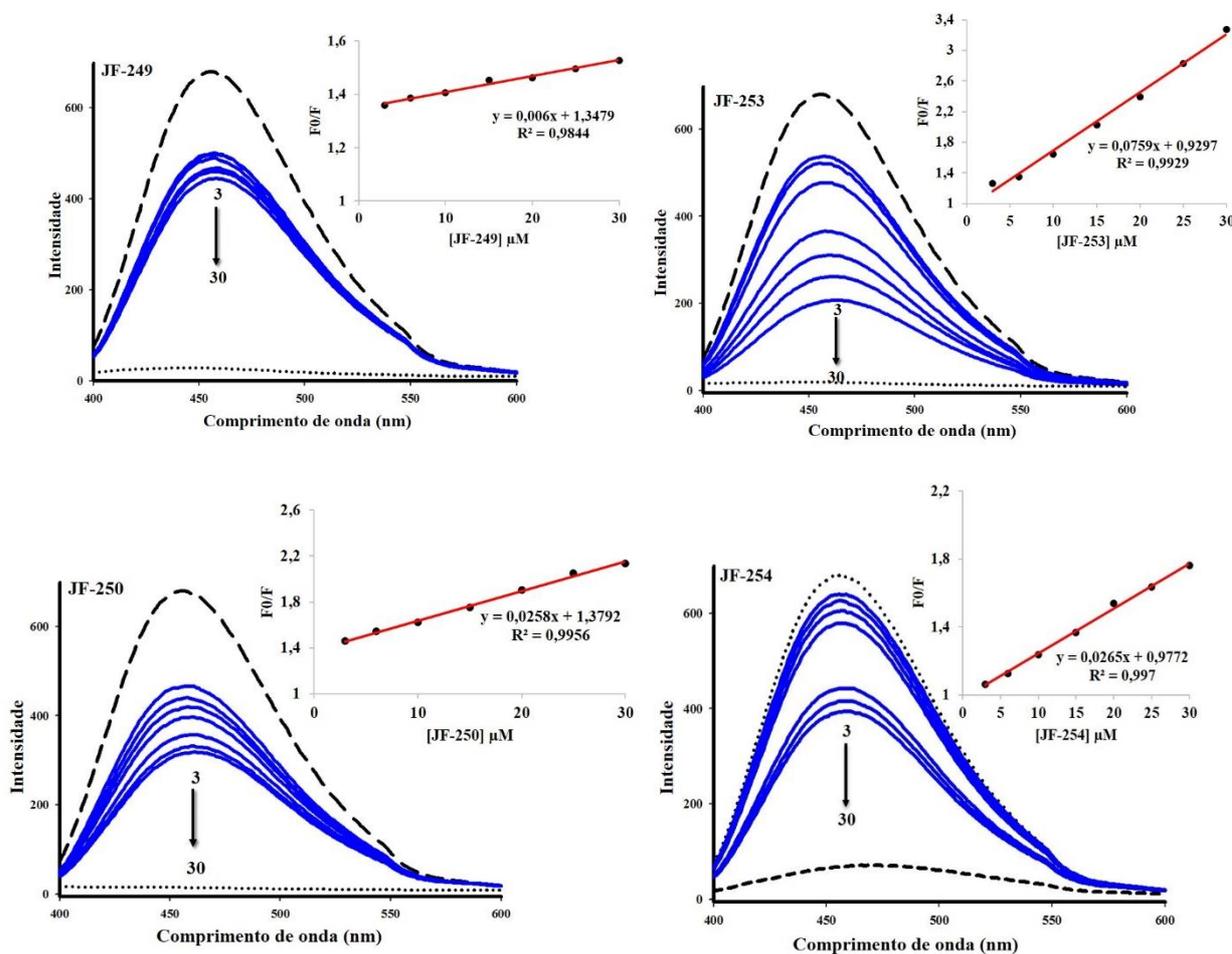
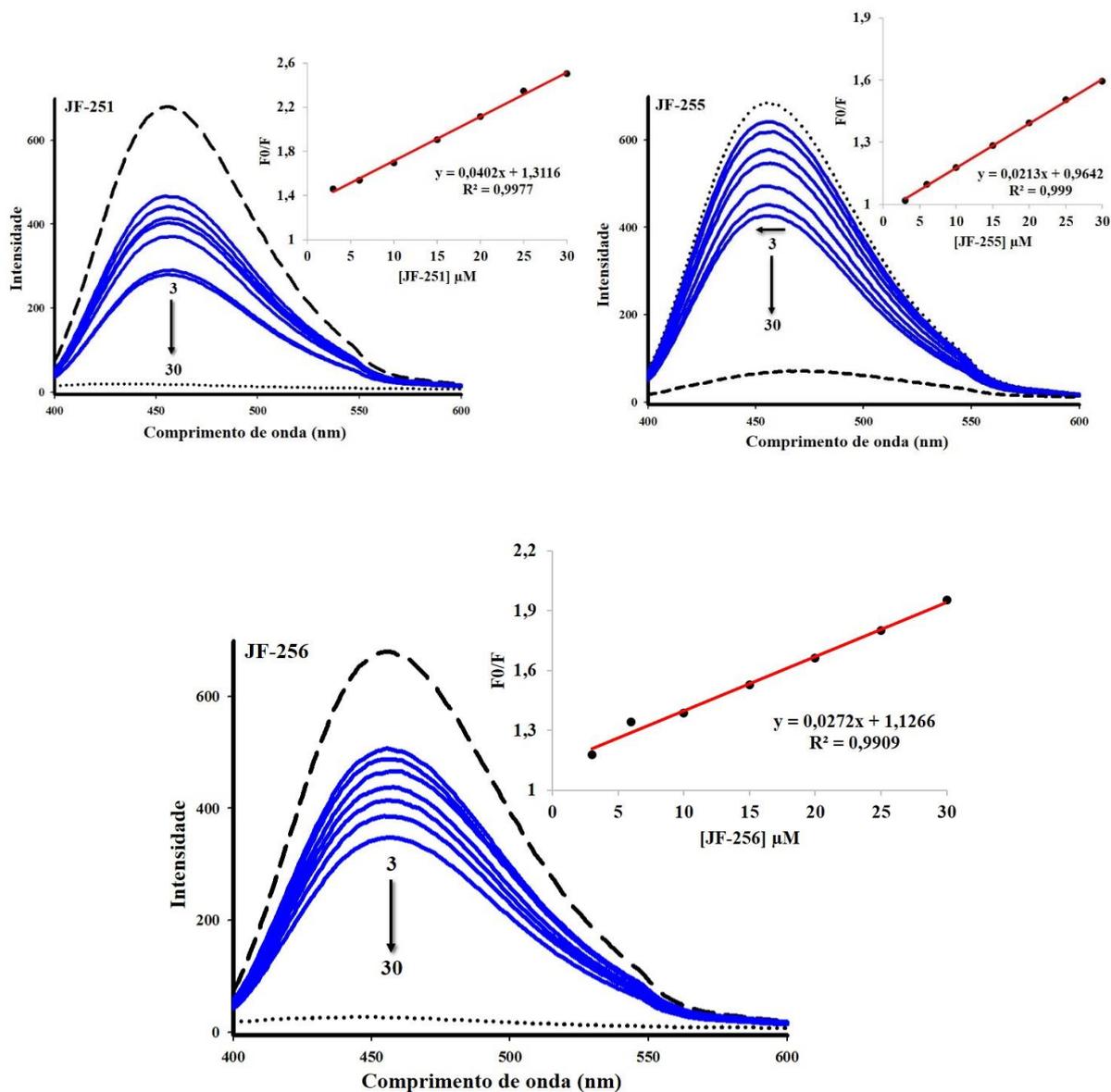
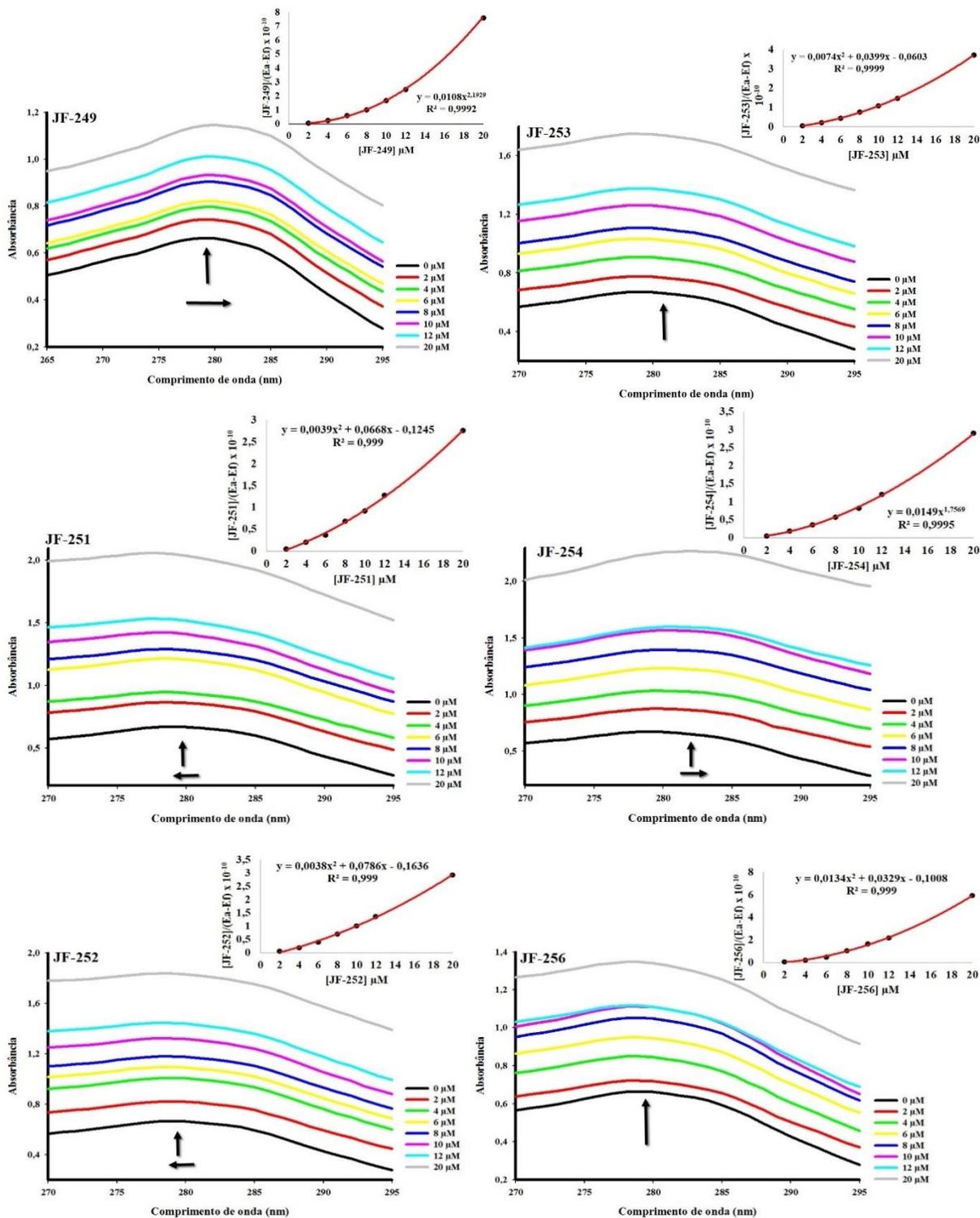


Figura A4. Espectros de emissão do DAPI (3 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (30 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados JFs 251, 255 e 256 (—). As setas (\downarrow) e (\leftarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos compostos-teste (3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM), à temperatura ambiente, e o efeito hipsocrômico, respectivamente. Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



APÊNDICE B – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM A HSA ATRAVÉS DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE ABSORÇÃO UV-VIS

Figura B1. Espectros de absorção da HSA (20 μM) na presença de quantidades crescentes dos JF's 249, 251, 252, 253, 254 e 256 (0-20 μM). As setas (\uparrow), (\rightarrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico, batocrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{JF}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



APÊNDICE C – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM A HSA ATRAVÉS DA TÉCNICA ESPECTROSCÓPICA DE FLUORESCÊNCIA

Figura C1. Espectros de supressão fluorescente da HSA (10 μ M) na ausência (----) e na presença dos derivados JF's 249, 251, 252, 253, 254 e 256. A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (...). As setas (\downarrow) e (\leftarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (0-40 μ M), a 25 $^{\circ}$ C, e o efeito hipsocrômico, respectivamente. Inserido: Gráfico da supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.

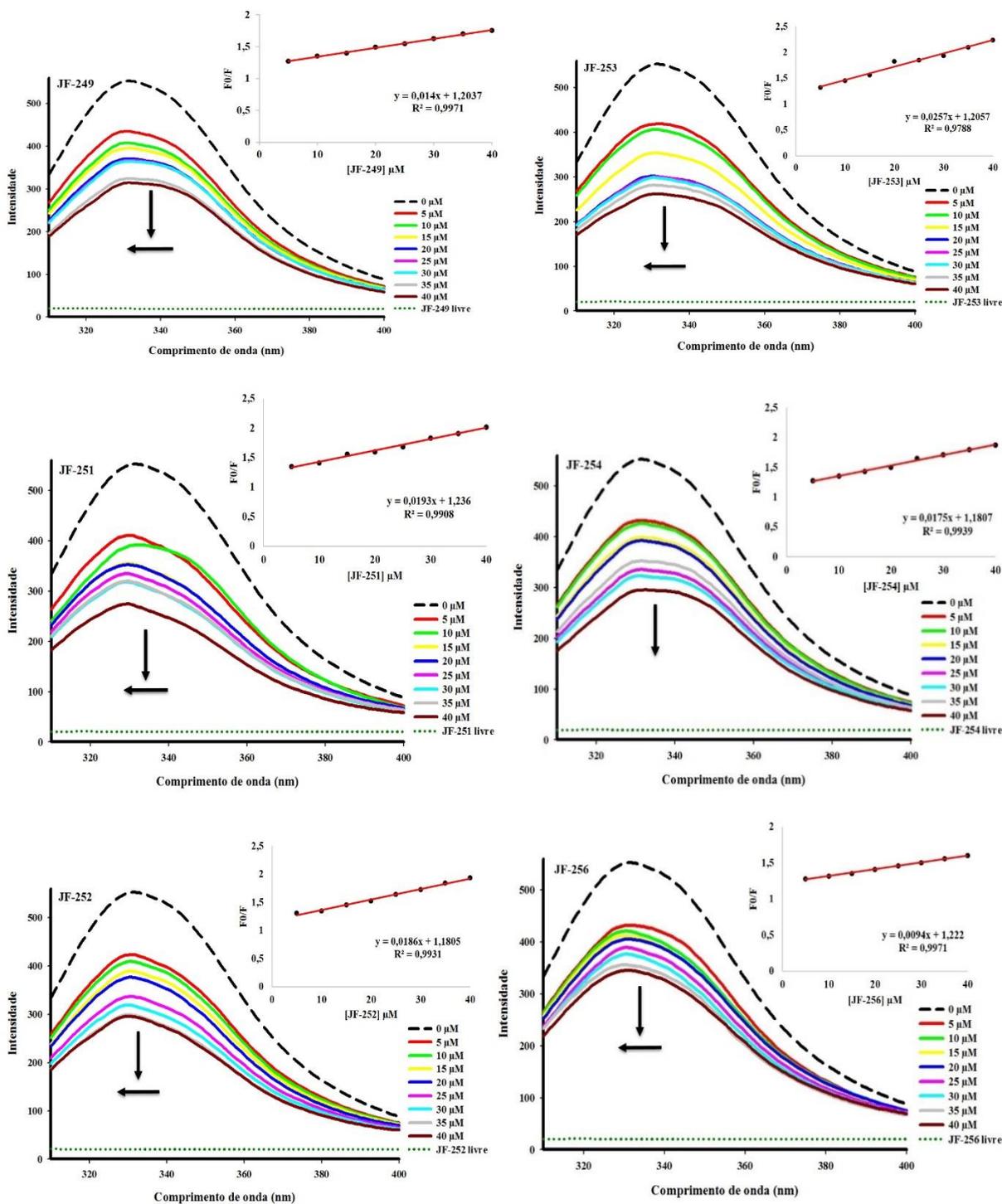


Figura C2. (A) Espectros de emissão dos derivados JFs 249, 250 e 251 (40 μM) livre (.....) e da HSA (3 μM) livre (--) e ligada a quantidades crescentes dos compostos mencionados acima (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\leftarrow) referem-se a efeitos hipocrômico e hipsocrômico, respectivamente. (B) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os derivados supracitados e a HSA, sob três diferentes temperaturas.

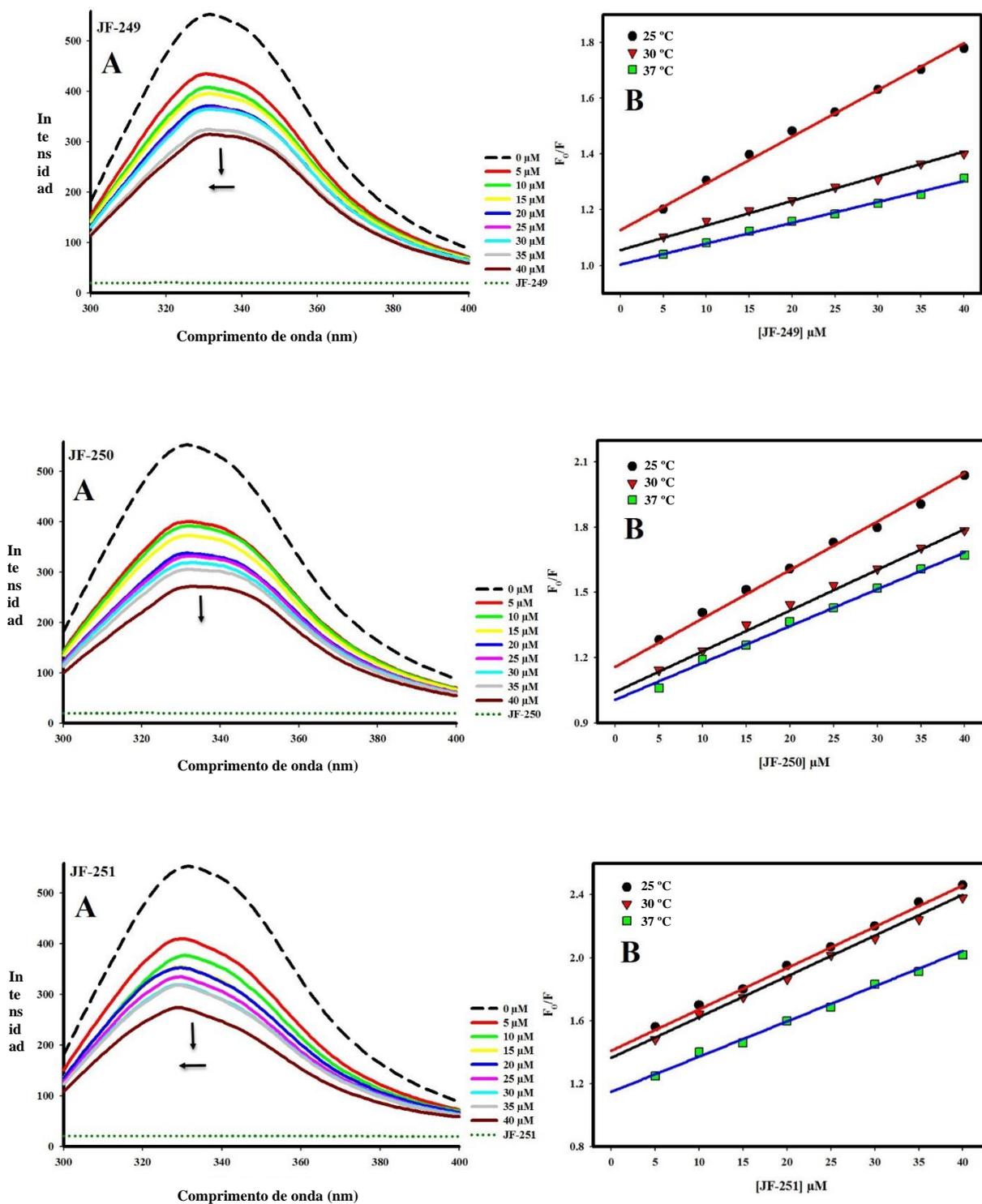


Figura C3. (A) Espectros de emissão dos derivados JFs 252, 253 e 254 (40 μM) livre (.....) e da HSA (3 μM) livre (--) e ligada a quantidades crescentes dos compostos mencionados acima (5,10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\leftarrow) referem-se a efeitos hipocrômico e hipsocrômico, respectivamente. (B) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os derivados supracitados e a HSA, sob três diferentes temperaturas.

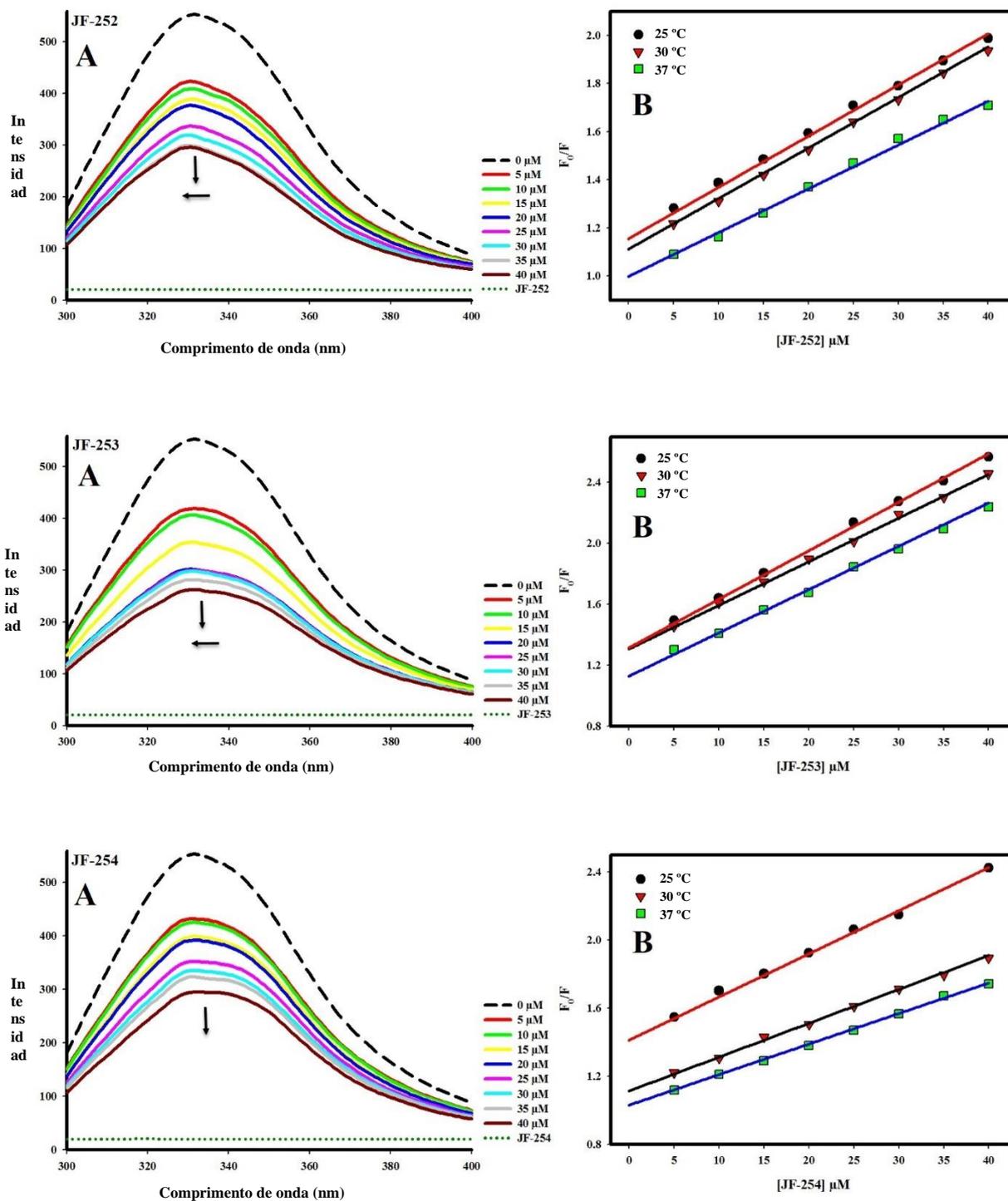


Figura C4. (A) Espectros de emissão do derivado JF-256 (40 μM) livre (.....) e da HSA (3 μM) livre (--) e ligada a quantidades crescentes dos compostos mencionados acima (5,10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\leftarrow) referem-se a efeitos hipocrômico e hipsocrômico, respectivamente. (B) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os derivados supracitados e a HSA, sob três diferentes temperaturas.

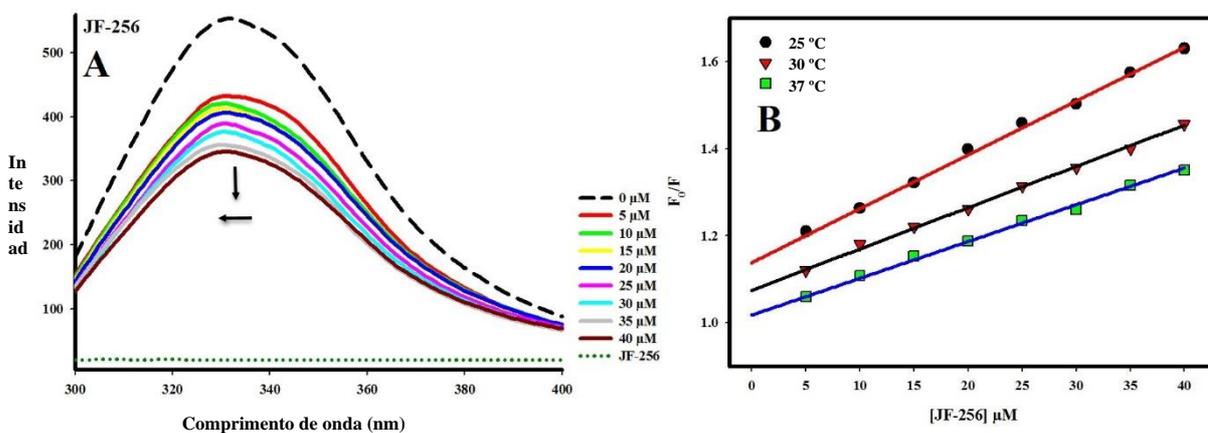


Figura C5. Espectros de fluorescência síncrona de HSA (3 μM) na ausência e presença de adições sucessivas dos derivados JFs 249 e 250 (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) a $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se aos efeitos hipocrômico e batocrômico, respectivamente.

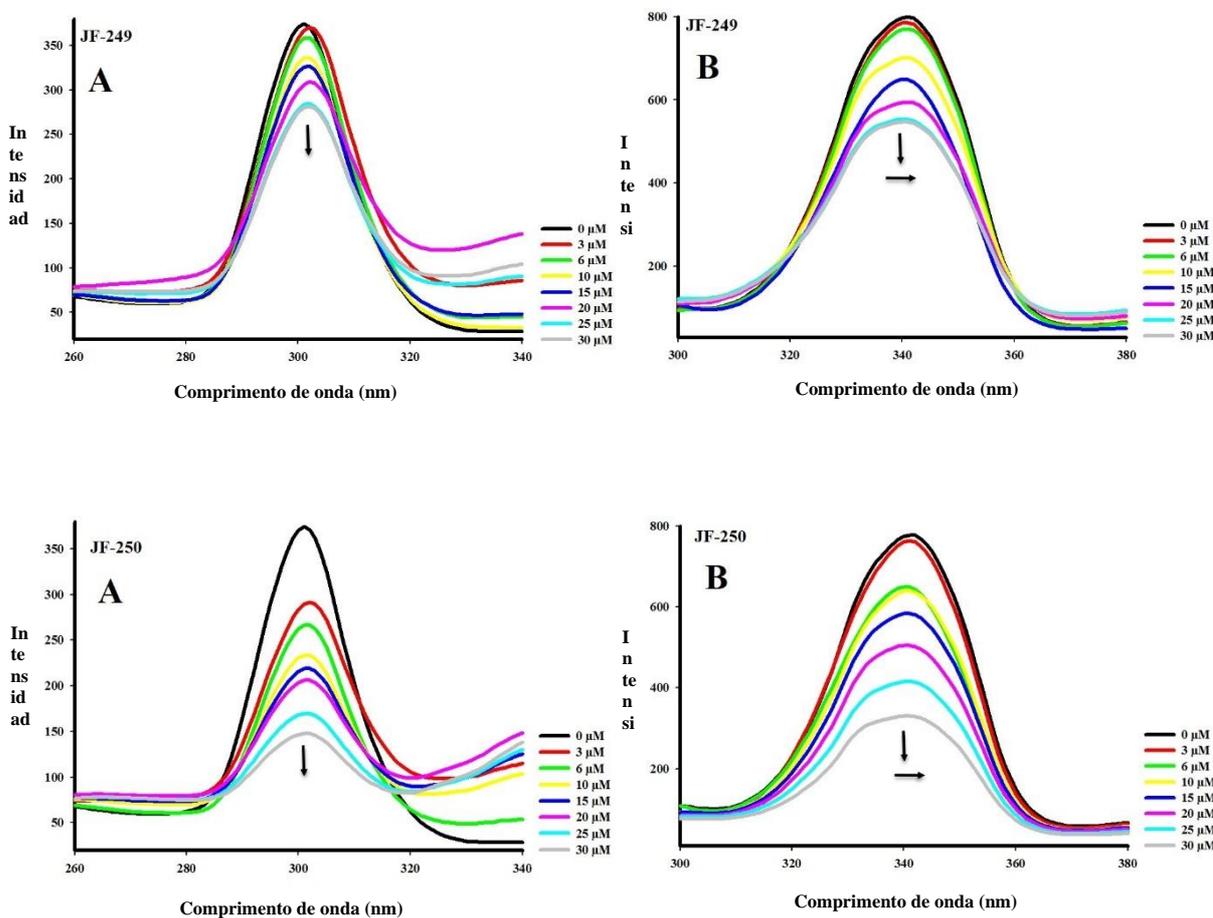


Figura C6. Espectros de fluorescência síncrona de HSA (3 μM) na ausência e presença de adições sucessivas dos derivados JFs 251, 252 e 253 (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) a $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se aos efeitos hipocrômico e batocrômico, respectivamente.

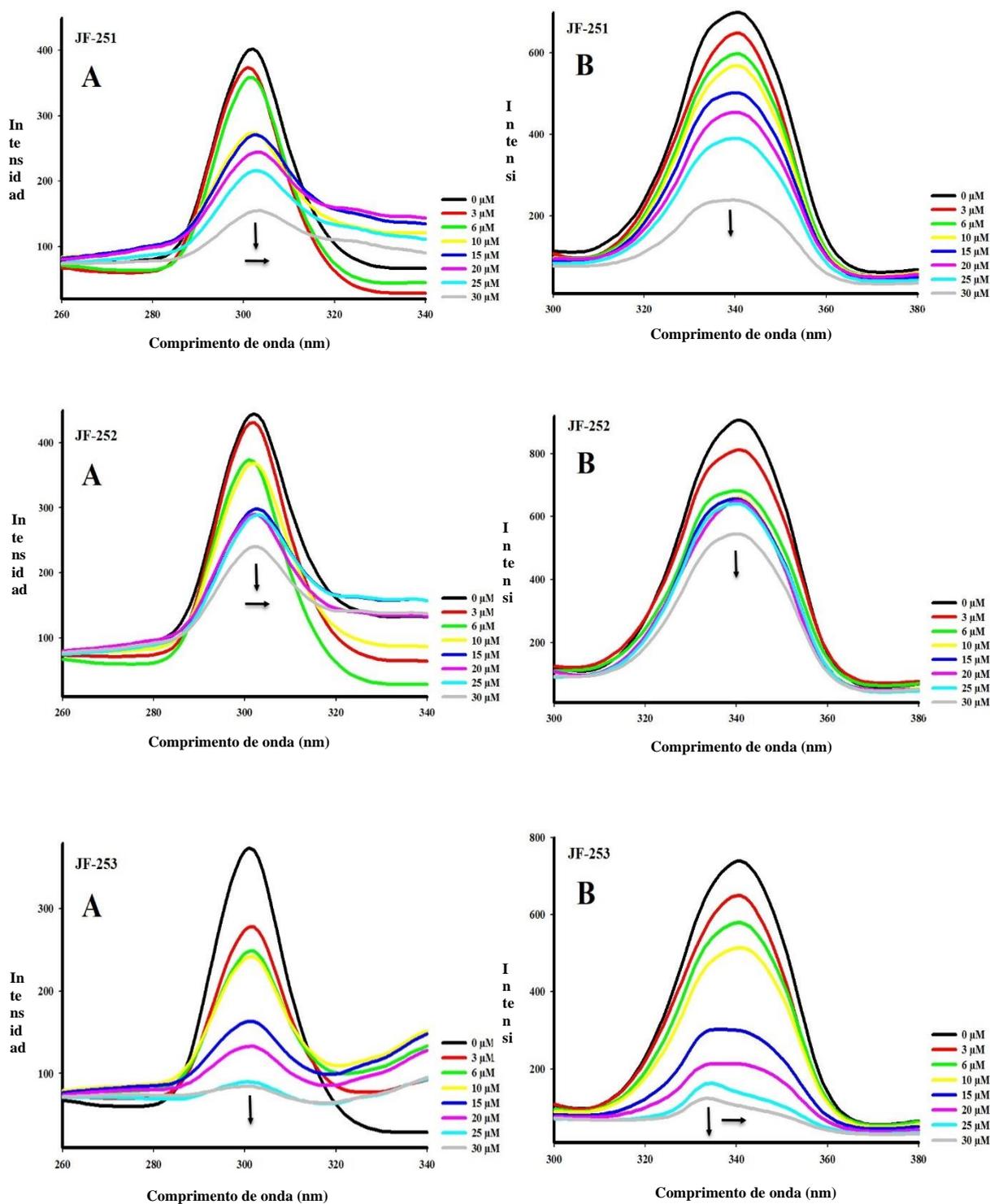


Figura C7. Espectros de fluorescência síncrona de HSA (3 μM) na ausência e presença de adições sucessivas dos derivados JFs 254 e 256 (0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) a $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B), a temperatura ambiente. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se aos efeitos hipocrômico e batocrômico, respectivamente.

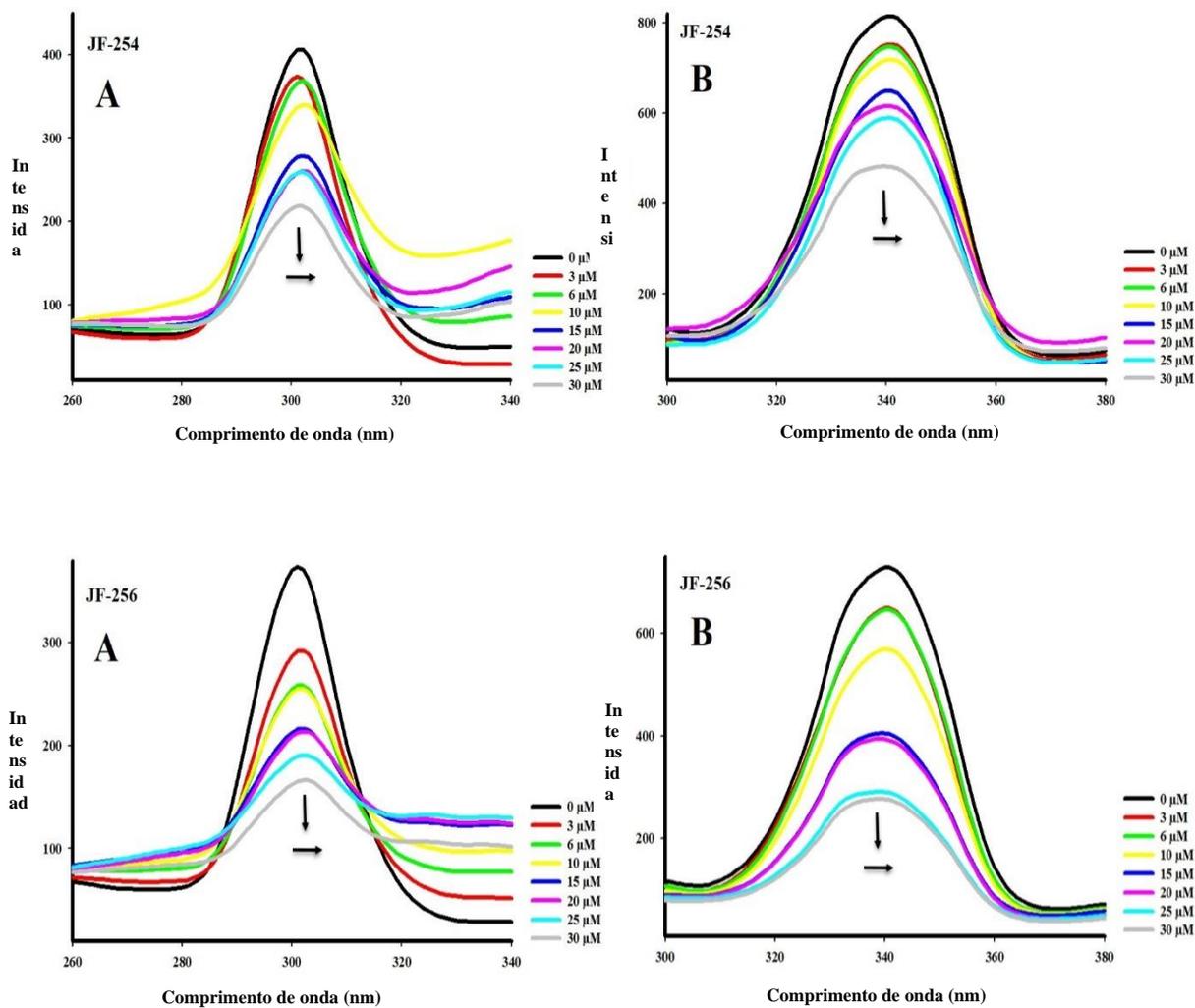


Figura C8. Deslocamento da indometacina do complexo HSA:indometacina (A) e do ibuprofeno do complexo HSA:ibuprofeno (B) pelos derivados JFs 249 e 250. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se a efeitos hipocrômicos e batocrômicos, respectivamente. (C) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os sistemas HSA:sítio-marcadores e os compostos supracitados, a temperatura ambiente. [Indometacina] = [Ibuprofeno] = 3 μ M; [HSA] = 3 μ M e [JF-255] = 3–30 μ M, λ_{ex} = 280 nm.

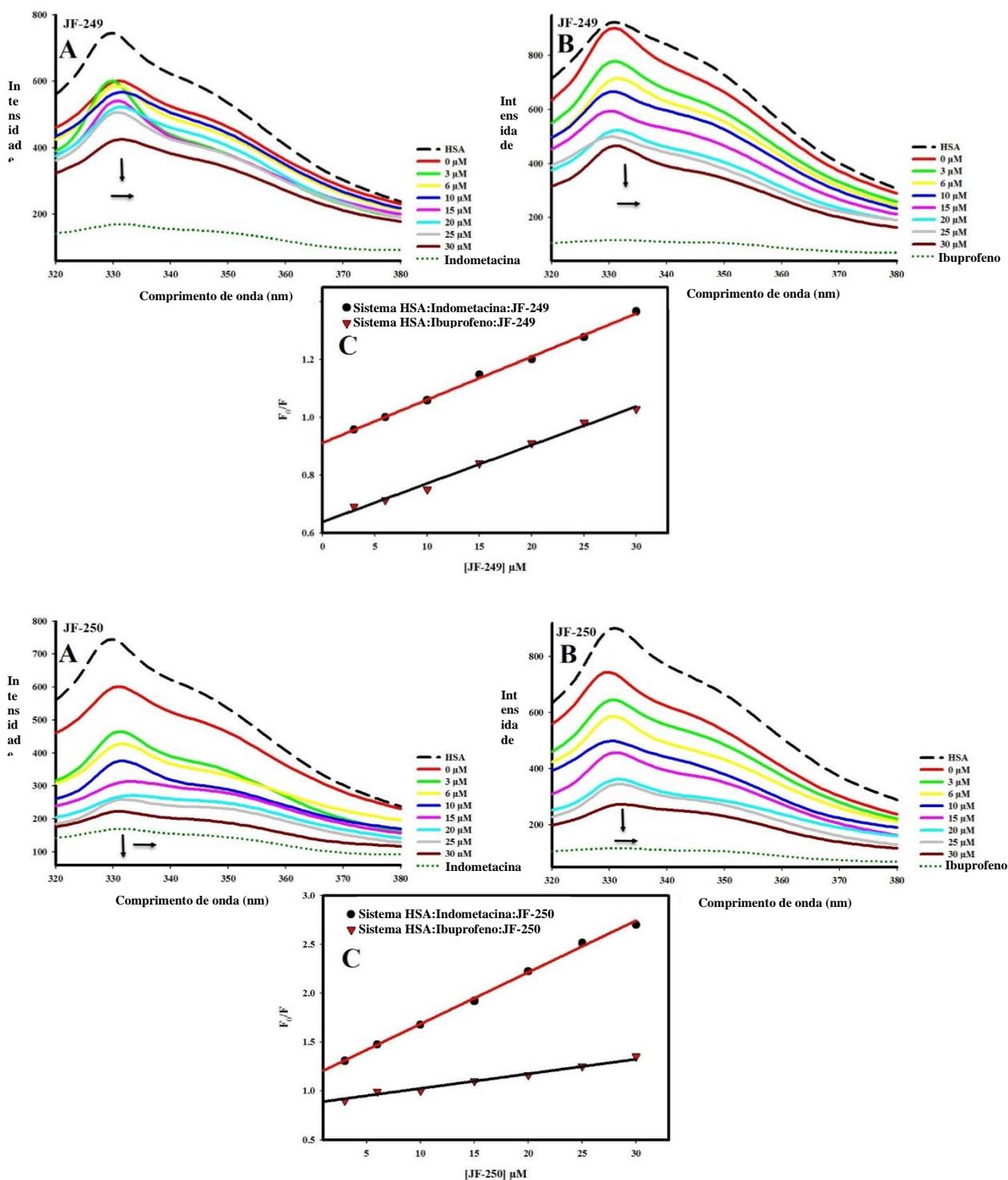


Figura C9. Deslocamento da indometacina do complexo HSA:indometacina (A) e do ibuprofeno do complexo HSA:ibuprofeno (B) pelos derivados JFs 251 e 252. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se a efeitos hipocrômicos e batocrômicos, respectivamente. (C) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os sistemas HSA:sítio-marcadores e os compostos supracitados, a temperatura ambiente. [Indometacina] = [Ibuprofeno] = 3 μ M; [HSA] = 3 μ M e [JF-255] = 3–30 μ M, λ_{ex} = 280 nm.

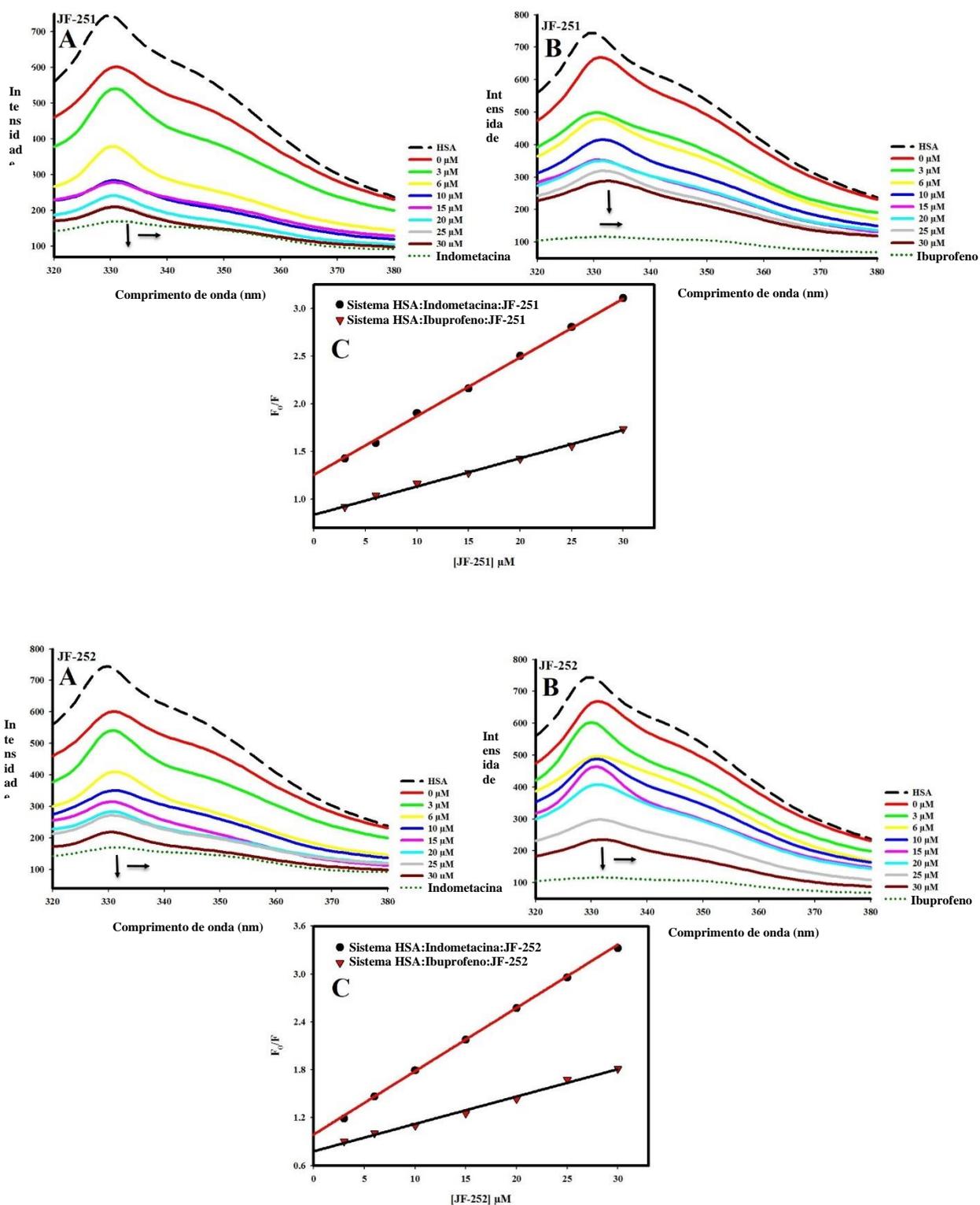


Figura C10. Deslocamento da indometacina do complexo HSA:indometacina (A) e do ibuprofeno do complexo HSA:ibuprofeno (B) pelos derivados JFs 253 e 254. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se a efeitos hipocrômicos e batocrômicos, respectivamente. (C) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os sistemas HSA:sítio-marcadores e os compostos supracitados, a temperatura ambiente. [Indometacina] = [Ibuprofeno] = 3 μ M; [HSA] = 3 μ M e [JF-255] = 3–30 μ M, λ_{ex} = 280 nm.

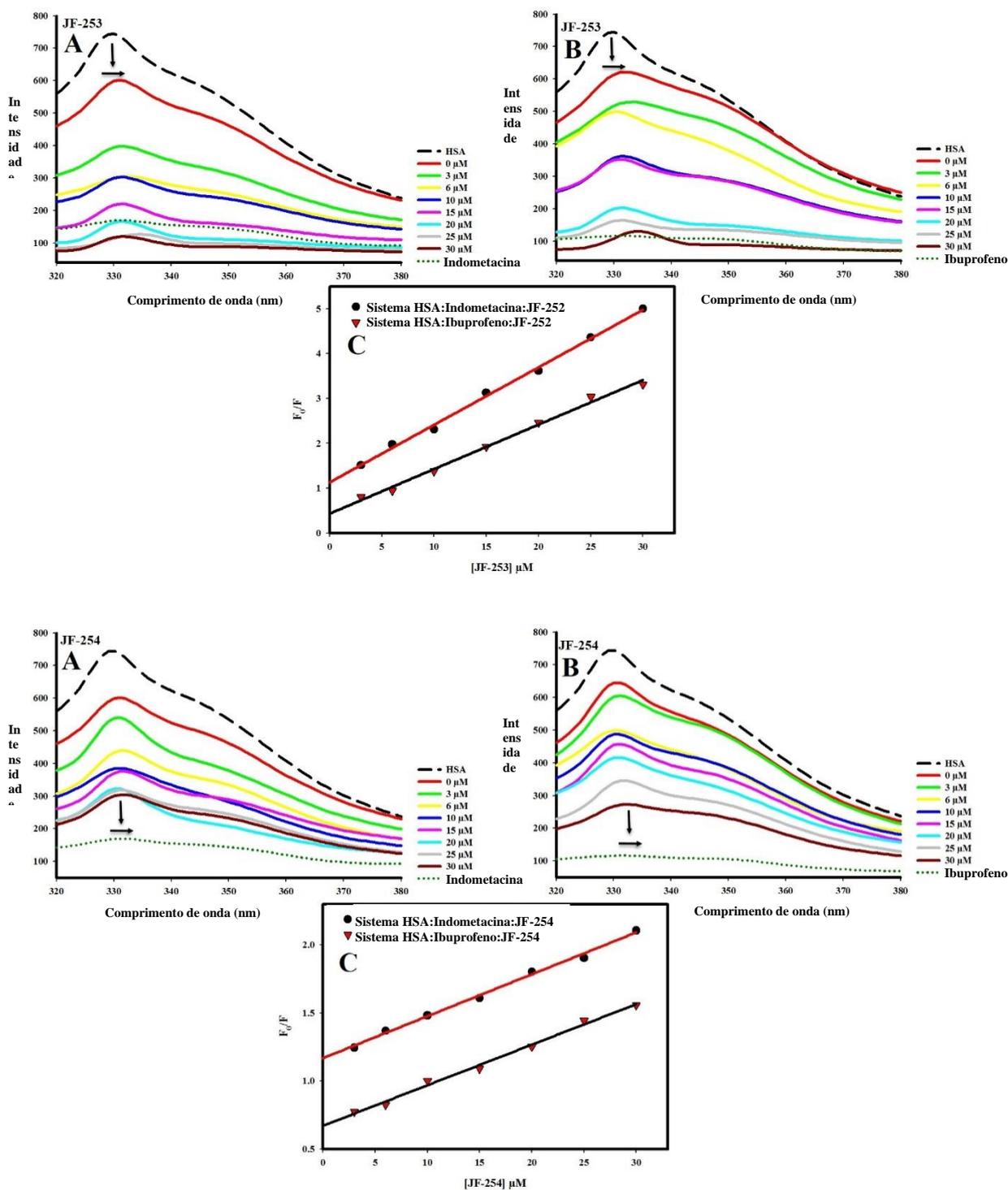
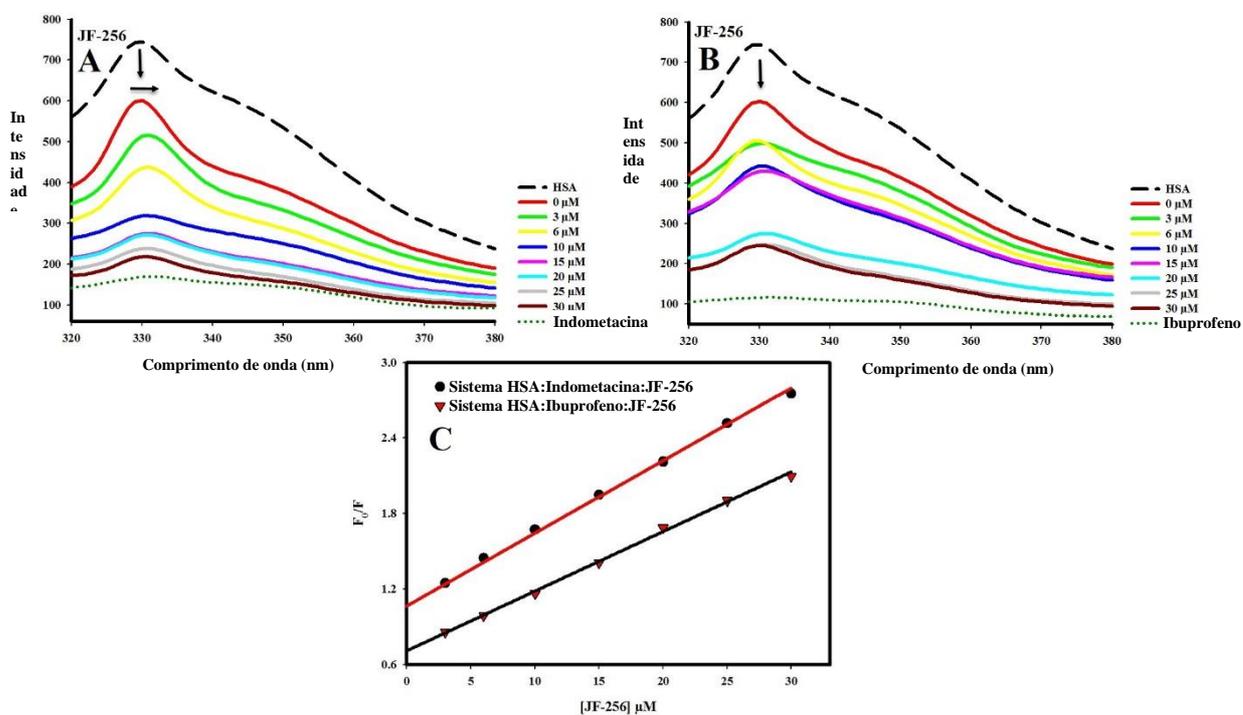


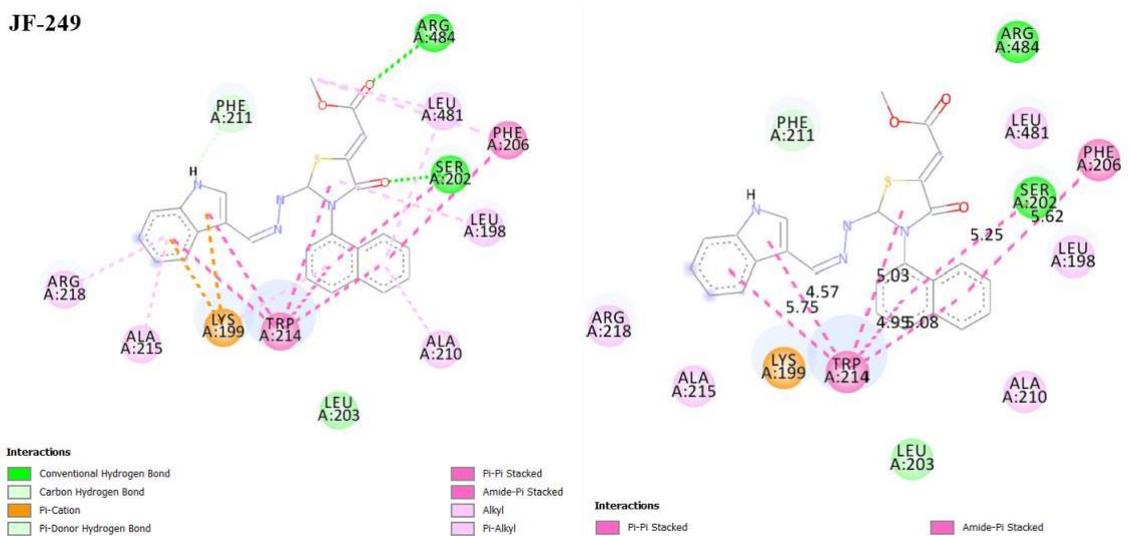
Figura C11. Deslocamento da indometacina do complexo HSA:indometacina (A) e do ibuprofeno do complexo HSA:ibuprofeno (B) pelos derivados JF-256. As setas (\downarrow) e (\rightarrow) referem-se a efeitos hipocrômicos e batocrômicos, respectivamente. (C) Gráficos de Stern-Volmer da interação entre os sistemas HSA:sítio-marcadores e o composto supracitado, a temperatura ambiente. [Indometacina] = [Ibuprofeno] = 3 μ M; [HSA] = 3 μ M e [JF-255] = 3–30 μ M, λ_{ex} = 280 nm.



APÊNDICE D – ILUSTRAÇÕES DETALHADAS DAS FORÇAS DE LIGAÇÃO ENTRE OS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS E INDOL-TIAZOLIDINONAS COM OS RESÍDUOS DE AMONÁCIDOS CIRCUNDANTES DA HSA ATRAVÉS DA TÉCNICA *IN SILICO* DE DOCKING MOLECULAR

Figura D1. Interações hidrofóbicas e polares dos compostos JFs 249 e 250 com os receptores da HSA (à esquerda). Em uma segunda imagem são mostrados (à direita) os tipos e distâncias das ligações das interações hidrofóbicas dos compostos supracitados com o resíduo Trp214.

JF-249



JF-250

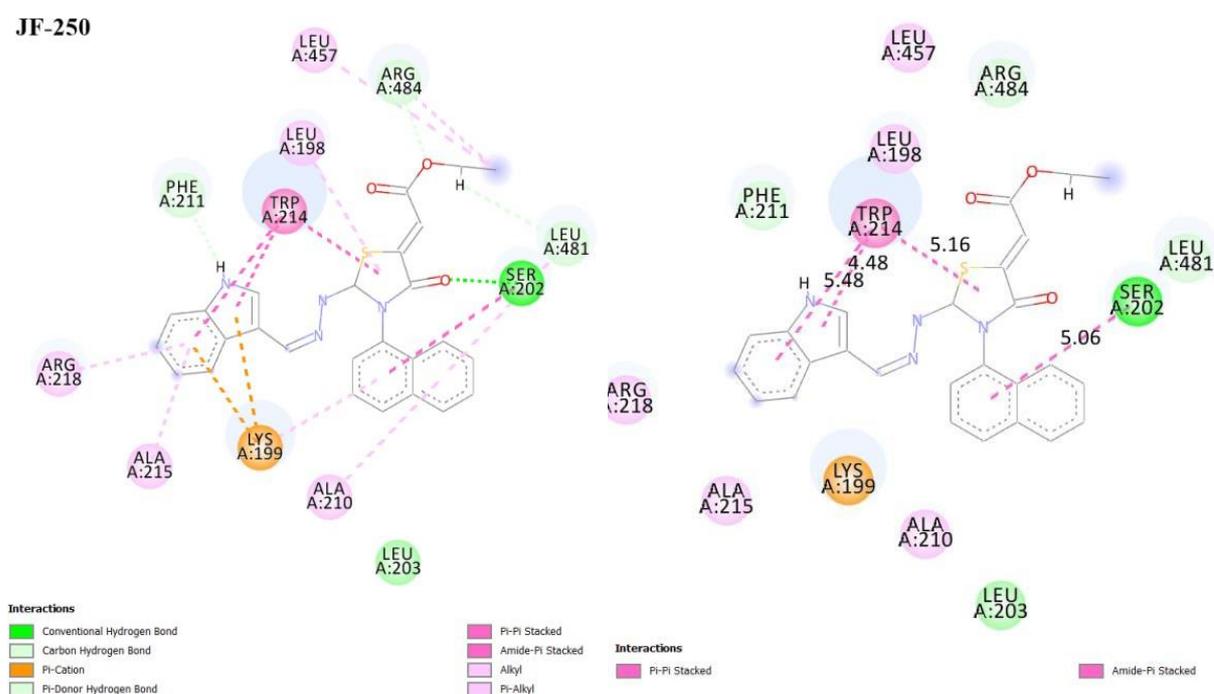
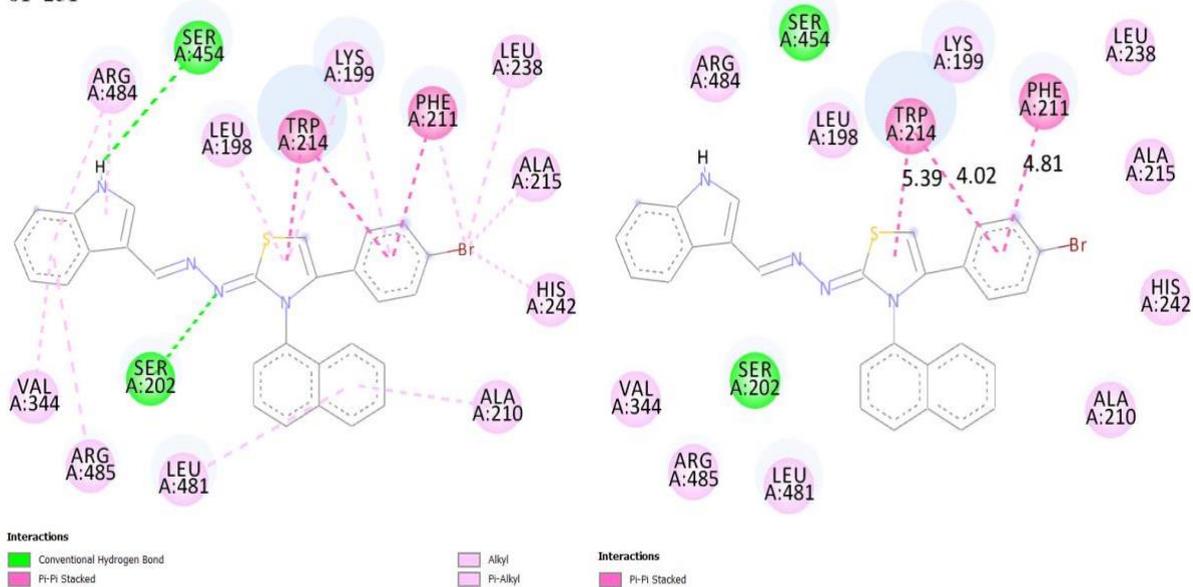


Figura D2. Interações hidrofóbicas e polares dos compostos JFs 251 e 252 com os receptores da HSA (à esquerda). Em uma segunda imagem são mostrados (à direita) os tipos e distâncias das ligações das interações hidrofóbicas dos compostos supracitados com o resíduo Trp214.

JF-251



JF-252

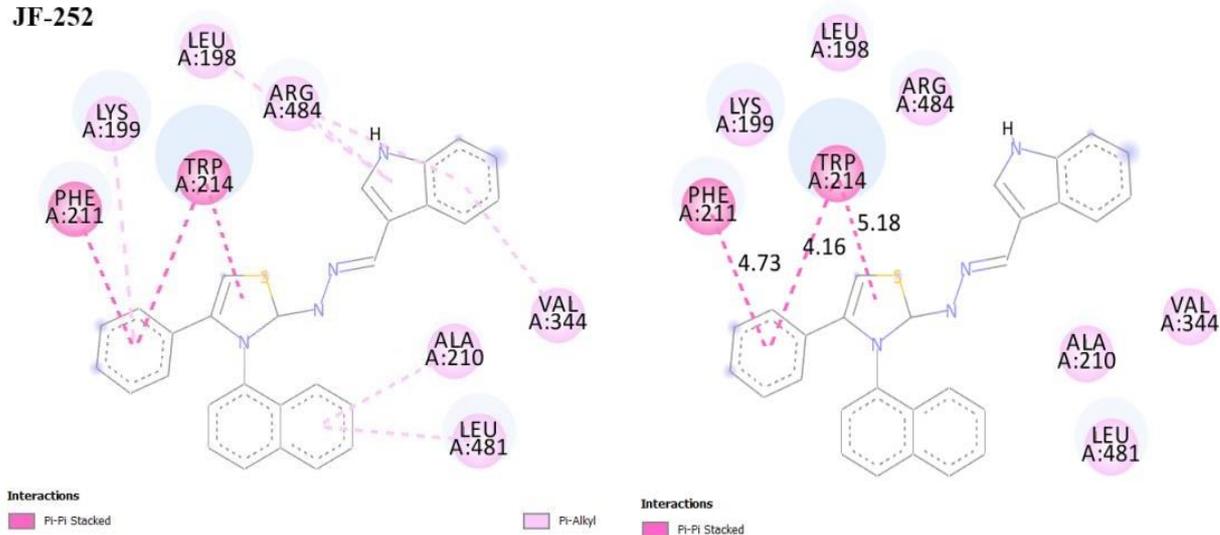
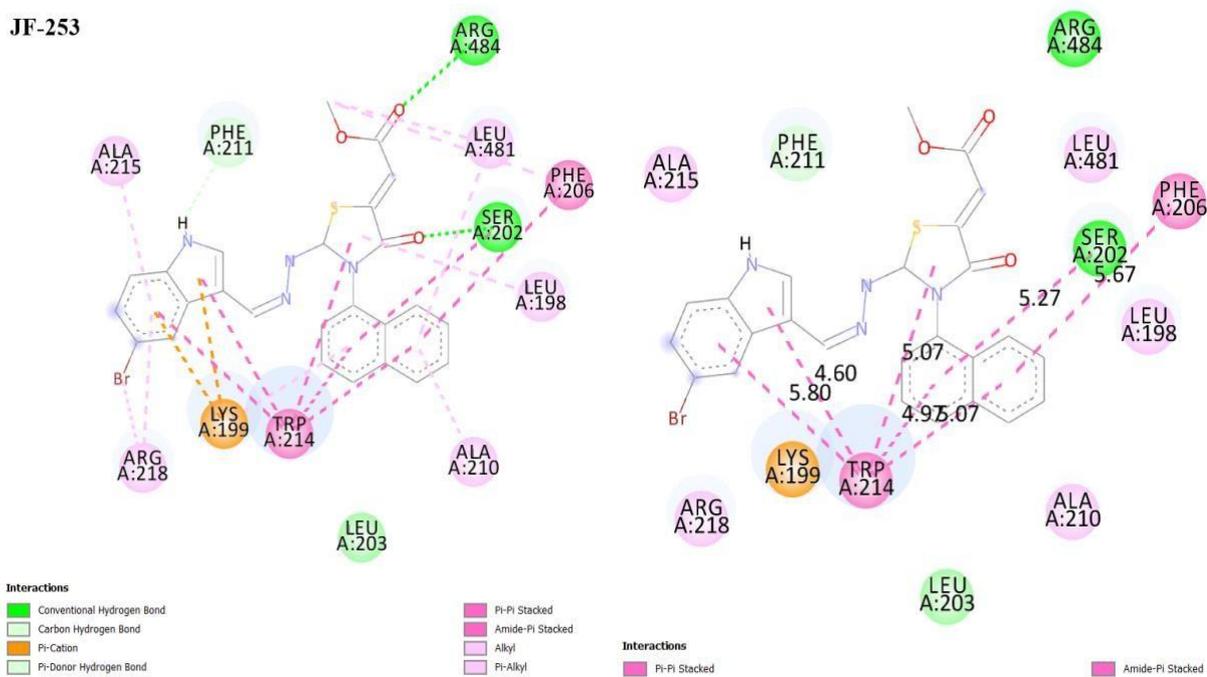


Figura D3. Interações hidrofóbicas e polares dos compostos JFs 253 e 254 com os receptores da HSA (à esquerda). Em uma segunda imagem são mostrados (à direita) os tipos e distâncias das ligações das interações hidrofóbicas dos compostos supracitados com o resíduo Trp214.

JF-253



JF-254

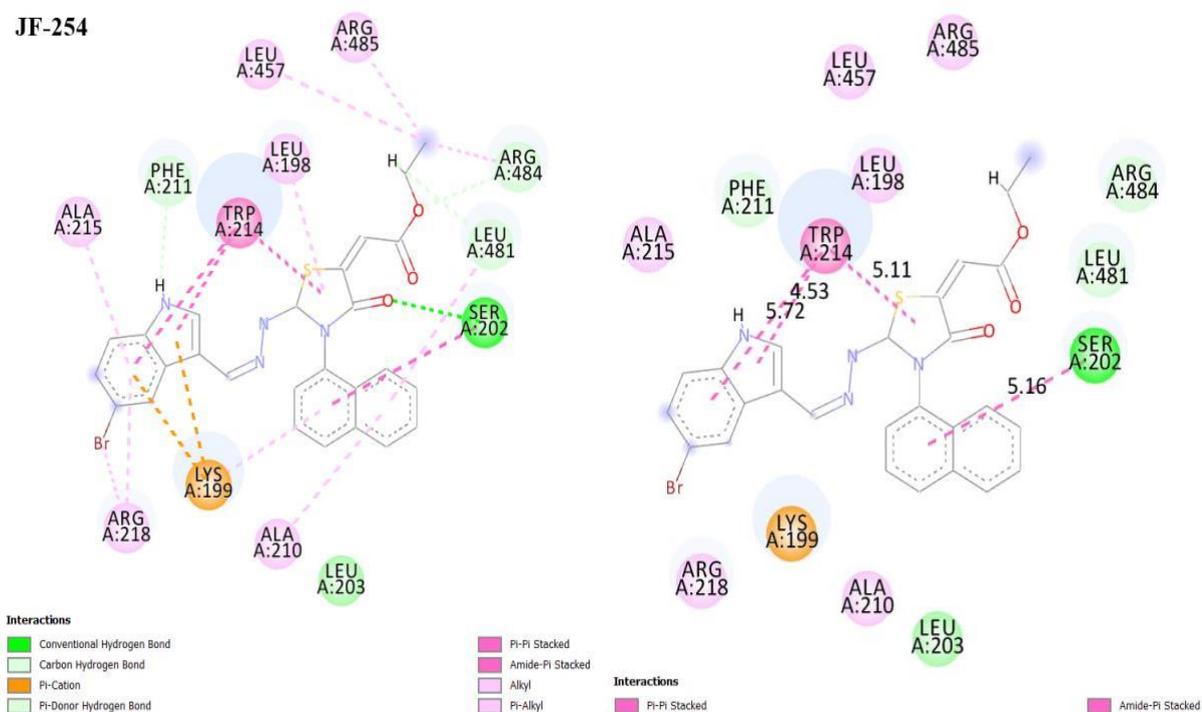


Figura D4. Interações hidrofóbicas e polares dos compostos JF-256 com os receptores da HSA (à esquerda). Em uma segunda imagem são mostrados (à direita) os tipos e distâncias das ligações das interações hidrofóbicas do composto supracitado com o resíduo Trp214.

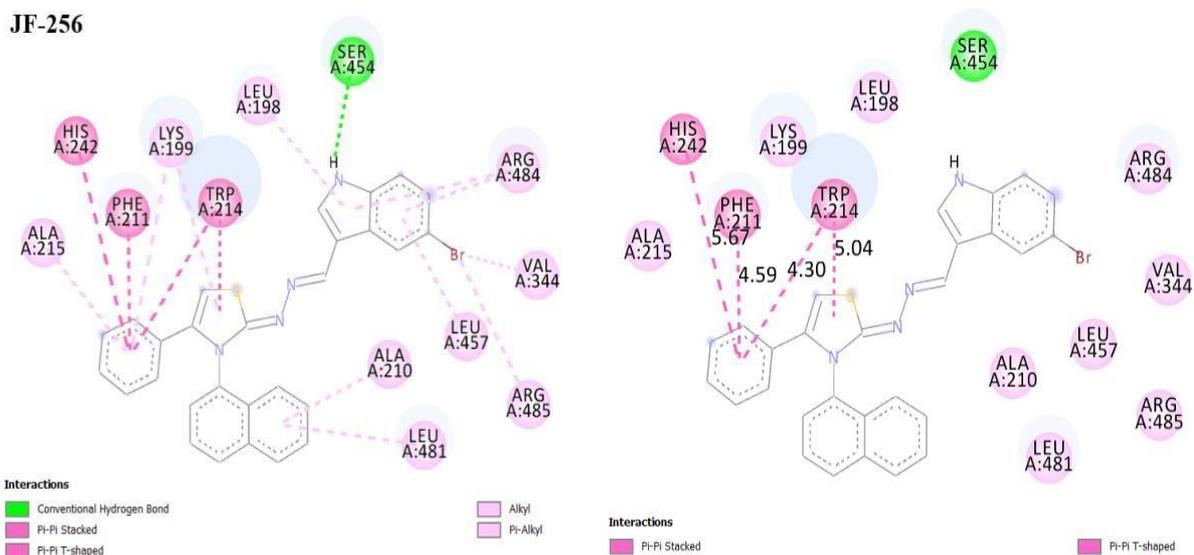
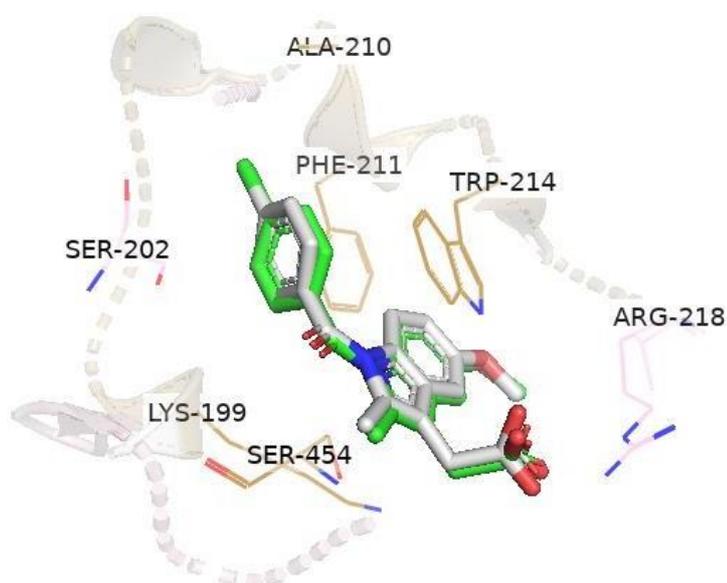


Figura D5. Ilustrações detalhadas de redoque para o presente estudo. O RMSD calculado foi de 0,42. Em verde está a conformação extraída do arquivo PDB: 2BXN; em branco, a conformação encontrada para Redocking.



ANEXOS – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A TESE

ARTIGO 1 – Publicado no periódico International Journal of Biological Macromolecules

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.097>

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1

International Journal of Biological Macromolecules 138 (2019) 582–589



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives



Francivaldo Araújo da Silva Filho ^a, Thais de Freitas Souza ^a, Amélia Galdino Ribeiro ^b,
 Josival Emanuel Ferreira Alves ^c, Jamerson Ferreira de Oliveira ^b, Túlio Ricardo Couto de Lima Souza ^d,
 Ricardo Olímpio de Moura ^e, Maria do Carmo Alves de Lima ^b,
 Luiz Bezerra de Carvalho Junior ^c, Sinara Mônica Vitalino de Almeida ^{a,c,*}

^a Universidade de Pernambuco (UPE), campus Garanhuns, Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Garanhuns, PE, Brazil

^b Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brazil

^e Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba – Bodocongo, Campina Grande, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2019

Received in revised form 24 June 2019

Accepted 15 July 2019

Available online 16 July 2019

Keywords:

Acridine-thiosemicarbazone

Protein interaction

Albumin

Topoisomerase II α

ABSTRACT

In the present study, acridine-thiosemicarbazones (ATD) derivatives were tested for their interaction properties with BSA through UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopic studies. Both hyperchromic and hypochromic effects, as well as red or blue shifts were demonstrated after the derivatives were added to the BSA. Values for the binding constant (K_b) ranged from 1.62×10^4 to $8.71 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and quenching constant (K_{SV}) from 3.46×10^2 to $7.83 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ indicating a good affinity to BSA protein. Complementary, two compounds were selected to assess their inhibition activity against topoisomerase II α enzyme, of which derivative 3a presented the best result. Moreover, to evaluate protein-ligand interactions, as well as the antitopoisomerase potential of these compounds, tests of molecular modeling were performed between all compounds using the albumin and Topoisomerase II α /DNA complex. Finally, *in silico* studies showed that all derivatives used in this research displayed good oral bioavailability potential.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ARTIGO 2 – Publicado no periódico Bioorganic & Medicinal ChemistryDOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115757>

Fator de impacto: 3.461

Qualis CAPES: A2

Bioorganic & Medicinal Chemistry 28 (2020) 115757



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

COVID-19 therapy: What weapons do we bring into battle?



Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{a,b,c,*}, José Cleberson Santos Soares^b,
 Keriolaine Lima dos Santos^b, Josival Emanuel Ferreira Alves^c, Amélia Galdino Ribeiro^b,
 Íris Trindade Tenório Jacob^b, Cindy Juliane da Silva Ferreira^a, Jéssica Celerino dos Santos^a,
 Jamerson Ferreira de Oliveira^b, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^c, Maria do Carmo Alves de Lima^b

^a Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil

^b Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Coronavirus
 SARS-CoV-2
 COVID-19
 Antiviral
 Repurposed drugs

ABSTRACT

Urgent treatments, in any modality, to fight SARS-CoV-2 infections are desired by society in general, by health professionals, by Estate-leaders and, mainly, by the scientific community, because one thing is certain amidst the numerous uncertainties regarding COVID-19: knowledge is the means to discover or to produce an effective treatment against this global disease. Scientists from several areas in the world are still committed to this mission, as shown by the accelerated scientific production in the first half of 2020 with over 25,000 published articles related to the new coronavirus. Three great lines of publications related to COVID-19 were identified for building this article: The first refers to knowledge production concerning the virus and pathophysiology of COVID-19; the second regards efforts to produce vaccines against SARS-CoV-2 at a speed without precedent in the history of science; the third comprehends the attempts to find a marketed drug that can be used to treat COVID-19 by drug repurposing. In this review, the drugs that have been repurposed so far are grouped according to their chemical class. Their structures will be presented to provide better understanding of their structural similarities and possible correlations with mechanisms of actions. This can help identifying anti-SARS-CoV-2 promising therapeutic agents.

ARTIGO 3 – Publicado no periódico International Journal of Biological Macromolecules

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.153>

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1

International Journal of Biological Macromolecules 170 (2021) 622–635



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders



Josival Emanuel Ferreira Alves^a, Jamerson Ferreira de Oliveira^b, Tulio Ricardo Couto de Lima Souza^c, Ricardo Olímpio de Moura^d, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^a, Maria do Carmo Alves de Lima^e, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{a,f,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Brazil

^b Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), 62790-970 Redenção, CE, Brazil

^c Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE 56909-535, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba e Bodocongo, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil

^e Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Brazil

^f Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE 55290-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2020

Received in revised form 18 December 2020

Accepted 19 December 2020

Available online xxx

Keywords:

Indole

Thiazole

DNA binder

ABSTRACT

In this study, we report the synthesis of eight novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives, as well as their ability to interact with DNA, analysed through the UV-vis absorption, fluorescence, circular dichroism (CD), viscosity techniques and molecular docking. The ctDNA interaction analysis demonstrated different spectroscopic effects and the affinity constants (K_b) calculated by the UV-vis absorption method were between 2.08×10^5 and $6.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, whereas in the fluorescence suppression constants (K_{sv}) ranged between 0.38 and $0.77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $0.60\text{--}7.59 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ using Ethidium Bromide (EB) and 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) as fluorescent probes, respectively. Most derivatives did not alter significantly the secondary structure of the ctDNA according to the CD results. None of the compounds was able to change the relative viscosity of the ctDNA. These results prove that compounds interact with ctDNA via groove binding, which was confirmed by A-T rich oligonucleotide sequence assay with compound JF-252, suggesting the importance of both the phenyl ring coupled to C-4 thiazole ring and the bromo-unsubstituted indole nucleus.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ARTIGO 4 – Publicado no periódico Medicinal Chemistry ResearchDOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02748-z>

Fator de impacto: 2.351

Qualis CAPES: B1

Medicinal Chemistry Research
<https://doi.org/10.1007/s00044-021-02748-z>**MEDICINAL
CHEMISTRY
RESEARCH**

REVIEW ARTICLE

**Albumin roles in developing anticancer compounds**

Amélia Galdino Ribeiro¹ · Josival Emanuel Ferreira Alves² · José Cleberon Santos Soares¹ ·
Keriolaine Lima dos Santos¹ · Íris Trindade Tenório Jacob² · Cindy Juliane da Silva Ferreira³ ·
Jéssica Celerino dos Santos³ · Rafael David Souto de Azevedo³ · Sinara Mônica Vitalino de Almeida ^{1,2,3} ·
Maria do Carmo Alves de Lima¹

Received: 22 March 2021 / Accepted: 26 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Albumin is an abundant protein in nature with several biological functions. In the human body, both in health and in illness, its transport function is highlighted by the binding to medicinal drugs and consequent distribution in the bloodstream to the site of action. This is particularly relevant for anticancer treatments, since this protein accumulates in the tumor microenvironment to supply the energetic demands of cancer cells. Different spectroscopy, thermodynamic and in silico studies techniques can be employed to verify how albumin binds to ligands by using either human serum albumin (HSA) or bovine serum albumin (BSA) due to their structural similarity. There is an increasing tendency to use albumin in analyses of absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) properties of anticancer molecules, which further demonstrated the promising character of this investigation for proposing new drugs.

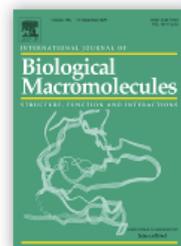
Keywords Albumin · Cancer · Transport · Interaction · Drugs

ARTIGO 5 – Publicado no periódico International Journal of Biological Macromolecules

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.109>

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1



ISSN: 0141-8130

International Journal of Biological Macromolecules 192 (2021) 126–137



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



A simple method for obtaining human albumin and its use for *in vitro* interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives

Josival Emanuel Ferreira Alves^a, Maria Luiza Cavalcanti Lucena^a,
Antônio Edson de Souza Lucena^b, Aurenice Arruda Dutra das Mercês^a,
Rafael David Souto de Azevedo^d, Gleyton Leonel Silva Sousa^c, Ricardo Olimpio de Moura^f,
Maria do Carmo Alves de Lima^c, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^a,
Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{a,d,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

^b Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRÁS), Recife, PE 51021-410, Brazil

^c Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

^d Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE 55290-000, Brazil

^e Programa de Doutorado em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

^f Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, PB 58429-500, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Albumin
Indole
Plasma fractionation

ABSTRACT

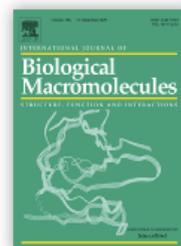
This work aimed to develop a simple and low-cost method to obtain human serum albumin (HSA) and its consequent application for *in vitro* drug interaction assays. The HSA was purified by classic principles of plasma precipitation and thermocoagulation, using a multiple-stage fractionation. The quality of the final product was assessed by electrophoresis, protein dosage by the Lowry method and the pharmacopeial thermal stability. At the end, an isotonic solution of HSA with a total protein concentration of 2.7 mg·mL⁻¹ was obtained, which was visualized as a single band corresponding to the molecular weight of 66 kDa. After the thermal stability test, there was no indication of turbidity or color change of the solution. Finally, the HSA was useful for interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives through UV-vis absorption and fluorescence spectroscopic studies, as well as by docking molecular analysis. Derivatives quenched the intrinsic fluorescence of HSA, disrupted the tryptophan residues microenvironment, and probably bind at Sudlow's site I. Therefore, the simplified methodology developed in this work proved to be effective in obtaining HSA that can be applied to research goals including drug interaction assays.

ARTIGO 6 – Publicado no periódico International Journal of Biological Macromolecules

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123606>

Fator de impacto: 8.025

Qualis CAPES: A1



ISSN: 0141-8130

International Journal of Biological Macromolecules 234 (2023) 123606



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Interaction study with DNA/HSA, anti-topoisomerase II α , cytotoxicity and *in vitro* antiproliferative evaluations and molecular docking of indole-thiosemicarbazone compounds

Iris Trindade Jacob^a, Iranildo José da Cruz Filho^a, Josival Emanuel Ferreira Alves^b, Felipe de Melo Souza^c, Rafael David Souto de Azevedo^c, Diego Santa Clara Marques^a, Túlio Ricardo Couto de Lima Souza^d, Keriolaine Lima dos Santos^a, Maira Galdino da Rocha Pitta^f, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^f, Jamerson Ferreira Oliveira^e, Sinara Mônica Vitalino Almeida^{b,c,*}, Maria do Carmo Alves de Lima^a

^a Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LBIKA), Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Brazil

^c Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE 55290-000, Brazil

^d Rural University of Pernambuco, Academic Unit of Belo Jardim, 55156-580 Belo Jardim, PE, Brazil

^e University for the International Integration of Afro-Brazilian Lusophony (UNIILAB), 62790-970 Rodenópolis, CE, Brazil

^f Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA
Albumin
Topoisomerase
Cancer

ABSTRACT

In this work we will discuss the antiproliferative evaluation and the possible mechanisms of action of indole-thiosemicarbazone compounds LTs with anti-inflammatory activity, previously described in the literature. In this perspective, some analyzes were carried out, such as the study of binding to human serum albumin (HSA) and to biological targets: DNA and human topoisomerase II α (topo). Antiproliferative study was performed with DU-145, Jukart, MCF-7 and T-47D tumor lines and J774A.1, besides HepG2 macrophages and hemolytic activity. In the HSA interaction tests, the highest binding constant was $3.70 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, referring to LT89 and in the fluorescence, most compounds, except for LT76 and LT87, promoted fluorescent suppression with the largest Stern-Volmer constant for the LT88 3.55×10^4 . In the antiproliferative assay with DU-145 and Jurkat strains, compounds LT76 ($0.98 \pm 0.10/1.23 \pm 0.32 \mu\text{M}$), LT77 ($0.94 \pm 0.05/1.18 \pm 0.08 \mu\text{M}$) and LT87 ($0.94 \pm 0.12/0.84 \pm 0.09 \mu\text{M}$) stood out, due to their IC_{50} values mentioned above. With the MCF-7 and T-47D cell lines, the lowest IC_{50} was presented by LT81 with values of $0.74 \pm 0.12 \mu\text{M}$ and $0.68 \pm 0.10 \mu\text{M}$, respectively, followed by the compounds LT76 and LT87. As well as the positive control ansacrine, the compounds LT76, LT81 and LT87 were able to inhibit the enzymatic action of human Topoisomerase II α .

ARTIGO 7 – Artigo submetido no periódico Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

Fator de impacto: 4.831

Qualis CAPES: A2



Study of nitrogen heterocycles as DNA/HSA binder, topoisomerase inhibitors and toxicological safety

Jéssica Celerino dos Santos¹; Josival Emanuel Ferreira Alves²; Rafael David Souto de Azevedo¹; Josefa Gerlane da Silva¹; Jamire Muriel da Silva³; Maria do Carmo Alves de Lima³; Ricardo Olímpio de Moura⁴; Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,2,3}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco (UPE), Multicampi Garanhuns, Garanhuns, PE, 55290-000, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁴Departamento de Farmácia, Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande 58429-500, PB, Brazil.

ABSTRACT

The present work reports the synthesis of four new nitrogen heterocyclic derivatives with different nuclei – acridine, quinoline, indole and pyridine – as well as their biological properties regarding the capacity of interacting with DNA and human serum albumine (HSA) through UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy, molecular docking and inhibition of human topoisomerase II α enzyme. The different spectroscopic effects observed in the investigation of the interaction between the derivatives and ssDNA and HSA revealed that the compounds presented interaction affinity with biomolecules. The compounds that stood out were the derivative CAIC with the indole nucleus and CAAC with the acridine nucleus, which presented binding constants (K_b) of 9.54×10^4 and 1.06×10^6 , respectively. The fluorescence suppression assay (K_{sv}) using probes generated suppression values ranging from 0.34 to $0.64 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and 0.1 a $0.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for ethidium bromide (EB) and acridine orange (AO), respectively. These results indicate that the derivatives compete for the same binding site of the intercalation probes, which is confirmed by molecular docking. In addition, the derivatives inhibited the topoisomerase enzyme activity at concentrations of $10 \mu\text{M}$. In other words, the reduction of the acridine ring in the different nuclei does not interfere with the molecules binding affinity (DNA/HSA) and with the inhibitory capacity against human topoisomerase II α enzyme, consequently, it shows potential antitumor activity. In the toxicological evaluation of heterocycles in embryos, the derivatives did not show acute toxicity. However, some derivatives reduced, and others increased the activity of REDOX system enzymes. The CAAC and CAQA at $1 \mu\text{M}$ reduced the activity of catalase, while the

CAIC (1 μM) and CAPA (0.5 μM) significantly increased the activity of this enzyme. A reduction in SOD enzyme activity was observed for CAPA (1 μM). In addition to increasing SOD activity, the CAIC derivative also altered the heart rate of embryos compared to the control. The findings found in this study for the studied derivatives provide us with information about the potential antitumor action. However, the effects presented by the CAAC and CAIC compounds in terms of enzyme and cardiac changes give us indications that these effects may be indicative of a possible toxicological effect, requiring further investigations to evaluate the generation of reactive oxygen species.